



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

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

**TEMA: “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL
OOMYCETE *Phytophthora cinnamomi* CAUSANTE DE LA
PUDRICIÓN DE LA RAÍZ DE AGUACATE Y EVALUACIÓN DE
ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* POR MEDIO DE
Trichoderma spp.”**

AUTOR: CARRERA MENA NELSON GABRIEL

DIRECTOR: KOCH KAISER ALMA ROSEL M.Sc.

SANGOLQUÍ

2016



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “ **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL OOMYCETE *Phytophthora cinnamomi* CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DE LA RAÍZ DE AGUACATE Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* POR MEDIO DE *Trichoderma spp.*”** realizado por **CARRERA MENA NELSON GABRIEL**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **NELSON GABRIEL CARRERA MENA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí , 09 de Mayo 2016

**ALMA KOCH KAISER
DIRECTORA**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **CARRERA MENA NELSON GABRIEL**, con cedula de identidad N° 171905358-7 declaro que este trabajo de titulación “ **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL OOMYCETE *Phytophthora cinnamomi* CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DE LA RAÍZ DE AGUACATE Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* POR MEDIO DE *Trichoderma spp.*”**, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí , 09 de Mayo 2016

NELSON GABRIEL CARRERA MENA

C.C 171905358-7



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **CARRERA MENA NELSON GABRIEL**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, “ **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL OOMYCETE *Phytophthora cinnamomi* CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DE LA RAÍZ DE AGUACATE Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* POR MEDIO DE *Trichoderma spp.***” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí , 09 de Abril 2016

NELSON GABRIEL CARRERA MENA

C.C 171905358-7

DEDICATORIA

A mis padres, Mónica Mena y Nelson Carrera que a pesar de las dificultades han creído en mí, y me han enseñado que lo mas importante en la vida no es el dinero, que puedas conseguir con tus conocimientos, sino la ayuda que puedas proporcionar a los demás.

A mis hermanas, Belén Carrera y Victoria Carrera, que han estado ahí a mi lado en todas las etapas de mi vida quizá muchas veces no con palabras pero siempre con su presencia.

A mis sobrinas, Danae Cabrera y Adaly Cabrera, el rayo de sol de mi vida, que gracias a sus sonrisas, que no me hacen olvidar el por qué de salir adelante

A mi novia y madre de mi hija, Gabriela Hidalgo, gracias por estos cinco años de felicidad, y ahora con una nueva integrante que nos permitirá formar una familia, les amo con todo mi corazón.

A mi familia, si bien hay una distancia que nos separa, sus buenos deseos y fuerza siempre han estado ahí, para ser un apoyo.

A mis amigos, que si bien han estado en diferentes partes de mi vida han sido un granito de arena para la construcción de mi vida y el apoyo incondicional de todos.

A mis profesores, que gracias a su experiencia hubo gran aporte de su parte en mi formación estudiantil y como persona.

Nelson Gabriel Carrera Mena

AGRADECIMIENTO

A la MSc. Alma Koch, por su confianza, al permitirme realizar el proyecto de titulación, y por sus pocas pero concisas palabras de sabiduría y aliento, además de permitirme ayudarla en sus clases de microbiología, con las que pude recordar el correcto procedimiento de técnicas microbiológicas que me ayudaron en mi proyecto de titulación.

Al PhD. Francisco Flores y a la MSc. Jesica Maisincho, quienes me prestaron su ayuda y me brindaron sus conocimientos para la realización de mi proyecto de titulación

A mis amigos Alejandro Paz, Liz Abata, por toda la ayuda brindada, por las largas tardes y fines de semana compartidos en la realización de nuestros proyectos de titulación.

Nelson Gabriel Carrera

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| CERTIFICACIÓN | ii |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD..... | iii |
| AUTORIZACIÓN..... | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| LISTADO ABREVIATURAS..... | xii |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Formulación del Problema | 1 |
| 1.2 Justificación del Problema | 2 |
| 1.3 Objetivos de la Investigación..... | 2 |
| 1.3.1 Objetivo general..... | 2 |
| 1.3.2 Objetivo específico | 3 |
| 1.4 Marco teórico | 3 |
| 1.4.1 Aguacate..... | 3 |
| 1.4.2 Tristeza del Aguacatero..... | 4 |
| 1.4.3 <i>Phytophthora cinnamomi</i> | 5 |
| 1.4.4 Control Biológico..... | 9 |
| 1.4.5 <i>Trichoderma</i> spp..... | 10 |
| 1.5 Hipótesis de la Investigación..... | 14 |
| 2 CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 2.1 Participantes..... | 15 |
| 2.2 Zona de estudio | 15 |
| 2.2.1 Fase de campo | 15 |
| 2.2.2 Fase de laboratorio..... | 15 |
| 2.3 Periodo de Investigación..... | 16 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4 | Aislamiento e identificación de <i>Phytophthora cinnamomi</i> | 16 |
| 2.4.1 | Muestreo de raíces infectadas | 16 |
| 2.4.2 | Aislamiento de <i>Phytophthora cinnamomi</i> | 16 |
| 2.4.3 | Caracterización macroscópica de <i>Phytophthora cinnamomi</i> en medio de cultivo en caja Petri. | 18 |
| 2.4.4 | Caracterización morfológica de <i>Phytophthora cinnamomi</i> | 19 |
| 2.4.5 | Identificación Molecular de <i>Phytophthora cinnamomi</i> | 19 |
| 2.5 | Postulados de Koch..... | 22 |
| 2.6 | Conservación de <i>P. cinnamomi</i> | 22 |
| 2.7 | Aislamiento de cepa nativa de <i>Trichoderma</i> spp. | 23 |
| 2.7.1 | Toma de muestra | 23 |
| 2.7.2 | Aislamiento de <i>Trichoderma</i> nativa de cultivos de Aguacate..... | 23 |
| 2.8 | Aislamiento de cepa <i>Trichoderma</i> spp. del producto comercial. | 24 |
| 2.9 | Caracterización macroscópica de <i>Trichoderma</i> spp. en medio de cultivo en cajas Petri..... | 24 |
| 2.10 | Caracterización Morfológica de <i>Trichoderma</i> spp..... | 25 |
| 2.11 | Conservación de cepas de <i>Trichoderma</i> | 25 |
| 2.12 | Pruebas de Antagonismo In vitro de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>P.</i> <i>cinnamomi</i> | 25 |
| 2.13 | Análisis estadístico de Datos | 27 |
| 3 | CAPÍTULO III: RESULTADOS | 28 |
| 3.1 | Aislamiento e identificación macroscópica y morfológica de <i>P.</i> <i>cinnamomi</i> | 28 |
| 3.2 | Identificación molecular de <i>P. cinnamomi</i> | 30 |
| 3.2.1 | Extracción de ADN..... | 30 |
| 3.2.2 | Amplificación del gen LPV y electroforesis | 30 |
| 3.2.3 | Secuenciación y Alineamiento..... | 30 |
| 3.3 | Postulados de Koch..... | 31 |
| 3.4 | Aislamiento e identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. | 32 |
| 3.5 | Pruebas de Antagonismo In vitro | 33 |
| 3.5.1 | Competencia por espacio y nutrientes..... | 33 |
| 3.5.2 | Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)..... | 34 |

| | | | |
|-------|--|----|----|
| | | ix | |
| 3.5.3 | Micoparasitismo | | 35 |
| 4 | CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN..... | | 37 |
| 5 | CAPÍTULO V: CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y BIBLIOGRAFÍA..... | | 41 |
| 5.1 | Conclusiones..... | | 41 |
| 5.2 | Recomendaciones..... | | 41 |
| 5.3 | Bibliografía..... | | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Planta de aguacate con síntomas de “Tristeza del aguacatero” | 5 |
| Figura 2 Morfología microscópica de <i>P. Cinnamomi</i> | 7 |
| Figura 3 Crecimiento de <i>P. cinnamomi</i> en medio PDA | 8 |
| Figura 4 Ciclo de infección de <i>P. cinnamomi</i> | 9 |
| Figura 5 <i>Trichoderma</i> spp. : Conidios, fálides y conidióforo (400x)..... | 12 |
| Figura 6 “Tristeza del Aguacatero”..... | 17 |
| Figura 7 Aislamiento de <i>P.cinnamomi</i> | 18 |
| Figura 8 Aislado de <i>P. cinnamomi</i> | 28 |
| Figura 9 Aislado de <i>P. cinnamomi</i> vista al microscópio..... | 29 |
| Figura 10 Progreso de crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i> en medio de cultivo PDA..... | 29 |
| Figura 11 Electroforesis amplicon del gen LPV de <i>P.cinnamomi</i> ,..... | 31 |
| Figura 12 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp..... | 32 |
| Figura 13 Observación morfológica de <i>Trichoderma</i> | 33 |
| Figura 14 Crecimiento radial de <i>P. cinnamoni</i> frente a <i>Trichoderma</i> spp..... | 34 |
| Figura 15 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de <i>P.</i> <i>cinnamoni</i> frente a <i>Trichoderma</i> spp..... | 35 |
| Figura 16 Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>P. cinnamomi</i> | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Escala para la evaluación de la capacidad antagónica | 26 |
| Tabla 2 Promedio de crecimiento diametral (CD) de <i>Trichoderma</i> en milímetros | 33 |
| Tabla 3 Grado de micoparasitismo en cada uno de los tratamientos | 36 |

LISTADO ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

d: días

mm: milímetros

µm: micrómetros

rpm: revoluciones por minuto

min: minutos

mL: mililitros

µm: microlitros

pb: pares de bases

s: segundos

g: gramos

ng: nano gramos

µg: microgramos

RCP: radio de crecimiento del patógeno

RCA: radio de crecimiento del antagonista

PICR: Porcentaje de inhibición de crecimiento radial

OEPP/EPPO: Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi es el causante de la mayor pérdida de cultivos de aguacate en el Ecuador y a nivel mundial. Este fitopatógeno fue aislado e identificado morfológica y molecularmente de raíces de árboles de aguacate del sector de Monteolivo provincia del Carchi, infectados con esta enfermedad. Con el patógeno aislado e identificado se procedió a realizar pruebas de antagonismo con *T. viride*, *T. harzianum*, *Trichoderma* comercial y una *Trichoderma* aislada de cultivos de aguacate del sector de estudio de los cuales. *T. viride*, *T. harzianum* y *Trichoderma* nativa ejercieron mejor biocontrol en porcentaje de inhibición de crecimiento (PICR), en tanto que *T. viride* se destaca en el biocotrol por competencia por espacio y nutrientes. Todas las *Trichodermas* presentan antagonismo por micoparasitismo, con mayor grado de micoparasitismo por parte de *T. viride*.

PALABRAS CLAVE:

- *P. cinnamomi*
- ANTAGONISMO
- *Trichoderma*
- COMPETENCIA
- PICR
- MICOPARASITISMO

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi causes the greatest loss of avocado crops in Ecuador and worldwide. This plant pathogen was isolated from avocado infected tree roots in Carchi's province Monteolivo area, then it was identified by morphology and molecular based methods. The pathogen antagonism was tested against *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, one commercial *Trichoderma* strain and one isolated native strain from avocado studied crop area.

T. viride, *T. harzianum* and native *Trichoderma* strain showed best percentage inhibition of the radial growth (PRGI) *P. cinnamomi*, whereas in *T. viride* showed the best result in the antagonism test by competition for space and nutrients.

Whole *Trichoderma* strains presented antagonism by mycoparasitism *T. viride* showed the best result.

KEYWORDS:

- *P. cinnamomi*
- **ANTAGONISM**
- *Trichoderma*
- **COMPETITION**
- **PRGI**
- **MICOPARASITISM**

1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

El aguacate (*Persea americana*), es un árbol originario de México, Guatemala, El Salvador y Perú, que pertenece a la familia de las Lauráceas, y que hoy en día es de importancia económica en más de 70 países (Ponce et al., 2013).

En el Ecuador, el aguacate ha dejado de ser un cultivo de producción nacional, para ser un producto con alto potencial de exportación debido a su capacidad de producción en todo el año y a sus características de sabor y calidad (Ponce et al., 2013). El Ecuador ha exportado cerca de 25,7 mil toneladas de aguacate en los años 2004 al 2008 con un crecimiento anual de 3,12 %, y es un cultivo que va tomando cierta importancia en la industria agrícola nacional (CICO, 2009).

Según el Ministerio de Agricultura y Pesca (2016), en la actualidad en el Ecuador las hectáreas de plantación del Aguacate son de 7.797 con una producción de 26.258 toneladas métricas, de las cuales 1.161 hectáreas se pierden por sequía, plagas, enfermedades, inundaciones, y específicamente 175 hectáreas se pierden por enfermedades. La principal enfermedad que afecta a nivel mundial los árboles de aguacate es la “Tristeza del aguacatero” (López et al., 1997).

La “Tristeza del aguacatero” o “podredumbre de la raíz” es la enfermedad que más ataca al aguacate y es producida por el oomycete *Phytophthora cinnamomi* que sin tratamiento adecuado ocasiona la muerte del árbol al destruir su sistema radicular (Ponce et al., 2013).

1.2 Justificación del Problema

Existen microorganismos antagonistas, que se los puede aprovechar como control biológico debido a los problemas y limitaciones del uso de agroquímicos por el costo que implican y que se han encontrado aislamientos de microorganismos y resistencia a fungicidas como el Metalaxyl (Almaraz et al., 2012).

La *Trichoderma* es uno de los organismos de control biológico más estudiados ya que está ampliamente distribuida por todas las latitudes y se lo encuentra naturalmente en ambientes que tienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Su capacidad para producir diversos metabolitos antibióticos así como el micoparasitismo le da a la *Trichoderma* su capacidad antagonista variable (Martínez, Infante y Reyes, 2013).

Debido a que es importante disminuir el uso de agroquímicos, en el presente trabajo además de la identificación del fitopatógeno causante de la pudrición de raíz en los árboles de aguacate se busca analizar In vitro antagonistas del género *Trichoderma* que combatan de manera viable a *P. cinnamomi*.

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo general

Aislar e identificar *Phytophthora cinnamomi* causante de la pudrición de raíces en el aguacate (*Persea americana*) y realizar pruebas de antagonismo In vitro con *Trichoderma* spp.

1.3.2 Objetivo específico

- Aislar *Phytophthora cinnamomi* de las raíces de aguacate (*Persea americana*).
- Identificar molecularmente al oomicete *Phytophthora cinnamomi* que infecta cultivos de aguacate (*Persea americana*).
- Aislar *Trichoderma* spp. de suelos propios de la zona de cultivo de aguacate (*Persea americana*).
- Realizar pruebas antagónicas In vitro con *Phytophthora cinnamomi* y *Trichoderma* spp. de cepario, aislada y comercial.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Aguacate

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana*

El aguacate es un frutal originario de México y centro América. En el Ecuador es un frutal de importancia de cultivo en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay y Loja (Ponce et al., 2013).

El árbol de aguacate es de hoja perenne y en sus zonas de origen alcanza alturas desde 10-15m (raza Mejicana) a 30m (Guatemalteca y Antillana) aunque en

plantaciones comerciales generalmente se intenta mantener a una altura de unos 7 metros para facilitar su manejo y recolección (Alcaraz, 2009).

El sistema radicular no es muy profundo y no se extiende más allá de la zona que cubre el follaje, aunque también se observan raíces de anclaje que penetran en el suelo hasta 3-4 metros de profundidad (Alcaraz, 2009).

Los mejores suelos para su cultivo son los de textura media, suelos francos arcillo arenosos, profundos (0.80 a 1.50 metros), con buen drenaje interno y superficial, con 3 a 5% de materia orgánica. No es aconsejable plantar árboles en suelos salinos, arcillosos o con capas duras que impidan el buen desarrollo radicular (Alcaraz, 2009).

Según Hernández, 2015 su fruto cada día tiene mayor aceptación debido a su valor nutritivo, alto rendimiento y la capacidad de ofertarlo durante todo el año a diferencia de otros países productores en los cuales se realiza por temporadas.

El cultivo de aguacate está expuesto a ciertos factores que limitan su producción de los que se debe tomar en cuenta: nutrientes, tipo de suelo, ataque de plagas y enfermedades (Toapanta, 2013).

Según Erwin y Ribeiro (1996), citados en Toapanta (2013), una de las enfermedades de importancia que afecta el cultivo de aguacate es la “Tristeza del aguacatero o Pudrición Radicular”, que es reconocida como la principal enfermedad que afecta árboles de aguacate y que es un factor limitante en su producción.

1.4.2 Tristeza del Aguacatero

La “Tristeza del Aguacatero”, también conocida como “Muerte descendente” o “Pudrición radicular”, es una enfermedad que ataca a árboles de diferentes edades se caracteriza por un progresivo decaimiento que eventualmente conduce a la muerte del árbol severamente atacado.

La principal causa para que se desarrolle esta enfermedad, son suelos con mal drenaje. El exceso de agua en el suelo reduce la cantidad de oxígeno de un óptimo 30% a un 17%, lo que lleva a un desequilibrio hormonal de las plantas aumentando

la cantidad de etileno (Ferreyra et al., 2011). Su acumulación produce daños al sistema radical de la planta. Estos dos factores facilitan la acción *P.cinnamomi* ya que el exceso de agua proporciona un medio adecuado para la producción de esporas móviles que se difunden hacia la raíz del aguacate y las lesiones que sufren por la acumulación de etileno facilita la infección del fitopatógeno (Stolzy et al., 1967).

Los síntomas en el árbol de aguacate son: inicialmente se presenta una defoliación parcial, las ramas se secan y defoliación en la copa, se produce clorosis en donde el follaje de la planta produce insuficiente clorofila. También se detiene el crecimiento vegetativo y con esto la producción en calidad y cantidad. Cuando se evalúan las raíces (Figura 1) se puede evidenciar necrosis y una pudrición total o parcial de las raicillas (Toapanta, 2013).



Figura 1 Planta de aguacate con síntomas de “Tristeza del aguacatero”
Nota: A) Raíz con necrosis B) Hojas con clorosis y C) Síntomas de defoliación.

Fuente: (Sepúlveda et al., 2010).

1.4.3 *Phytophthora cinnamomi*

Phytophthora cinnamomi es el agente causante de “La tristeza del Aguacatero”. Fue descrito por primera vez en Burma, Sumatra por Rands en el año de 1922. Esta enfermedad es la de mayor importancia en cultivos de aguacate, económicamente representa un limitante para la producción a nivel mundial (Toapanta, 2013).

El fitopatógeno presenta una amplia distribución mundial ya que es un habitante natural de la mayoría de suelos, llega a atacar a más de 600 plantas de interés económico para el hombre entre las que se destacan cultivos de piña, durazno, mango, manzano, macadamia, papaya, pino, ciprés y eucalipto, entre otras (Osorio, 2009).

Clasificación Taxonómica

Según la OEPP/ EPPO (2004), *P. cinnamomi* se clasifica en:

Reino: Chromista

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. cinnamomi*

1.4.3.1 Características Morfológicas microscópicas.

Los oomycetes se caracterizan por tener hifas hialinas no septadas, sus membranas contienen lípidos, su pared celular está formada de β -glucanos y celulosa a diferencia de los hongos que su pared está constituida por quitina (Toapanta, 2013, pp. 22-25). La principal característica para identificarla de otras especies de *Phytophthora*, es el hecho de que sus hifas (Figura 2) presentan hinchazones hifales o clamidosporas de paredes delgadas, con un aspecto coraliforme (Rojas, 2004, pág. 10).

El esporangio (Figura 2) posee una forma ovoide, elipsoide, elongado, no papilado y redondeado en su base, con un tamaño de 57 μm de largo y 33 μm de ancho (Robin, Smith, & Hansen, 2012).

Las clamidosporas (Figura 2) se forman a partir de hifas, son abundantes e infectan el tejido, tienen forma globosa y se encuentran en el micelio intercaladas o en sección terminal. Su tamaño va desde 31 a 50 μm con un tamaño medio de 41 μm (Toapanta, 2013).

Los gametangios son formas sexuales, anteridio (masculino) y oogonio (femenino). Los oogonios son esféricos de 40 μm de diámetro, y los anteridios son sub-claviformes largos de 21x23x17 μm (Toapanta, 2013). *P. cinnamomi* es una especie heterotálica, pero ha habido casos de reportes en que actúa como homotálica

(Zentmyer, 1979), El apareamiento se da entre A1 y A2, tanto A1 como A2 son bisexuales y tiene la capacidad de producir oogonios (“femenino”) o anteridios (“masculino”) a partir de la diferenciación de un micelio vegetativo, sin predilección alguna por un sexo en particular (Páez et al., 2004).

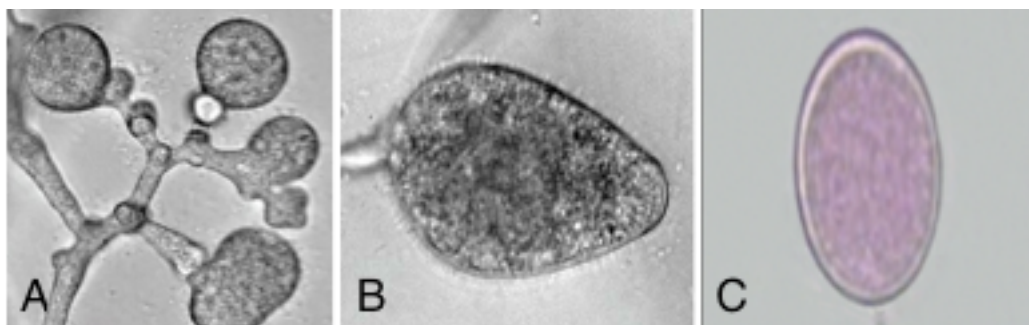


Figura 2 Morfología microscópica de *P. Cinnamomi*

Nota: A) Hinchazones hifales y crecimiento coraliforme B) Esporangio C) Clamidospora.

Fuente: (Sánchez, Sánchez y Trapero, 2010).

1.4.3.2 Características morfológicas y de crecimiento *In vitro*

La morfología de la colonia (Figura 3) en medio PDA (Potato Dextrose Agar) presenta un crecimiento micelial con patrón de tipo roceta o tipo camelia (Inge, 1993).

Este fitopatógeno suele desarrollarse mejor en condiciones de alta humedad, el micelio tiene máximo crecimiento entre los 24-27 °C, y se afectado sobre los 33 °C y por debajo de los 12°C (Toapanta, 2013).

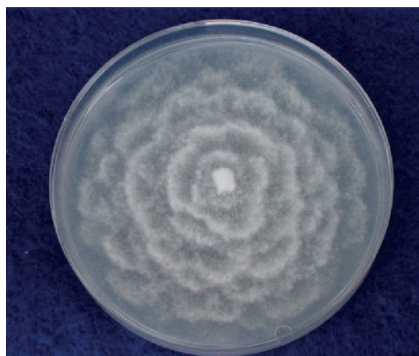


Figura 3 Crecimiento de *P. cinnamomi* en medio PDA
Fuente: (Almaraz, Alvarado y Saavedra, 2012).

1.4.3.3 Modo de infección

Según Toapanta (2013), *P. cinnamomi* se desarrolla como saprófito en el suelo cuando las condiciones no son favorables y lo puede hacer por largo periodo de tiempo, para luego, en condiciones favorables, esporular y producir un vasto número de zoosporas asexuales biflageladas, atraídas por sitios de infección, por ejemplo donde la raíz de la planta pudo haber sufrido una lesión, y en donde inicia el ataque e invaden la planta. En pocos días las hifas se ramifican a lo largo de la raíz en la planta susceptible, forman el esporangio en la superficie de la raíz y rápidamente vuelve a su ciclo de producción de zoosporas para desarrollo de la enfermedad (Figura 4).

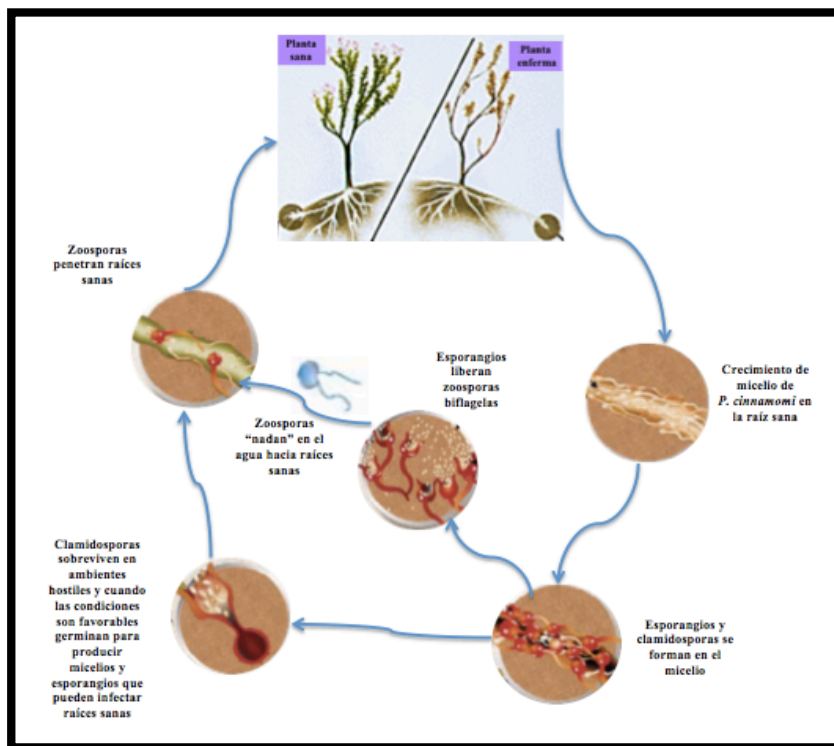


Figura 4 Ciclo de infección de *P. cinnamomi*
(Department of sustainability and environment, 2008)

1.4.4 Control Biológico

Según Baker y Cook (1965) citados en Cook (1984), se define al control biológico en el sentido mas amplio como el uso de cualquier organismo para el control de un patógeno sin incluir por supuesto al hombre.

Al abordar el caso de las plantas se conoce que interactúan con poblaciones de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias, entre otros. Estas interacciones se dan de forma beneficiosa, neutra o perjudicial. Los patógenos actúan de forma perjudicial, por el contrario existen microorganismos que lo hacen de manera positiva con la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal e inducción de resistencia frente a fitopatógenos. De forma indirecta, las plantas también se ven favorecidas cuando los microorganismos antagonizan a los fitopatógenos (Mondino, 2003).

Los antagonistas presentan diferentes modos de acción para ejercer su efecto biorregulador, que determinan su selección como agente de control biológico. Desde los primeros estudios, hasta el presente acerca del control biológico, entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas, se encuentra el género *Trichoderma* debido a su plasticidad ecológica, capacidad reproductiva, efecto estimulante sobre cultivos y su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos (Infante et al., 2009).

1.4.5 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* fue descrito hace doscientos años y son de los hongos más difundidos en la naturaleza, tiene una amplia gama de hábitat y se lo encuentra en ecosistemas que van desde la tundra hasta los trópicos (Felix, Ferreira y Miller, 2014).

Según Gumedo et al., 2009 , *Trichoderma* spp. se clasifica en:

Reino: Myceteae

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Euascomycetes

Orden: Hyphocreales

Familia: Hypocraceae

Género: *Trichoderma* e *Hypocrea*

Estos miembros de los ascomicetos son los hongos saprófitos y biotróficos, comúnmente aislados. Se los encuentra con frecuencia en la madera muerta y la corteza, en el suelo y rizosfera (Nascimento, Stecca y Neves, 2014).

Se conoce que producen una amplia gama de sustancias antibióticas para parasitar otros hongos, compite con varios microorganismos por los exudados de semillas que estimulan germinación de propágulos en hongos fitopatógenos de suelo. Inhiben y degradan pectinasas y enzimas que son esenciales en los fitopatógenos para penetrar superficies de hojas. Lo más común es su competencia con microorganismos del

suelo por nutrientes y espacio. Por este potencial antagonista es que *Trichoderma* es una alternativa al control químico contra un amplio número de patógenos fúngicos de plantas.

Según Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), *Trichoderma* produce metabolitos secundarios, que pueden inhibir el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*. En otro estudio Chamberts y Scott (1995) en experimentos In vitro se encontró que *Trichoderma* inhibía el crecimiento de *Phytophthora*, además prevenía lesiones en brotes del Castaño.

1.4.5.1 Características morfológicas microscópicas

Los conidióforos (Figura 5) son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, no verticilados, y pueden ser solitarios o en grupo (Chavez, 2006).

Las fiálides (Figura 5) tienen forma de botella, son hinchadas en la región central, pero delgadas hacia el ápice, son hialinas y con ángulo recto respecto a los conidióforos (Chavez, 2006).

Las conidias (Figura 5) son células unicelulares, subglobosas u oblongas, hialinas o verdes, lisas o equinuladas y se encuentran en masa en los ápices de las fiálides. Estos de importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies (Chavez, 2006).

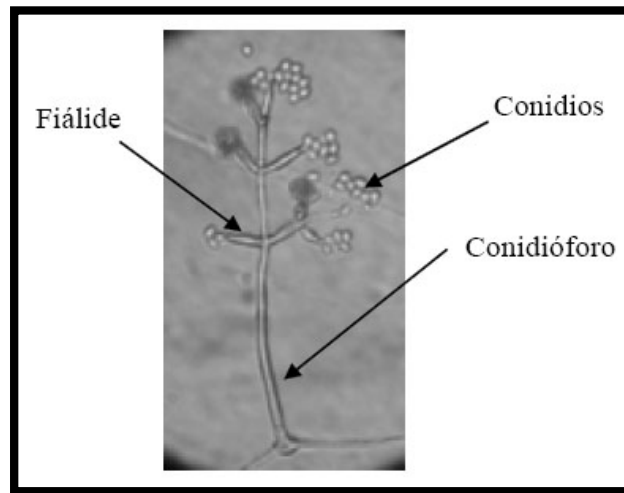


Figura 5 *Trichoderma* spp. : Conidios, fiálides y conidióforo (400x)
Fuente: (Martínez et al., 2009).

1.4.5.2 Crecimiento en cultivo In vitro

La mayoría de colonias de *Trichoderma spp* en su inicio tiene un color blanco, luego toma un color verde oscuro o amarillento debido a una densa esporulación. En agar PDA presenta un crecimiento rápido de cinco días a 25 °C. La colonias son de aspecto algodonoso que se compactan con el tiempo. Si su desarrollo se alterna con periodos de luz y oscuridad, se tienen zonas de crecimiento con respecto a cada periodo. En ausencia de luz, el micelio es de color blanco algodonoso y en presencia de luz se tiene esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica. En el reverso de la caja generalmente se observa un color pálido y en ocasiones pigmentación amarillenta (Sánchez, 2009).

1.4.5.3 Mecanismo de acción antagonista de *Trichoderma spp.*

Varios modos de acción son los que usa *Trichoderma spp.* para la supresión de patógenos en plantas. Incluyen producción de antibióticos (antibiosis), competencia

por nutrientes, estimulación de mecanismos de defensa en la planta, producción de enzimas degradadoras de pared celular (Parasitismo) y posibles combinaciones de estos mecanismos de acción (Chavez, 2006).

La antibiosis se da sin el contacto físico alguno de *Trichoderma* spp. con otros microorganismos. La antibiosis ocurre cuando hay una interacción de los compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, además que *Trichoderma* spp. produce metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de microorganismos antagonizados, entre estos metabolitos encontramos, ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaiboles, antibióticos, 6- penthyl alfa pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido heptédico. Se cree que existen moléculas que aún no han sido descritas (Martínez et al., 2009).

La competencia se define como el comportamiento igual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando el uso de este por uno de los organismos, reduzca la disponibilidad de espacio para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como su velocidad de crecimiento y desarrollo, plasticidad ecológica, y por otro lado por factores externos, como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad entre otros (Martínez et al., 2009).

Trichoderma spp. posee la característica de plasticidad ecológica por su capacidad de crecimiento en diferentes suelos en forma natural, además de ser un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, debido a su alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación, y amplia gama de sustratos en los que puede crecer (Martínez et al., 2009).

El Micoparasitismo es el ataque directo de un hongo a otro, proceso complejo que involucra eventos secuenciales: reconocimiento, ataque, penetración subsecuente y muerte del huésped (Chavez, 2006).

Trichoderma durante el proceso de parasitismo crece quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhiere a las hifas del mismo, se enrollan frecuentemente en ellas y en ocasiones las penetran (Martínez et al., 2009).

La capacidad de inducir resistencia en una amplia variedad de plantas a un rango de enfermedades causadas por varias clases de patógenos, parece ser característica de

este género, de hecho hay evidencia de existencia de resistencia sistémica, ya que el control de la enfermedad ocurre en sitios distantes a la ubicación de la *Trichoderma* spp. Existen tres compuestos producidos por *Trichoderma* spp. que inducen resistencia en la planta: 1) Proteínas con funciones enzimáticas, 2) homólogos de proteínas codificadas para avilurencia, y 3) Oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular (Chavez, 2006).

1.5 Hipótesis de la Investigación

El oomycete *P. cinnamomi* causante de la pudrición de raíz de aguacate es controlado In vitro, mediante antagonismo por *Trichoderma* spp.

2 CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El proyecto de tesis fue desarrollado por Nelson Gabriel Carrera Mena, con la colaboración de Alma Koch M.Sc, en calidad de Directora.

2.2 Zona de estudio

Los estudios se realizaron en campo y laboratorio:

2.2.1 Fase de campo

Los muestreos se llevaron a cabo en plantaciones de aguacate en el sector de Pueblo Nuevo, parroquia Monteolivo, Cantón Bolívar, Provincia del Carchi con las coordenadas Latitud: 0.4 y Longitud: -77.8833.

2.2.2 Fase de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, ubicado en Sangolquí en la Av. El Progreso s/n, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador.

2.3 Periodo de Investigación

El proyecto contempló los meses desde Septiembre 2015 hasta Marzo del 2016, con una duración de siete meses.

2.4 Aislamiento e identificación de *Phytophthora cinnamomi*.

2.4.1 Muestreo de raíces infectadas

De una parcela de árboles de aguacate de 5x5 árboles, con edades entre 5 a 10 años, que presentaban los siguientes síntomas de la enfermedad “Tristeza del Aguacatero”, amarillamiento de hojas, defoliación en la copa de arboles, se tomó muestras de árboles ubicados en las esquinas de la parcela y de un árbol ubicado en el centro. Las muestras fueron obtenidas de las raíces secundarias, en los cuatro puntos cardinales de cada árbol. Se usó una pala para cavar 30 cm, y se prosiguió a tomar las muestras de raíces secundarias, las cuales fueron puestas en envases plásticos estériles y llevados al laboratorio.

2.4.2 Aislamiento de *Phytophthora cinnamomi*.

Se realizó el aislamiento dentro de una cámara de flujo laminar marca ESCO modelo AC2-4S2, se tomaron partes del margen de la lesión en la raíz, se lavó con agua destilada, secuencialmente con una desinfección superficial con cloro por un

minuto, agua destilada por un minuto, alcohol al 70% por un minuto y finalmente se lavó con agua destilada por un minuto.



Figura 6 “Tristeza del Aguacatero”

Nota: Izquierda, síntomas de “Tristeza del Aguacatero” en la planta de aguacate. Derecha, tipo de raíces que se tomaron para el muestreo con cierto grado de afectación por la enfermedad.

Se secó la muestra con papel filtro esterilizado. Con el bisturí flameado, se tomaron pequeñas porciones del margen de la lesión y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo selectivo para *Phytophthora* spp. (Masago et al., 1976). Se usó medio PDA (Papa dextrosa agar) al 1% suplementado con los antifúngicos: Benomyl (50%) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Nistatina (2000 U/mg) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y PCNB (Pentacloronitrobenzeno) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, además contiene los siguientes antibióticos Estreptomina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Ampicilina 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por último se añade el uso de Hymexazol 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para inhibir el crecimiento del género *Pythium* e incubó a temperatura del ambiente del laboratorio, 22-28°C (Anexo 1), temperatura mínima y máxima respectivamente.

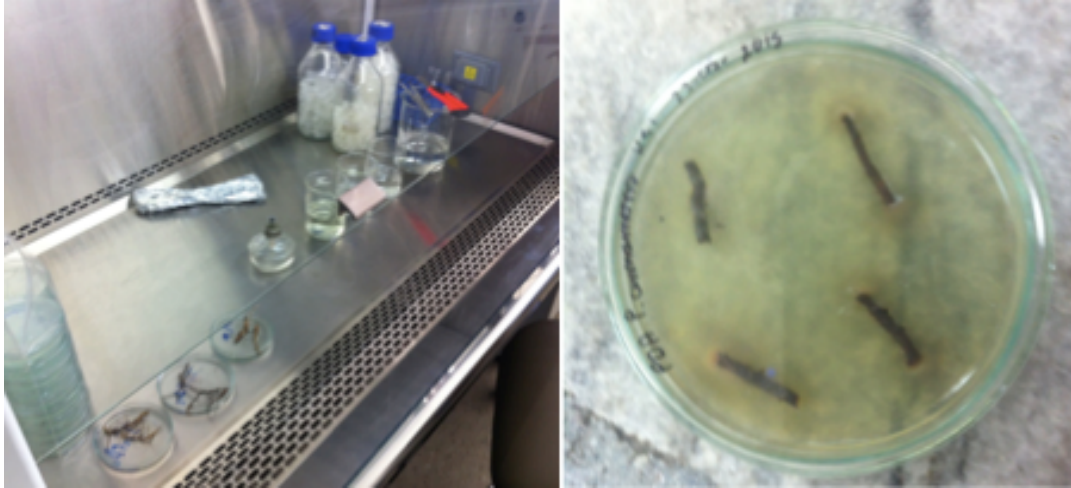


Figura 7 Aislamiento de *P.cinnamomi*

Nota: Desinfección superficial de raíces de aguacate (derecha). Siembra de raíces de aguacate en medio selectivo para *Phytophthora* (izquierda).

2.4.3 Caracterización macroscópica de *Phytophthora cinnamomi* en medio de cultivo en caja Petri.

Se evaluó el diámetro de crecimiento diario de los aislados en medio de cultivo PDA. Se describieron características referidas a velocidad de crecimiento del micelio, color de la colonia aislada, forma y textura de la colonia. Para esto se realizaron cinco repeticiones del cultivo del fitopatógeno y se mantuvieron a temperatura del laboratorio. La mediciones de crecimiento se las realizó mediante el escaneo de cada caja sembrada con el fitopatógeno y los radios medidos con la ayuda del programa Image J versión 1.49. Mediante observación visual, se definió el color de la colonia, su forma y textura en base a lo especificado por Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO, 2004).

2.4.4 Caracterización morfológica de *Phytophthora cinnamomi*

Para efecto de la identificación morfológica, se sembró *P. cinnamomi* en medio PDA para observar hinchazones hifales y crecimiento coraliforme. Al cabo de tres días del cultivo, se tomó con cinta scotch una muestra del oomicete, y se colocó en portaobjetos que contenía una gota de azul de lactofenol y se procedió a observar en un microscopio marca Olympus CH2.

Para la observación de esporangio y clamidosporas se preparó medio agar- jugo V8 según Villegas y Castaño, 2001 compuesto de Jugo V8 200 mL/L, CaCO₃ 3 g/L, Agar 15 g/L. Para el caso del medio agar-jugo V8 se esterilizaron cajas Petri, con portaobjetos en su interior. En una cámara de flujo, se vertió 300 µL del medio sobre el portaobjetos y una vez solidificado, se sembró *P. cinnamomi*. Se dejó crecer el oomicete durante tres días, después se inundó con 20 mL de agua destilada estéril y se dejó en presencia de luz por 10 d, para proceder a la observación en un microscopio Olympus modelo CX-21 y a la medición con un ocular micrométrico M-303 WF-10X/20 mm, que se reemplaza a un ocular común en el microscopio.

Para la caracterización morfológica, se tomó en cuenta los criterios descritos por Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO, 2004).

2.4.5 Identificación Molecular de *Phytophthora cinnamomi*

2.4.5.1 Extracción de DNA

Se sembró a *P. cinnamomi* en medio PDB (Caldo Papa Dextrosa), durante dos semanas a temperatura ambiente. A continuación con una bomba al vacío WELCH modelo 2545 B-01, se extrajo el medio de cultivo, hasta tener una cantidad mínima de humedad, se procedió a pesar veinte miligramos de la muestra y se siguió

el método propuesto por (Weising et al., 1994) con ciertas modificaciones. Se colocó la muestra en un tubo eppendorf de 2 mL y se añadió 1 mL de tampón de extracción (Anexo 2), se la maceró por 10 min, a continuación se agregó 0,5 mL de cloroformo: isoamil alcohol (24:1 v/v), nuevamente se maceró ligeramente por 2 min y se incubaron los tubos con muestra a 55°C durante 30 min a 300 rpm en un termobloque con agitación marca ESCO modelo PROVOCELL. Se dejó los tubos con muestra a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 2 mL nuevo, tratando de evitar el contacto con la interfase, se añadió un volumen (1:1 v/v) de isopropanol, y se puso en el congelador a -20°C durante 17 h. Se centrifugó por 10 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%. Se secó el pellet por 25 min dentro de la cámara de flujo, se disolvió en 500 µL en tampón de resuspensión (Anexo 3), con 2 µL de RNAsa y se dejó actuar durante 30 min. Finalmente se midió la concentración de DNA con un nanodrop marca Thermo Scientific, modelo 8000 y se disolvió con agua ultra pura a una concentración 25 ng/µL. Luego se procedió a guardar en el congelador a - 20°C.

2.4.5.2 Amplificación de DNA

Se amplificó el gen LPV, que según Kong, Hong y Richardson (2003), codifica proteínas de almacenamiento putativo en grandes vesículas periféricas en zoosporas de *P. cinnamomi*. Se usó la técnica PCR con los cebadores Forward LPV2F: 5' GTCCAAACCGACTCTTGCTCGATG 3', reverse LPV2R: 5' ACTGGGTCGA CAACGACTGCTTG 3', que son cebadores específicos para *P.cinnamomi* (Kong, Hong y Richardson, 2003). Para realizar la técnica, se usó GoTaq Green Master Mix de marca Promega, y se tomó en cuenta el inserto para establecer las condiciones del master mix a usarse en la PCR (Anexo 4).

Para la PCR se utilizó un termociclador marca Labnet modelo Multigene-g con las condiciones recomendadas por Kong, Hong y Richardson (2003), programada con una denaturación inicial de 96°C por 2 min, seguida de 39 ciclos: 94°C por 30 s,

65°C por 45 s, 72°C por 1 min y una extensión final 72°C por 10 min. Finalmente se bajó la temperatura a 4°C por 10 min antes de llevar los tubos al congelador para su previo uso para electroforesis.

2.4.5.3 Electroforesis

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2%, para la preparación del gel y el corrimiento se usó el tampón tris-acetato-edta (TAE) 1X (Anexo 5), se tomó una alícuota de 5 µL del producto de PCR y se corrió a 100 voltios durante 30 minutos. El gel se tiñó con SYBRsafe para la visualización bajo un transiluminador UV marca UVP modelo W/TFM-20. Se usó 5 µL de un marcador molecular de 3000 pb para verificar el tamaño del amplicon luego de la electroforesis.

2.4.5.4 Secuenciación de DNA

La secuenciación fue realizada por la empresa Macrogen Inc. en Corea del Sur. Se envió 15 µL del producto de PCR en tubos PCR de 0,5 mL , con DNA que fue sometido a secuenciación Sanger y los resultados obtenidos fueron recibidos por vía electrónica. Los resultados fueron sometidos a análisis bioinformático, se realizó el alineamiento y ensamblaje de la secuencias con ayuda del software Geneious, se comparó el cóntigo, utilizando el algoritmo BlastN para realizar alineamiento con secuencias de DNA que usa la base de datos del NCBI.

2.5 Postulados de Koch

Se realizó la prueba de patogenicidad para cumplir con los postulados de Koch, se inocularon plantas de *Persea americana* (Aguacate), por el método de inoculación de raíz propuesto por (Díaz et al, 2005).

Para preparar el inóculo se usaron semillas de cebada, colocadas en matraces de 250 mL (145 g de semilla por matraz). Se cubrió la semilla completamente con una solución de agua con 0,2% de agar, se procedió a esterilizarlas con medio, en un autoclave a 121°C durante 15 min a 1.2 kg/cm² de presión. Se tomaron cultivos de *P. cinnamomi* de 5 d de crecimiento y dos meses en congelación a -4°C con saca bocados se obtuvieron discos con propágulos de micelio para colocarlos en las semillas con medio dentro de la cámara de flujo. Se incubó a 27°C durante tres semanas, hasta cuando la semilla estuvo cubierta por el oomycete.

Se procedió a pesar 25 g del inóculo con oomycete por planta. En el invernadero se tuvieron tres plantas sanas de seis meses de edad de las cuales una se usó una como control y las otras dos se usaron para evaluar la infección con el fitopatógeno. A las tres plantas se les retiró 5 cm de tierra por debajo de la base del tallo, donde estuviera expuesta la raíz y se colocó en dos de ellas 25 g del inóculo, y la planta control fue inoculada con 25 g de semilla de cebada estéril sin el fitopatógeno. Las plantas fueron regadas dos veces por semana y fueron evaluadas cada semana, durante tres meses.

Luego de este tiempo se intentó realizar un aislamiento del fitopatógeno usando el medio de cultivo para *Phytophthora*.

2.6 Conservación de *P. cinnamomi*.

Para el almacenamiento con glicerol, se usaron cultivos en PDA del fitopatógeno de 10 d de crecimiento. Se esterilizó agua destilada y glicerol al 1% a una temperatura de 121°C y 1 atm por 15 min. Dentro de la cámara de flujo laminar se

procedió a colocar 0,5 mL de medio PDA en tubos eppendorf, de 2 mL y se dejó solidificar el medio. Con la ayuda de un sacabocados de 4 mm de diámetro, se colocaron discos de micelio del cultivo de 10 d en los tubos, con la adición de 0,5 mL de glicerol, se los guardó a -4 °C por una semana, para luego ser guardados en el ultracongelador a -80 °C.

Para el almacenamiento en agua destilada estéril, se usó cultivos del fitopatógeno en medio PDB. Dentro de la cámara de flujo laminar se colocó 5 mL de agua destilada estéril en tubos eppendorf de 10 mL, luego se tomó 1 g de micelio del fitopatógeno, se colocó en el tubo eppendorf y se almacenó a -4°C.

2.7 Aislamiento de cepa nativa de *Trichoderma* spp.

2.7.1 Toma de muestra

De una parcela de árboles sanos de aguacate de 5x3 árboles, se tomaron muestras de tierra de los árboles ubicados en las esquinas de la parcela y de un árbol ubicado en el centro de esta, de aproximadamente 80 cm³ a una profundidad de 10 a 20 cm, en frascos de plástico estériles.

2.7.2 Aislamiento de *Trichoderma* nativa de cultivos de Aguacate

Para el aislamiento se siguió el protocolo descrito por Moya et al. (2014). Se usó medio de cultivo PDA, autoclavado a 121 °C durante 15 min a 1.2 kg/cm² de presión. Se dejó enfriar el medio hasta 50 °C y se adicionó estreptomycin 200 mg/L y se procedió a dispensar en cajas Petri estériles.

De las muestras de suelo se preparó una dilución madre, para esto se colocó 10 g de muestra en 90 mL de agua destilada estéril, y se agitó el frasco con muestra durante 20 min. De la dilución madre se preparó diluciones seriadas de 10^{-2} y 10^{-3} . De esta última se tomaron 0,1 mL y se distribuyó en la superficie del medio usando un triángulo de vidrio. Se incubó a temperatura del laboratorio por cinco días y por último se realizaron sub-cultivos hasta tener al hongo aislado.

2.8 Aislamiento de cepa *Trichoderma* spp. del producto comercial.

Para el aislamiento de *Trichoderma* a partir del producto comercial, se tomó 0,1 g del producto y se lo disolvió en 9 mL de agua destilada estéril, se agitó por 10 min. Se distribuyó 0,1 mL en la superficie de un medio de PDA y el antibiótico estreptomicina 200 mg/L. Se dejó a temperatura del laboratorio por cinco días y se realizaron sub-cultivos hasta tener al hongo aislado.

2.9 Caracterización macroscópica de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo en cajas Petri

Se evaluó el diámetro de crecimiento diario de los aislados en medio de cultivo PDA. Se describieron características macroscópicas referidas a velocidad de crecimiento del micelio, color de la colonia aislada, forma y textura de la colonia. Se realizaron tres repeticiones de la *Trichoderma* y se mantuvieron a temperatura del laboratorio. Las mediciones de crecimiento se las realizó mediante el escaneo de cada caja sembrada con el antagonista y los radios medidos con la ayuda del programa Image J versión 1.49. Mediante observación visual se definió el color de la colonia y su forma y textura en base a lo especificado por Samuels (1996).

2.10 Caracterización Morfológica de *Trichoderma* spp.

Para efecto de una identificación morfológica de la *Trichoderma* aislada y nativa se tomaron en cuenta las claves de Bisset (1991). Se esterilizaron cajas Petri, con porta objetos en su interior. Dentro de una cámara de flujo, se vertió 300 μ L de el medio PDA sobre el porta objetos y sobre este una vez que se solidificó se sembró *Trichoderma*, se dejó crecer el hongo durante tres días y se observó bajo el microscopio.

2.11 Conservación de cepas de *Trichoderma*

Se usaron cultivos de 5 d de siembra, transcurrido este tiempo se procedió a conservarlos. Se esterilizó agua destilada y glicerol al 1% a una temperatura de 121°C y 1 atm por 15 min, dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a colocar 0,5 mL de medio PDA en tubos eppendorf de 2 mL y se dejó solidificar el medio. Con la ayuda de un sacabocados de 4 mm de diámetro se colocaron discos de micelio en el medio y 0,5 mL de glicerol y se los guardo a -4°C por una semana, para luego ser guardados en el ultracongelador a - 80°C.

2.12 Pruebas de Antagonismo In vitro de *Trichoderma* spp. frente a *P. cinnamomi*.

Para determinar la capacidad antagónica de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *P. cinnamomi* se aplicó un diseño completamente al azar.

Para las pruebas de antagonismo, se empleó la técnica de cultivo dual. Se tomó con un sacabocados discos de 0,4 cm de diámetro de cultivos de 5 d de incubación de *P. cinnamomi* y se sembró en la superficie de cajas Petri, a un centímetro del borde de la caja. Una vez que el crecimiento de *P. cinnamomi* alcanzó 30 mm de diámetro,

se realizó la siembra de *Trichoderma* spp. se tomó con sacabocados un disco de 0,4 cm de diámetro de un cultivo del antagonista de 4 d de incubación, y se sembró a 50 mm de separación de *P. cinnamomi*, se incubó a temperatura del laboratorio y se realizó mediciones cada 24 h. Para las mediciones se escaneron las cajas Petri del experimento y se usó el programa Image J versión 1.49 para obtener las medidas de los radios de crecimiento. Para el análisis estadístico se tomó en cuenta los valores del quinto día luego de la siembra del antagonista (Tovar, 2008).

Los antagonistas usados fueron *Trichoderma* aislada de un cultivo de aguacate propio del sector de Monteolivo, una *Trichoderma* comercial, y dos tipos de *Trichoderma* proporcionadas del cepario del IASA 1 de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

La capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. se analizó de tres formas: 1. Se midió el grado de Micoparasitismo de los antagonistas (Tabla 1), el cuál se determinó en base a la escala que propone Suárez et al. (2008) citado en Ezziyyani et al. (2004), y se complementó con la observación en un microscopio binocular la existencia o no de interacción de las hifas del fitopatógeno con el antagonista.

Tabla 1 Escala para la evaluación de la 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 la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella. |

Fuente: (Suárez et al., 2008)

2. Se evaluó la competencia por espacio y nutrientes, se comparó los radios de crecimiento del patógeno (RCP) y el radio de crecimiento del antagonista (RCA) en cultivo dual y en cultivo individual (testigos).

3. Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con la fórmula que propone Ezziyyani et al., 2004. Para $PICR = ((R1 - R2)/R1) \times 100$,

donde R1 es el radio mayor (radio de crecimiento del patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio de crecimiento del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

2.13 Análisis estadístico de Datos

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple y una prueba de comparación de promedios Duncan para $p < 0.05$, con el paquete estadístico InfoStat, bajo un diseño completamente al azar donde. Se tomó en cuenta como unidad experimental una caja Petri con agar PDA, en la que sembró en cultivo dual *P. cinnamomi* y el antagonista y también se tuvo los controles de los mismos.

Se realizaron cinco repeticiones de nueve tratamientos, de los cuales cinco pertenecieron a cultivos duales, uno al testigo del patógeno, cuatro a testigos de los antagonistas. Se establecieron tres replicaciones del experimento, como sigue.

T1: *Trichoderma* spp. comercial vs *P. cinnamomi*

T2: *Trichoderma* spp. nativa vs *P. cinnamomi*.

T3: *Trichoderma viride* (cepario) vs *P. cinnamomi* .

T4: *Trichoderma harzianum* (cepario) vs *P. cinnamomi*

T5: *P. cinnamomi* (testigo).

T6: *Trichoderma* spp. comercial (testigo).

T7: *Trichoderma* spp. nativa (testigo).

T8: *Trichoderma viride* (testigo).

T9: *Trichoderma harzianum* (testigo).

Las variables que se midieron fueron: radio de crecimiento del antagonista (RCA), radio de crecimiento del patógeno (RCP), micoparasitismo y Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). Los factores estudiados fueron: factor patógeno por *P. cinnamomi*, factor antagonista por *Trichoderma* spp. nativa, *Trichoderma* spp. comercial, *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum*.

3 CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación macroscópica y morfológica de *P. cinnamomi*.

Se obtuvo el aislamiento de *P. cinnamomi* procedente de cultivos de aguacate que presentaban los síntomas en la planta Figura 8. Entre las características macroscópicas en la siembra en medio PDA se puede evidenciar un crecimiento con patrón similar a una camelia, de color blanquecino.

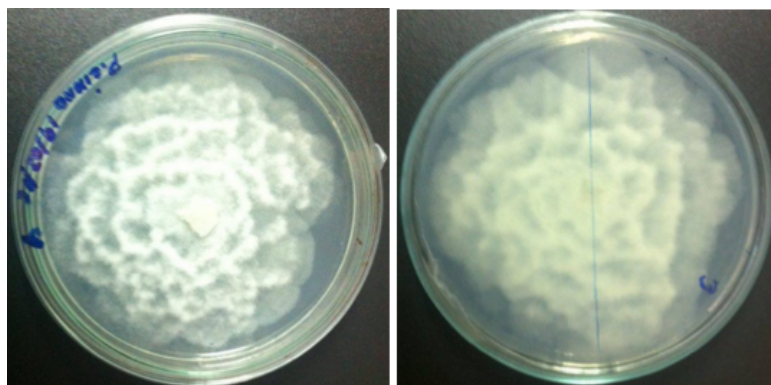


Figura 8 Aislado de *P. cinnamomi*

Nota: Derecha Vista superior de la siembra Izquierda. Vista posterior de la siembra.

Mediante microscopio (Figura 9), se pudo observar hifas hialinas en forma coraliforme, además de presencia de hinchazones hifales, de esporangio inmaduro y de clamidospora. La mediciones obtenidas para el esporangio inmaduro fueron de $65 \times 37,58 \mu\text{m}$ (largo x ancho), y para la clamidospora fue de $31 \mu\text{m}$. No se vieron estructuras sexuales. La temperatura a la cual creció el oomycete fue en un rango de $22-28 \text{ }^\circ\text{C}$.

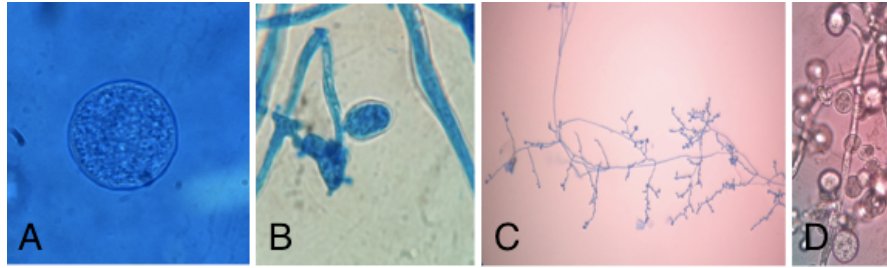


Figura 9 Aislado de *P. cinnamomi* vista al microscópio

Nota: A) Clamidospora (100x) B) Esporangio inmaduro (40x) C) Crecimiento coraliforme (10x) D) Hinchazones hifales y carencia de septos (100x).

La velocidad de crecimiento micelial de *P. cinnamomi* (Figura 10) se midió durante 13 días, tiempo en el cual el fitopatógeno cubrió toda la caja. El crecimiento promedio fue de 6 mm/d.

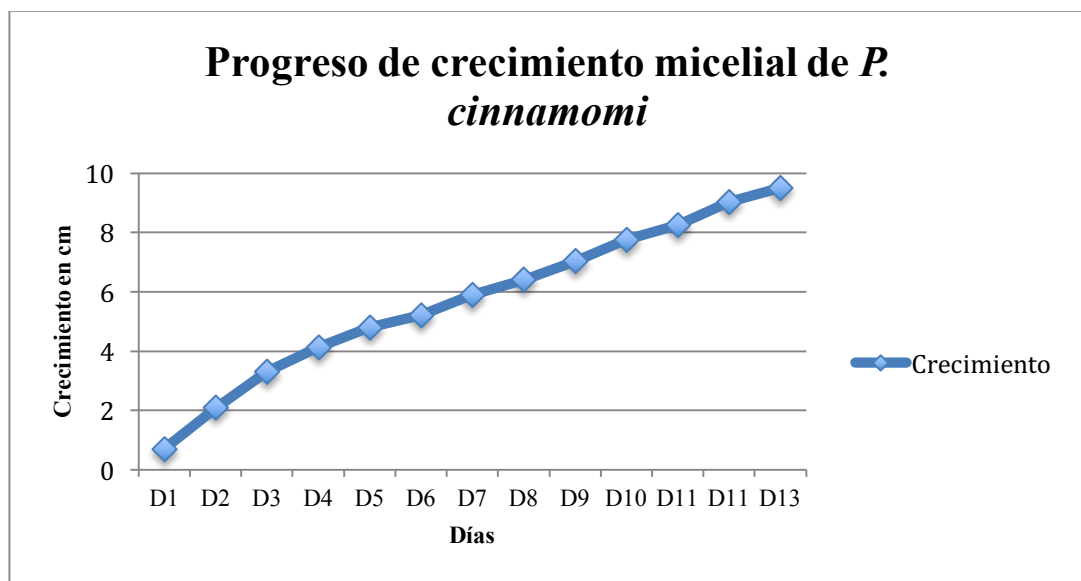


Figura 10 Progreso de crecimiento micelial de *P. cinnamomi* en medio de cultivo PDA

3.2 Identificación molecular de *P. cinnamomi*

3.2.1 Extracción de ADN

Posteriormente la cuantificación del ADN tuvo como resultado una concentración de 535,6 ng/ μ L (Anexo 6), la pureza del ácido nucleico se analizó con la relación de las medidas de los radio de absorbancia a 260 y 280 dando un valor de 2,11 valor que se encuentra cercano al valor de 1,8 comúnmente relacionado con ADN. Para finalizar la concentración de ADN se la bajo a un valor de 25 ng/ μ L antes de proseguir con la amplificación.

3.2.2 Amplificación del gen LPV y electroforesis

La amplificación con el uso de los cebadores para el gen LPV dio como resultado bandas que se encontraban entre 400 – 500 pb (Figura 11). En el gel de agarosa al 2%, usado en la electroforesis, se tuvo la siguiente distribución, en el carril uno se tiene el marcador molecular de 3000 pb, en los carriles del dos al cinco se tienen las cuatro repeticiones de amplificación del DNA del fitopatógeno y en el carril seis se tiene el control negativo en el que se uso agua, a cambio del DNA del fitopatógeno.

3.2.3 Secuenciación y Alineamiento

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación con la ayuda del programa Geneious, se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con el cebador forward LPV2F y el cebador reverse LPV2R las cuales tuvieron secuencias de una

calidad del 93,6% y 50,8% respectivamente. Una vez alineados los dos cebadores, se tuvo como resultado una secuencia consenso de 380 pb con una calidad del 95%, finalmente se realizó un alineamiento entre la secuencia obtenida y secuencias de ADN de la base de datos del NCBI con el programa BLASTn, se tuvo un puntaje de 695 bits que le da una identidad del 99% con la secuencia correspondiente a *P.cinnamomi*. del tipo A2 (Anexo 7).

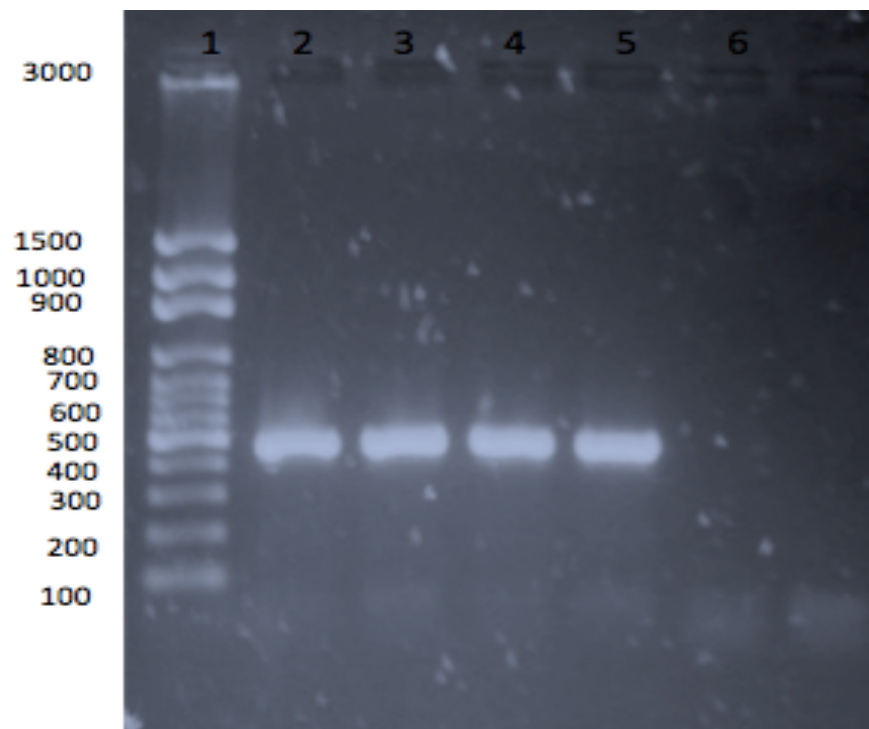


Figura 11 Electroforesis amplicon del gen LPV de *P.cinnamomi*,

Nota: Se usó gel de agarosa al 2% en el carril 1: marcador molecular, carril del 2-5: amplicon de *P. cinnamomi*, carril 6: control negativo.

3.3 Postulados de Koch

El fitopatógeno *P. cinnamomi* recuperado en medio de cultivo, no produjo síntomas en las plantas inoculadas de aguacate, por lo cual no se logró completar los postulados de Koch (Anexo 8).

3.4 Aislamiento e identificación morfológica de *Trichoderma* spp.

Se obtuvo un aislado de *Trichoderma* a partir del producto comercial, y un aislado de *Trichoderma* a partir de suelos de cultivo de aguacate de la zona de Monteolivo, provincia del Carchi. El criterio para aislar *Trichoderma* fue el color de micelio blanco (Romero et al., 2009) y su esporulación verde, típica del género (Guigón y González, 2003), que se pudo observar en los dos aislamientos realizados, estas características también estuvieron presentes en las *Trichodermas* de cepario (Figura 12).

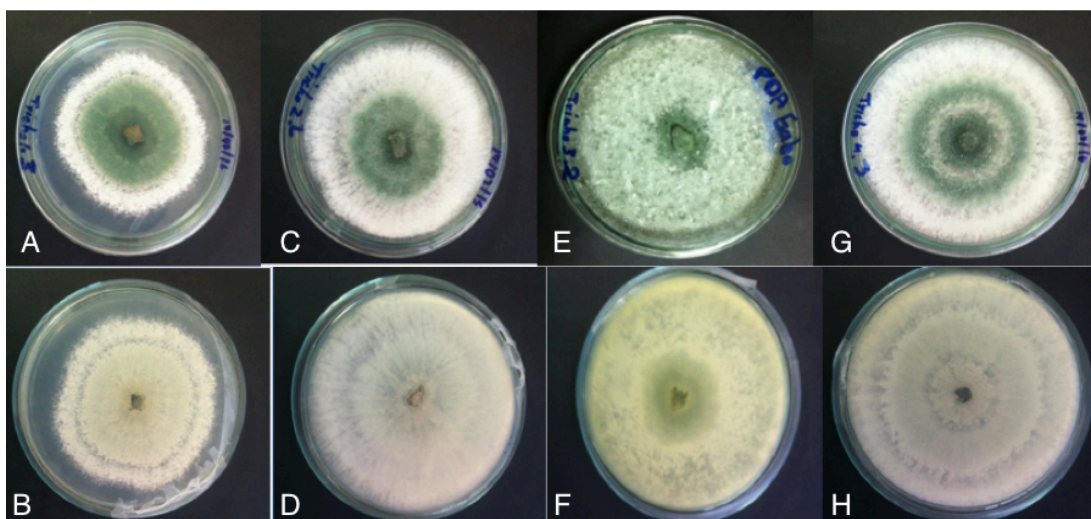


Figura 12 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Nota: *Trichoderma* comercial (A,B), *Trichoderma* nativa (C,D), *T. viride* (E,F) y *T. harzianum* (G,H) en medio PDA.

Se determinó la velocidad de crecimiento de los cuatro antagonistas como se observa en la Tabla 2, tienen rápido crecimiento y a los cuatro días ya hubo cobertura total en medio PDA para los cuatro tipos de *Trichoderma*.

T. harzianum tuvo la mayor tasa de crecimiento 4,05 cm/d, seguido de *T. viride* y *Trichoderma* nativa con 3,97 cm/d y 3,87 cm/d respectivamente y con menor tasa de crecimiento *Trichoderma* comercial 2,90 cm/d.

En sus características microscópicas se observó la presencia de conidióforos ramificados en varios niveles con ramas primarias que producen ramas secundarias

más pequeñas y fiálides constreñida en la base, con forma de botella, dispuestas en verticilio a lo largo del conidióforo (Figura 13).

Tabla 2

Promedio de crecimiento diametral (CD) de *Trichoderma* en milímetros

| Cepa | CD (cm) | CD (cm) | CD (cm) | CD (cm) | TC (cm/d) |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | |
| <i>T. comercial</i> | 0,73 b | 3,27c | 6,3 b | 9,5 a | 2,90 |
| <i>T. nativa</i> | 0,90 a | 3,57 b | 9,20 a | 9,5 a | 3,87 |
| <i>T. viride</i> | 0,97 a | 3,97 a | 9,13 a | 9,5 a | 3,93 |
| <i>T. harzianum</i> | 1,00 a | 3,97 a | 9,5 a | 9,5 a | 4,05 |

Nota: Evaluaciones realizadas a las 24,48,72 y 96 h y tasa de crecimiento (TC) micelial en mm/d. Letras diferentes entre columnas de la misma serie indican diferencias significativas para Duncan (P=0,05).

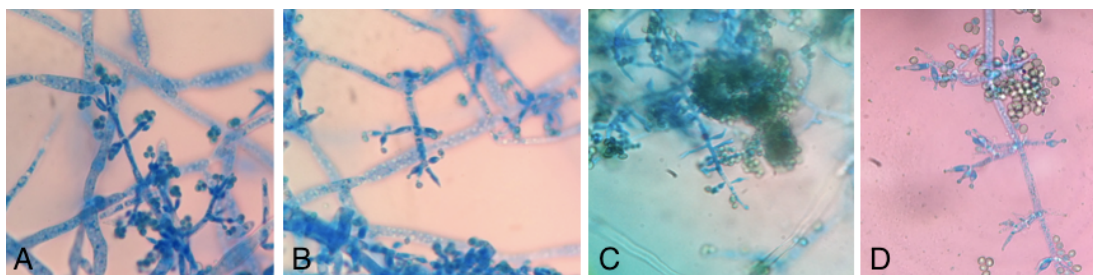


Figura 13 Observación morfológica de *Trichoderma*

Nota: Se usó lente 100x A) *Trichoderma* comercial ; B) *Trichoderma* nativa de cultivos de aguacate C) *Trichoderma viride* D) *Trichoderma harzianum*.

3.5 Pruebas de Antagonismo In vitro

3.5.1 Competencia por espacio y nutrientes

En el quinto día de evaluación (Figura 14), se evidenció que en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 todos los antagonistas tuvieron un crecimiento radial mayor a *P. cinnamomi*. De estos, *T. viride* en cultivo dual (T3) mostró el mayor crecimiento, con un radio promedio de 6,65 mm, sin que exista diferencia estadística en crecimiento, frente a su control (T8). El crecimiento de *T. harzianum* (T4), *Trichoderma* nativa (T2) y comercial (T1) en cultivo dual, tuvieron mayor crecimiento radial a *P. cinnamomi*, pero por debajo del crecimiento de sus controles con valores de 4,77 mm, 4,47 mm y 3,91 mm respectivamente. El crecimiento radial de *P. cinnamomi* en confrontación con los antagonistas (T1, T2, T3 y T4) fue estadísticamente similar, pero estos tuvieron un crecimiento menor al de su control (T5).

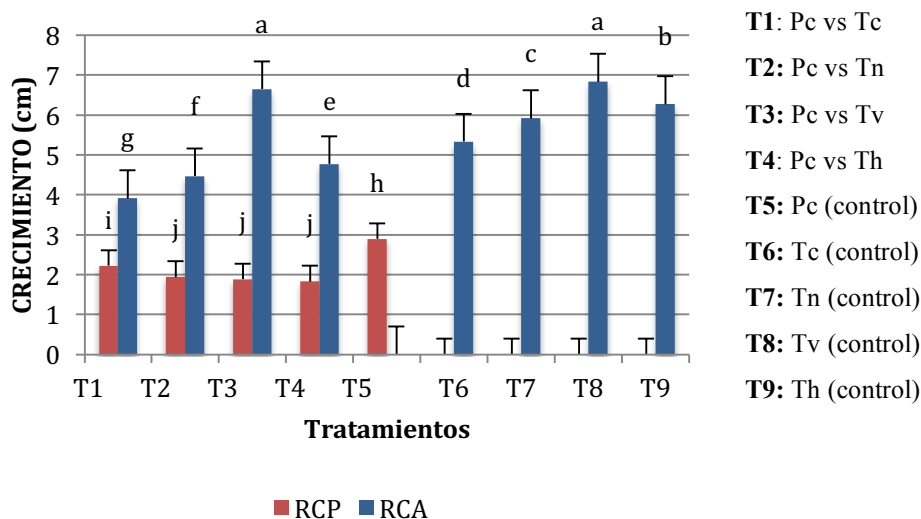


Figura 14 Crecimiento radial de *P. cinnamoni* frente a *Trichoderma* spp.

Nota: *P. cinnamoni* (Pc), *Trichoderma* comercial= Tc; *Trichoderma* nativa= Tn; *Trichoderma viride*= Tv; *Trichoderma harzianum*= Tz, a los cinco días de evaluación (Azul: radio crecimiento patógeno, Rojo: radio crecimiento antagonista). Letras diferentes entre columnas de la misma serie indican diferencias significativas para Duncan (P=0,05).

3.5.2 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Al quinto día de evaluación, se evidenció que el mejor PICR lo presentaron los tratamientos con *Trichoderma* nativa (T2), *T. viride* (T3) y *T. harzianum* (T4), con porcentajes de 33,1%, 34,88% y 36,7% respectivamente que no tienen diferencia

estadística. Con el de menor porcentaje de PICR del 23,24% para el tratamiento con *Trichoderma* comercial (T1).

3.5.3 Micoparasitismo

En la evaluación del grado de micoparistismo (Tabla 3), *Trichoderma viride* mostró un grado 3 ya que hubo invasión total de la colonia de *P. cinnamomi* sin que exista esporulación. Tanto *T. harzianum* como la *Trichoderma* nativa tuvieron grado 2 de micoparasitismo, con la invasión de la mitad de la colonia del patógeno. El menor grado lo tuvo el tratamiento con *Trichoderma* comercial, con un grado 1 con una invasión de un cuarto de la colonia del patógeno. En todos los tratamientos, se observó al microscopio la existencia del entrelazamiento de hifas del antagonista con *P. cinnamomi* (Figura 16).

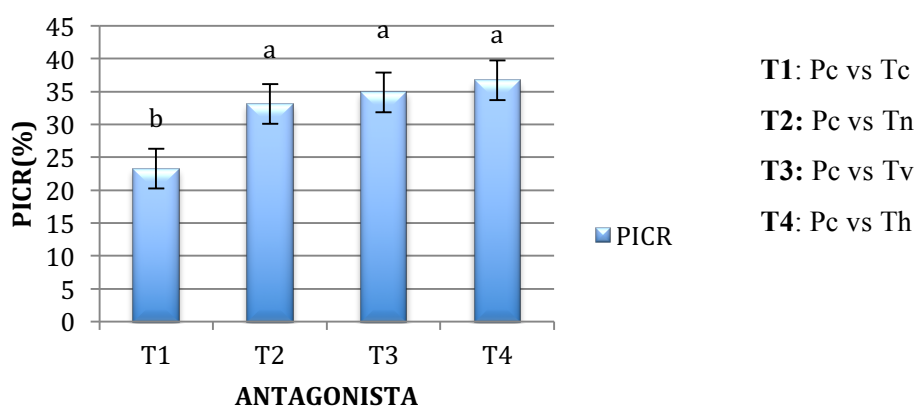


Figura 15 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *P. cinnamoni* frente a *Trichoderma* spp.

Nota: *P. cinnamoni* (Pc), *Trichoderma* comercial= Tc; *Trichoderma* nativa= Tn; *Trichoderma viride*= Tv; *Trichoderma harzianum*= Tz, en cultivos duales a los cinco días de evaluación. Letras diferentes entre columnas de la misma serie indican diferencias significativas para Duncan (P=0,05).

Tabla 3
Grado de micoparasitismo en cada uno de los tratamientos

| Tratamientos | Grado (0-4) |
|--------------|-------------|
| T1 | 1 |
| T2 | 2 |
| T3 | 3 |
| T4 | 2 |

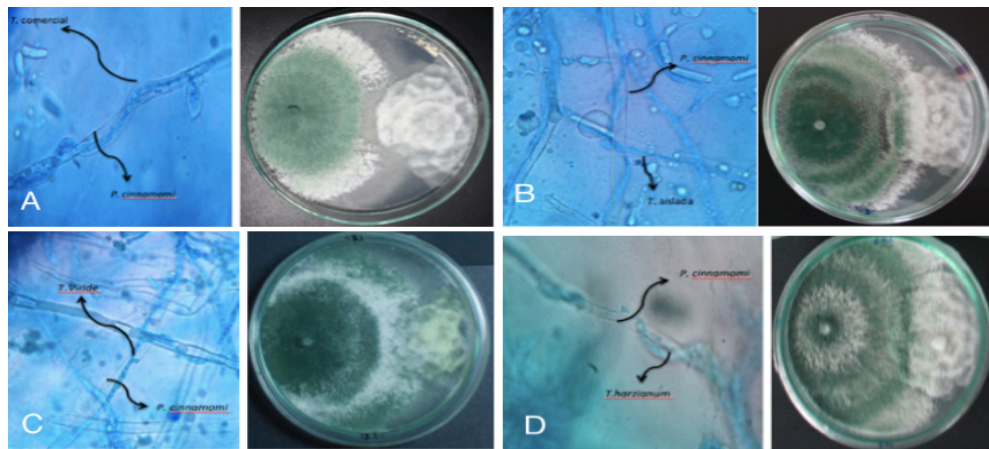


Figura 16 Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *P. cinnamomi*.

Nota: Observación en lente 100x A) Micoparasitismo de *Trichoderma* comercial B) Micoparasitismo de *Trichoderma* nativa C) Micoparasitismo de *T. viride* D) Micoparasitismo *T. harzianum*.

4 CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Las características macroscópicas presentadas por *P. cinnamomi* en medio de cultivo PDA según la Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization, (OEPP/EPPO, 2004) y Robin, Smith y Hansen (2012), presenta micelio blanco y crecimiento en forma de camelia y una velocidad de crecimiento que va de los 2-6 mm/d, características que coinciden con la *P. cinnamomi* que fue aislada en medio PDA y que tiene una velocidad de crecimiento de 6 mm/d (Figura 10) que se encuentra dentro del rango de crecimiento en este medio según los estudios citados. En cuanto las características microscópicas de la *P. cinnamomi* aislada son similares a las reportadas por Robin, Smith y Hansen (2012) que observaron crecimiento coraliforme de sus hifas y presencia de hinchazones hifales. Según Robin et al. (2012), las mediciones de estructuras de *P. cinnamomi* como la clamidospora van de 31-50 μm y para un esporangio no papilado de 75 x 40 μm a 57 μm x 33 μm (largo por ancho), se asemejan con las mediciones de 31 μm para la clamidospora y 65 x 37,58 μm del esporangio, obtenidas en el aislamiento *P. cinnamomi* hecho en laboratorio.

En la identificación molecular de *P. cinnamomi* con los cebadores del gen LPV se obtuvo un tamaño de amplicón de 400- 500 pb (Figura 11) similar al obtenido por Kong, Hong y Richardson (2003), que con los mismos cebadores obtuvieron un amplicón en el en el rango de 412- 489 pb. Se podría confirmar que se trata de *P. cinnamomi* debido a la alta especificidad y sensibilidad del método, pero se confirmó que el aislamiento pertenecía a *P. cinnamomi* una vez secuenciado el amplicón y alineamiento, con las secuencias de la base de datos del NCBI donde hubo un 99% de coincidencia con *P.cinnamomi* tipo A2.

En la infección de la planta de aguacate sana con *P. cinnamomi* para comprobación de los postulados de Koch el oomycete no expreso la patogenicidad en la planta de aguacate una de las razones según Drenth y Sendall (2001), es el uso del cultivo del patógeno que se encontraba almacenado con agua destilada estéril en refrigeración y si bien es un almacenamiento a largo plazo para el patógeno, la patogenicidad y agresividad tiende a disminuir, razón por la cual es de preferencia el

uso de nitrógeno líquido para un almacenamiento prolongado y superación de este problema.

Las características generales tanto macro como microscópicas observadas en *Trichoderma* comercial, *Trichoderma* nativa y la de cepario, son similares a las reportadas por Bisset (1991), en su estudio: A revision of the genus *Trichoderma* y por Samuels (1996), en su estudio *Trichoderma: A review of biology and systematics of the genus*, donde reportan como característica macroscópica de este género su rápido crecimiento que coincide con lo analizado para las cuatro *Trichodermas*, las cuales en cuatros días cubrieron las caja Petri con medio PDA (Tabla 2). También describen un crecimiento en un principio blanquecino que luego se torna verde debido a la presencia de conidias, que concuerda con los resultados obtenidos. En cuanto a su morfología microscópica, se tuvo similares resultados a los estudios mencionados donde se habla de un conidióforo repetidas veces ramificado, en un número indefinido de niveles, en forma dendríticas, con las ramas primarias que producen ramas secundarias más pequeñas que también pueden tener ramas, y así sucesivamente. Las fialides son ampuliformes, por lo general constreñida en la base, ensanchado cerca de la mitad. y abruptamente atenuada cerca del vértice en un cuello corto y dispuestas en verticilos terminales en las ramas de la conidioforo, o con menor frecuencia por separado o en verticilos directamente debajo de los septos a lo largo del conidioforo y sus ramas. Todas estas características pueden observarse en la Figura 13 para las cuatro *Trichodermas* usadas en el experimento.

Para las pruebas de antagonismo en las pruebas de competencia por espacio y nutrientes, los radios de crecimiento de *P. cinnamomi* fueron menores a la de los antagonistas, por una tasa de incorporación de nutrientes, un crecimiento y tasa de metabolismo mayor a *P. cinnamomi* como lo señala Suárez et al. (2008). Según Sánchez et al. (2012), se observa mecanismo de competencia por parte del género *Trichoderma* contra *P. cinnamomi*, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio del patógeno, con una diferencia significativa en relación al patógeno frente a *Trichoderma*, mismo resultado al que se llegó en el presente estudio.

T. viride fue el mejor antagonista en competencia por nutrientes contra *Phytophthora* al tener el mayor radio de crecimiento frente a *P. cinnamomi* en cultivo dual, similar resultado también lo reportó Heller y Theiler (1994), en su

estudio Antagonism of *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* and *Trichoderma viride* to four soil-borne Phytophthora specie.

Una de las formas de antagonismo de *T. harzianum* es la competencia de nutrientes y espacio, gracias a su rápido crecimiento (Fernández y Suárez, 2009). Acción que se comprueba en este estudio ya que *T. harzianum* tuvo mayor crecimiento que *P. cinnamomi* en cultivo dual a los cinco días de la evaluación y estadísticamente fue el segundo mejor tratamiento por competencia de nutrientes y espacio frente al resto de tratamientos.

Según Fernández y Suárez (2009), *Trichoderma* nativas actúan mejor que *Trichoderma* comerciales, como un control eficaz frente a fitopatógenos, estimulando la colonización de la rizosfera por la rapidez de crecimiento del hongo ya que se encuentra adaptado a las condiciones ambientales. En el caso del estudio se puede confirmar esto ya que la *Trichoderma* nativa tuvo un radio de crecimiento mayor al de la *Trichoderma* comercial.

Se obtuvo un porcentaje de inhibición crecimiento radial (PICR) de *P. cinnamomi* considerable para los tratamientos con *T. viride*, *T. harzianum* y *Trichoderma* nativa y estadísticamente mejor a *Trichoderma* comercial. Esto se da según Suárez et al. (2008) por que *Trichoderma* actúa contra patógenos inhibiendo su crecimiento con secreción de enzimas hidrolíticas como celulasas, glucanasas, xylasas, proteasas y quitinasas, implicadas en mecanismos de biocontrol, permitiendo al antagonista usar los nutrientes del medio al privar al patógeno de recursos. O por la antibiosis que producen los metabolitos volátiles y no volátiles pirones, isocianatos, pépticos, y trichocinas (Fernández y Suárez, 2009).

T. harzianum ya fue reportado por Kumar et al. (2012), con buenas capacidades como inhibidor de crecimiento micelial contra patógenos causantes de pudrición de raíces. Vinale, et al., 2009 señalan que *T. harzianum*, produce T22azaphilona, harziano-piridona y T39butenolida, metabolitos secundarios que logran inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*.

Según Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), *T. viride* produce 6PP (6-pentenil- α -pirona), compuesto que exhibe propiedades inhibitorias contra *P. cinnamomi*.

Se tuvo como resultado la existencia de micoparasitismo para todos los tratamientos para Suárez et al. (2008), ciertas especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de conducir sus hifas hacia otros hongos, al enrollarse en ellos, debido a

una reacción en las que actúan lectinas degradando la pared celular del hospedero y por acción de exoenzimas hidrolíticas, que limita el crecimiento del fitopatógeno, destacando la producción de enzimas degradadoras de pared celular como glucanasa que actúan en conjunto con proteasas y celulasas. Según Chamberts y Scott (1995) observó como fase avanzada de micoparasitismo por parte de *Trichoderma* estructuras apresorias alrededor de *P. cinnamomi*, y donde había una baja actividad de antibiosis cuando existía micoparasitismo.

5 CAPÍTULO V: CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y BIBLIOGRAFÍA

5.1 Conclusiones

Los síntomas de la enfermedad “Tristeza del aguacatero”, que presentaron los árboles de aguacate del muestreo, según la identificación molecular y secuenciación se deben al fitopatógeno *P. cinnamomi* tipo A2.

Se aisló un hongo de suelos propios de la zona de cultivo de aguacate, del género *Trichoderma* basados en sus características macroscópicas y microscópicas.

Se evidenció antagonismo In vitro por parte de las cuatro *Trichodermas* usadas en la investigación:

Estadísticamente, el tratamiento con *T. viride* tuvo el mejor antagonismo por competencia por nutrientes y espacio.

Los tratamientos con *Trichoderma* aislada, *T. viride* y *T. harzianum* tuvieron el mayor antagonismo por porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) según la estadística usada.

T. viride presenta el micoparasitismo de mayor grado al cubrir toda la superficie del patógeno.

T. viride, *T. harzianum* y *Trichoderma* nativa tienen potencial como agentes de biocontrol de la “Tristeza del aguacatero”.

5.2 Recomendaciones

Realizar mayor cantidad de aislamientos de *Trichodermas* nativas para estudios de antagonismo In vitro.

Realizar estudios mediante pruebas de invernadero y campo, que comprueben el biocontrol de los antagonistas usados en el estudio, frente al aislamiento del patógeno son necesarios.

Realizar estudios de patógenos que causen similares síntomas de la enfermedad “Tristeza del aguacatero” en las plantas de aguacate.

Realizar estudios de biocontrol mediante interacción de *Trichoderma* con otros tipos microorganismos como bacterias y actinomicetos.

Realizar pruebas cuantitativas para determinar dosis eficientes de estos antagonistas en el cultivo del aguacate, sin encarecer los costos de producción.

5.3 Bibliografía

Alcaraz, L. (2009). *Biología reproductiva del aguacate (Persea americana Mill.). implicaciones para la optimización del cuajado*. Doctorado .Universidad de Málaga.

Almaraz, A., Alvarado, D., & Saavedra, L. (2012). Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en Boque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. *RCHSFA* , 5-12.

Almaraz, A., Alvarado, D., Tlapal, B., & Espinoza, D. (2012). Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rans en bosques de encino de el Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Chapingo* , 18 (3),pp.341-355.

Baker, K., & Cook, R. (1965). *Biological control of Plant Pathogens*. San Francisco: American Phytopathological Society, p.433.

Bisset, J. (1991). A revision of genus *Trichoderma*. *Canadian Journal of Botany*,69, pp. 2357-2417

- CICO. (2009). *Perfil del Aguacate*. (en línea) Disponible en: <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/aguacate.pdf> (Recuperado el 19/ 05/ 2015).
- Cook, J. (1984). Biological Control of Plant Pathogens: Theory to Application. *Pathology* , 75 (1), pp.25-29.
- Chamberts, S., & Scott, E. (1995). In vitro Antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by Isoaltes of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium*. *Phytopathology* , 143 (8) pp.471-477.
- Chavez, M. (2006). *Producción de Trichoderma spp. y Evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. Licenciatura. Universidad Javeriana de Bogotá.
- Department of sustainability and environment. (2008). *Phytophthora cinnamomi management strategy*. Melbourne: Victoria government, p.33.
- Drenth, A., & Sendall, B. (2001). *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. Brisbane: CRC for Tropical Plant Protection, p.39.
- Díaz, L., Tovar, D., García, S., & Méndez, J. (2005). *Phytophthora cinnamomi* Rands como agente causal de la pudrición de raíz en *Pseudotsuga macrolepis* Florus en plantaciones de arboles de navidad. Chapingo: Universidad Autónoma Chapingo.
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora cinnamomi* var. *cinnamomi*. *The American Phytopathological Society* , pp.269-272.
- Ezziyyani, M., Pérez, S., Requena, M., Rubio, L., & Candela, M. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* , 26, pp.69-78.

- Felix, C., Ferreira, E., & Miller, R. (2014). *Trichoderma*: A dual function fungi and their use in the wine and beer industries. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, pp.345-350.
- Fernández, R., & Suárez, C. (2009). *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona Bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín* , pp.4743-4748.
- Ferreira, R., Sellés, G., Gil, P., & Ruiz, R. (2011). *Asfixia radicular en Huertos de Paltos: Manejo del riego y suelo*. Chile: INIA, p.56.
- Guigón, C., & González, P. (2003). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* , pp.116-124.
- Ghisalberti, E., & Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal Antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology Biochemistry* , 23 (11), pp.1011-1020.
- Gumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). El género Fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Contaminantes Ambientales* , 25(4), pp.257-269.
- Hernández, Y. (2015). *La oferta de aguacate Hass desde la provincia de Pichincha para satisfacer parte de la demanda efectiva en Colombia*. Ingeniería. Universidad Politécnica estatal del Carchi.
- Heller, W., & Theiler, R. (1994). Antagonism of *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* and *Trichoderma viride* to four soil-borne *Phytophthora* specie. *Phytopathology* , 141(4), pp.390-394.

- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección vegetal* , 24 (1), pp.14-21.
- Inge, K. (1993). *Metodología para la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad "Tristeza del Palto" aislamiento identificación y patogenicidad de cepas de Phytophthora asociadas*. Ingeniería. Universidad Católica de Valparaíso.
- Kong, P., Hong, X., & Richardson, P. (2003). Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant Pathology* , 52, pp.681-693.
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., & Srivastava, R. (2012). Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian Journal Microbiology* , 52(2), pp.137-144.
- Lopez, C., Perez, R., Basallote, M., & Zea, T. M. (1997). Effect of soil solarization on the control of *Phytophthora* root rot in avocado. *Plant Pathology* , 46(3), pp.329-340.
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M., & Nakanishi, N. (1976). Selective Inhibition of *Pythium* spp. on a Medium for direct isolation of *Phytophthora* spp from soils and plants. *The American Phytopathological Society* ,67, pp.425-428.
- Martinez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp y su función en el control de plagas de los cultivos. *Protección Vegetal* , 28 (1), pp.1-11.
- Ministerio de Agricultura de Ganadería, Acuacultura y Pesca.(2016). *Resultados del censo provincial*. (en línea) Disponible en: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/resultados-censo-provincial /file/592-reporte-de-resultados-del-censo-provincial-completo>: (Recuperado el 31/ 01/ 2016).

- Mondino, P. (2003). Control Biológico de enfermedades de plantas. *Bases conceptuales para el Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades* , 2, pp.199-206.
- Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., & Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *APF* , 3 (2), pp.11-16.
- Nascimento, R., Stecca, A., & Neves, V. (2014). Metabolic diversity of *Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma* , 2, pp.363- 375.
- Osorio, E. (2009). *Mecanismos de la actividad antagónica de Trichoderma spp. sobre Phytophthora capsici, Phytophthora cinnamomi y Rhizoctonia solani In vitro*. Maestría. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”.
- Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2004). *Diagnostic protocols for regulated pests Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés*. Paris: Le Nôtre, pp.247-256.
- Páez, O., Valverde, R., Gómez, L., & Brenes, A. (2004). Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamiento de *Phytophthora infestans* recolectados en plantaciones de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* , 28(2), pp.9-16.
- Ponce, L., Morillo, E., Viera, W., Jadán, M., & Romero, P. (2013). Caracterización de la Variabilidad Genética del Aguacate (*Persea americana* Mill.) de los Valles Interandinos del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Robin, C., Smith, I., & Hansen, E. (2012). *Forest Phytophthoras*. (en línea) Disponible en: <http://journals.oregondigital.org/ForestPhytophthora/article/view/cinnamomi/2726> (Recuperado el 25/ 02 / 2016).

- Rojas, I. (2004). *Estudio de la Interacción entre Tristeza del Palto (Phytophthora cinnamomi) y canchosis de ramillas (Fusicoccum aesculi) en plantas de Palto var Hass*. Licenciatura. Universidad Católica de Valparaíso.
- Romero, M. (2012). Comportamiento fisiológico del aguacate (*Persea americana* Mill). Magíster. Universidad Nacional de Colombia.
- Romero, O., Huerta, M., Huato, M., Domínguez, F., & Arellano, D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología* , 11(2), pp.143-151.
- Samuels, G. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* , 100 (8), 923-935.
- Sánchez, M. I. (2009). *Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de Trichoderma spp. nativos del norte de Tamaulipas*. Mestría. Instituto Politécnico Nacional de México.
- Sánchez, J., Sánchez, M., & Trapero, A. (2010). *La Tinta del castaño*. Andalucía: Junta de Andalucía, p.6.
- Sánchez, A., Alvarado, D., Tlapal, B., & Espinoza, D. (2012). Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosque de encino de el Arrayanal, Colima y Tecoanapa, Guerrero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* , 18(3), pp.341-355.
- Sepúlveda, P., Rebufel, P., Sepúlveda, G., & Bilbao, C. (2010). "*Tristeza del Palto*" una enfermedad importante. Arica: INIA, p.4.
- Stolzy, L., Zentmyer, G., Klotz, J., & Labanauskas, C. (1967). Oxygen Diffusion, Water, and *Phytophthora cinnamomi* in Root Decay and Nutrition of Avocados. *American Society for Horticultural science* , 90, pp.67-76.

- Suárez, C., Fernández, R., Valero, N., Gámez, R., & Páez, A. (2008). Antagonismo In vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* , 10(2) pp.35-43.
- Tovar, J. (2008). *Evaluación de la capacidad Antagonica "in vivo" de aislamientos de Trichoderma spp frente al hongo fitopatógico Rhizoctoni solani*. Microbiólogo. Pontifica Universidad Javeriana de Bogotá.
- Toapanta, D. (2013). *Identificación molecular de Phytophthora spp. en el cultivo de aguacate (Persea americana Mill) de las principales zonas productoras del Ecuador*. Especialista Agrobiotecnología. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Vinale, F., Ghisalberti, E., Sivasithamparam, K., Marra, A., Ritieni, A., Ferracane, R., y otros. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology* , 48(6), pp.705-711.
- Villegas, B., & Castaño, J. (2001). *Aislamiento, esporulación, patogenicidad e identificación del agente causal de la pudrición de la corona y raíz del manzano en Caldas en: tecnología para el cultivo del manzano en zonas tropicales*. Manizales: Artes gráficas Tizán, p.14.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Meyer, W. (1994). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. Frankfurt: Illustrated, p.336.
- Zentmyer, G. (1979). Simulation of sexual reproduction in the A2 Mating type of *Phytophthora cinnamomi* by a Substance in avocado roots. *Physiology and Biochemistry* , 73(2), pp.1129-1131.