

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE
Colletotrichum sp., EN CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*), EN
LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA.**

AUTORAS:

VERÓNICA PATRICIA CADENA LANDETA

ANDREA MISHHELL LÓPEZ OROZCO

DIRECTOR:

RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito, junio del 2021

Cesión de derechos de autor

Nosotros VERÓNICA PATRICIA CADENA LANDETA, con documento de identificación N° 1723298657 y ANDREA MISHHELL LÓPEZ ORZOCO, con documento de identificación N° 1725608440, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de grado/titulación intitulado: “identificación de hongos con potencial biocontrolador de *Colletotrichum* sp., en cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), en la provincia de Tungurahua”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

.....
Verónica Cadena

1723298657

.....
Andrea López

1725608440

Junio del 2021

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Identificación de hongos con potencial biocontrolador de *Colletotrichum* sp., en cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), en la provincia de Tungurahua, realizado por: VERÓNICA PATRICIA CADENA LANDETA y ANDREA MISHELL LÓPEZ OROZCO, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, junio del 2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ramiro Daniel Acurio Vásquez', is written over a light blue rectangular background. Below the signature, a horizontal dotted line extends across the width of the signature area.

Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásquez

C.I: 171481949-5

Dedicatoria

A Dios y a mi Lolita por brindarme salud, sabiduría para lograr culminar una etapa más en vida.

A mis padres que con su amor, paciencia, consejos y esfuerzo me han ayudado a terminar mi carrera, agradezco por estar pendientes de mí, por cada palabra de aliento, por ayudarme a seguir adelante, por nunca dejarme sola los amo mucho todo lo que yo soy es por ustedes. A mis hermanos por ser un ejemplo para mí, por estar conmigo siempre y por cada consejo que me han dado.

A mis abuelitos, aunque ya no están conmigo físicamente sé que desde el cielo me han enviado sus bendiciones y sé que están felices por verme culminando uno de mis sueños. A mi Mamita Lali por cada una de sus oraciones y su cariño constante con el que he crecido día a día.

A mí Tía Pelucas, mi prima Anita Cadena por cada palabra de aliento y por estar pendientes de mí siempre.

A mis mejores amigas Antonella Sierra y Josselyn Bolaños por nunca dejarme sola y siempre darme ánimos de seguir adelante.

Gracias a todos ustedes por su amor y su apoyo incondicional

Verónica Cadena Landeta

A mi mamita Fanny, mi mejor amiga y confidente por acompañarme en este largo camino de la vida, por tus consejos, tu compañía, dedicación y esfuerzo para poder conseguir todas mis metas que se han convertido en las tuyas también, el amor incondicional que me brindas hacen que no decaiga en ningún momento. A mi hermana Carolina, con tu ejemplo y perseverancia me enseñas la importancia de luchar por cada objetivo propuesto, tus palabras y consejos los llevo siempre presentes porque me hacen ser mejor persona y ser humano. Ustedes dos son mi fuerza y motor para seguir luchando.

A mi papá Moisés por haberme enseñado buenos hábitos, a mi tía Clarita que fue mi segunda madre, a Fernanda y Brenda por brindarme su apoyo, amor y confidencialidad, Dennise, Génesis, Ami y Ámbar mis pequeñas princesas que me alegran tanto la vida, Eduardo y Amparito mis amados tíos.

A Clarita por darme ánimo constantemente y siempre estar presente.

Gracias por formar parte de este logro, los/las amo mucho.

Andrea López Orozco.

Agradecimiento

A Dios por estar presente durante toda nuestra carrera Universitaria

A la Universidad Politécnica Salesiana, en especial a la carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales y sus docentes por impartirnos una educación de excelencia.

A las instalaciones del Laboratorio CIVABI por abrirnos sus puertas para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A nuestro estimado tutor Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásquez MSc, por brindarnos la confianza de formar parte de este proyecto, por su tiempo, apoyo y asesoría en cada fase de la realización de este trabajo el cual nos permitió desarrollar nuestras aptitudes.

A la Ing. Elizabeth Yugsi ayudante de laboratorio, por la orientación, paciencia, predisposición y entera ayuda con sus conocimientos durante la parte experimental para llegar a término la investigación.

Índice de contenido

Introducción.....	1
Capítulo 1. Marco Conceptual.....	4
1. Cultivo de tomate de árbol	4
1.1 Descripción botánica.....	4
1.2 Taxonomía.....	4
1.3 Variedades	6
1.4 Ciclo fenológico del cultivo	6
1.5 Zonas de producción del cultivo	7
1.6 Importancia Económica.....	8
1.7 Fitopatología del tomate de árbol	8
1.7.1 Plagas	8
1.7.2 Enfermedades producidas por bacterias.....	9
1.7.3 Enfermedades producidas por nemátodos.....	9
1.7.4 Enfermedades producidas por hongos.....	10
1.8 Antracnosis	10
1.8.1 Generalidades de <i>Colletotrichum</i> sp.....	10
1.8.2 Caracterización morfológica	11
1.8.3 Taxonomía de <i>Colletotrichum</i> sp	12

1.8.4	Ciclo biológico	12
1.8.5	Signos y síntomas	13
1.9	Manejo integrado de la enfermedad.....	14
1.9.1	Control biológico.....	14
1.9.1.1	Microorganismos biocontroladores	14
1.9.2	Mecanismo de acción de los microorganismos biocontroladores	15
1.9.2.1	Micoparasitismo	15
1.9.2.2	Antibiosis.....	15
1.9.3	Competencia	16
1.10	Pruebas antagónicas	16
1.11	Cultivos duales.....	16
1.12	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	17
1.13	Espacio Transcripto Interno (Internal Transcribed Spacer ITS).....	17
1.14	Secuenciación de ADN	18
1.15	Método de secuenciación de Sanger	18
1.16	Análisis bioinformático de secuencias de ADN	19
1.17	Biopreparados	19
1.17.1	Sustratos para la producción de biocontroladores	19
1.17.1.1	Maíz (<i>Zea mays</i>)	19
1.17.1.1.1	Residuales de maíz	19

1.17.1.1.2	Composición química del ovario (tusa) de maíz.....	20
1.17.1.1.3	Composición química de las hojas de maíz	21
1.17.1.2	Arroz (<i>Oriza sativa</i>).....	21
1.17.1.2.1	Composición química.....	21
Capítulo 2: Metodología.....		23
2	Localización.....	23
2.1	Fase de campo	23
2.1.1	Recolección de muestras o Muestreo	23
2.1.1.1	Muestreo de suelo.....	23
2.1.1.2	Recolección de material vegetal	24
2.2	Fase de laboratorio.....	24
2.2.1	Limpieza de material vegetal.....	24
2.2.2	Diluciones en suelo.....	25
2.2.3	Siembra directa en cajas Petri	25
2.2.3.1	Material vegetal	25
2.2.3.2	Suelo	26
2.2.3.3	Aislamiento de Hongos	26
2.2.3.4	Purificación de Hongos	27
2.2.4	Estudios morfológicos de los hongos.....	28
2.2.4.1	Observación macroscópica.....	28

2.2.4.2	Observación microscópica.....	28
2.2.5	Conservación de muestras	29
2.2.6	Pruebas antagónicas	29
2.2.7	Capacidad antagónica de los hongos.....	30
2.2.7.1	Escala de Bell	30
2.2.7.2	Porcentaje de Inhibición del crecimiento Radial	32
2.2.8	Extracción de ADN	33
2.2.9	Amplificación de la región ITS (PCR).....	34
2.2.10	Secuenciación.....	34
2.2.11	Análisis de secuencias	35
2.2.12	Producción de biopreparados	36
2.2.12.1	Preparación de medio de cultivo líquido	36
2.2.12.2	Preparación de sustratos sólidos	36
2.2.12.3	Inoculación del medio líquido en los sustratos sólidos.....	37
2.2.12.4	Recuento de conidias	37
2.2.12.5	Análisis estadístico	38
2.2.12.6	Viabilidad de conidias	38
Capítulo 3: Resultados y Discusión.....		39
3.	Muestreo y aislamiento de hongos	39
3.1	Identificación morfológica de hongos con potencial antagónico.....	39

3.2	Pruebas Antagónicas.....	46
3.3	Capacidad antagónica de los hongos	51
3.4	Cuantificación de ADN	53
3.5	Amplificación de la región ITS	54
3.6	Análisis de secuencias	55
3.7	Masificación de <i>Trichoderma</i> en diferentes sustratos orgánicos.....	57
3.8	Concentración de esporas de <i>Trichoderma</i>	58
3.9	Viabilidad de conidias	63
	Conclusiones.....	66
	Recomendaciones	67
	Bibliografía.....	68
	Anexos.....	83

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del Tómate de árbol.....	5
Tabla 2. Taxonomía de <i>Colletotrichum</i> sp.	12
Tabla 3. Composición elemental de la tusa de maíz.....	20
Tabla 4. Composición química de la hoja de maíz.....	21
Tabla 5. Ubicación de los lugares de recolección de la muestra de suelo y del material vegetal de <i>Solanum betaceum</i>	23
Tabla 6. Escala de Bell para evaluar la competencia por sustrato in vitro	30
Tabla 7. Cantidad de hongos purificados en los diferentes lugares de recolección	39
Tabla 8. Descripción Macro y Micro de los hongos seleccionados	40
Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de cepas fúngicas contra <i>Colletotrichum</i> a las 48 h.....	46
Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de cepas fúngicas contra <i>Colletotrichum</i> a las 120 h.....	48
Tabla 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de cepas fúngicas contra <i>Colletotrichum</i> a las 168 h.....	49
Tabla 12. Evaluación en la Escala de Bell de los hongos Biocontroladores	51
Tabla 13. Secuencias Alineadas	56

Tabla 14. Descripción de los tratamientos.....	58
Tabla 15. Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de concentración de conidios según la cepa.....	59
Tabla 16. Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de concentración de conidios según el sustrato	61
Tabla 17. Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de concentración de interacción de cepas*sustratos.	62
Tabla 18. Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de viabilidad de conidias.	64

Índice de figuras

Figura 1. Zonas de producción del cultivo de tomate de árbol	7
Figura 2. Ciclo de vida de la enfermedad causada por <i>Colletotrichum</i> en tomate de árbol	13
Figura 3. Frutos de tomate de árbol <i>Solanum betaceae</i> con síntomas de antracnosis.....	14
Figura 4. Técnica de cultivo dual	17
Figura 5. Diluciones seriadas	25
Figura 6. Siembra de muestra de suelo.....	26
Figura 7. Esporulación y crecimiento de hongos	27
Figura 8. Cepas fúngicas puras.....	28
Figura 9. Promedio de crecimiento de posibles cepas biocontroladoras en orden ascendente	52
Figura 10. Hongo S3-3 Antagonista frente a Hongo Patógeno	53
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de ADN total, obtenido mediante el kit Purelink Microbiome DNA Purification de Invitrogen.	54
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR (ADN total), amplificación de la región ITS	55

Índice de anexos

Anexo 1. Ubicación Geográfica de los lugares de muestreo en la provincia de Tungurahua	83
Anexo 2. Patógeno y posible biocontrolador en enfrentamiento mediante la técnica de cultivos duales.	84
Anexo 3. Resumen de mediciones de hongos a las 48 h, 120 h, 160 h.....	87
Anexo 4. Resumen medición <i>Collectotrichum</i>	91
Anexo 5. Promedio PICR del hongo patógeno <i>Collectotrichum</i> sp a las 48 h	92
Anexo 6. Promedio PICR del hongo patógeno <i>Collectotrichum</i> sp a las 120 h	93
Anexo 7. Promedio PICR del hongo patógeno <i>Collectotrichum</i> sp a las 168 h	93
Anexo 8. Extracción de ADN a través del kit de extracción Purelink Microbiome DNA Purification de Invitrogen.....	95
Anexo 9. Purificación de la reacción de secuenciación (Secuenciación).....	96
Anexo 10. Secuencias Alineadas mediante el programa BLAST (Standard Nucleotide BLAST)	97
Anexo 11. Preparación de sustratos en fundas de propileno.....	101
Anexo 12. Esporulación de las cepas de <i>Trichoderma</i>	102

Resumen

El presente trabajo se basa en el uso de microorganismos con capacidad biocontroladora para *Colletotrichum* sp con la finalidad de disminuir el uso de agroquímicos y así reducir la contaminación ambiental y los problemas de salud que estos producen al ser humano al tener contacto con los mismos.

Colletotrichum sp es un hongo que causa afectaciones en el tomate de árbol y que produce pérdidas totales del cultivo sino es controlada a tiempo. Para el desarrollo de esta investigación se recolectó muestras de tres lugares de la provincia de Tungurahua las cuales fueron llevadas al laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana para proceder con la metodología de aislamiento, purificación, identificación macro y microscópica, además de la identificación molecular de las cepas eficientes. Se realizó pruebas para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y la escala de Bell, donde las cepas con mayor porcentaje inhibitorio de la clase 2 de la escala de Bell fueron las cepas de *Trichodermas*: S3-3, S3-4, S1-2 determinando que fueron las cepas más adecuadas para combatir *Colletotrichum* sp y de las cuales se realizó biopreparados con diferentes sustratos por medio de un cultivo bifásico líquido-sólido, tenido como resultado que el mejor sustrato es la hoja de maíz con la cepa S1-2 ya que presenta una viabilidad de 91,08 % siendo apta para utilizar en campo.

El objetivo de este trabajo fue identificación de hongos con potencial biocontrolador de *Colletotrichum* sp., en cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

Palabras claves: *Colletotrichum* sp, Trichoderma, biocontrolador, PICR, escala de Bell.

Abstract

The present work is based on the use of microorganisms with biocontrolling capacity for *Colletotrichum* sp; in order to reduce the use of agrochemicals and thus reduce environmental pollution and health problems that these produce to humans when they come into contact with them.

Colletotrichum sp is a fungus that causes affectations in the tree tomato and that produces total losses of the crop if it is not controlled in time. For the development of this research, samples were collected from three places in the province of Tungurahua which were taken to the laboratory of the Salesian Polytechnic University to proceed with the methodology of isolation, purification, macro and microscopic identification respectively, in addition to the molecular identification of efficient strains. Tests were carried out to determine the percentage of radial growth inhibition (PICR) and the Bell scale, where the strains with the highest inhibitory percentage of class 2 of the Bell scale were the *Trichodermas* strains: S3-3, S3-4 , S1-2 determining that they were the most suitable strains to combat *Colletotrichum* sp and of which biopreparations were made with different substrates by means of a liquid-solid biphasic culture, with the result that the best substrate is the corn leaf with the strain S1-2 since it presents a viability of 91,08 %, being suitable for use in the field.

The objective of this study as to identify fungi with biocontroller potential of *Colletotrichum* sp., In tree tomato (*Solanum betaceum*) cultivation.

Keywords: *Colletotrichum* sp, *Trichoderma*, biocontroller, PICR, Bell scale

Introducción

El tomate de árbol *Solanum betaceum* es un cultivo semiperemne perteneciente a la familia de las Solanáceas (Feicán, Encalada, & Becerril, 2016), autóctono de América del Sur específicamente de los países que forman la región Andina, Ecuador, Colombia, Perú, Bolivia y Venezuela. Según Bohs y Nelson (1999) citado por (Chamba, 2018) los estudios moleculares y morfológicos demuestran que es originario de Bolivia. Durante los últimos años se ha introducido este cultivar en diferentes zonas del mundo como México y Nueva Zelanda (Alminate, 2017).

En Ecuador, las plantaciones de tomate de árbol se encuentra en mayor extensión en la Sierra, ya sea en cultivo solo o asociado, en las provincias de Carchi, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Azuay, Bolívar, Chimborazo, Pichincha y Tungurahua con una producción de 22,343 t (ESPAC & INEC, 2018). Este frutal se cultiva en zonas donde los suelos poseen textura media franca arenosa con alto contenido de materia orgánica, en climas fríos a temperaturas que oscilan entre 13° C a 20° C (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015) y en altitudes de 2000 a 2800 m.s.n.m (Feicán *et al.*, 2016).

En las zonas ecuatorianas el tomate de árbol presenta problemas en su producción, ya que muchas veces se siembra con semillas desfavorables, generando pérdidas en los cultivos y obteniendo frutos desiguales en cuanto a color y tamaño (Garzón, 2015).

Otro problema que existe es cuando se siembra en lugares con alta humedad y lluvias frecuentes, que (Barrera, 2018) conllevan a que el tomate de árbol sea más propenso a sufrir ataques de plagas y enfermedades (Garzón, 2015).

Una de las enfermedades más importantes en las plantaciones de tomate de árbol es la antracnosis generada por el hongo *Collectotrichum* sp, la cual presenta severos daños, grandes pérdidas en la producción y la dificultad en su control. La antracnosis afecta a las hojas, ramas y frutos,

produciendo manchas pequeñas que con el tiempo aumentan de tamaño hasta cubrir todo el tejido destruyéndolo por completo, siendo más susceptible en los frutos los cuales manifiestan síntomas en todos sus estados de desarrollo (Garzón, 2015).

El análisis filogenético realizado por (Gañán, Álvarez, & Castaño Zapata, 2015) atribuyen que existen diferentes tipos de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en diferentes frutales *C. asianum* en mango, *C. musae* en banano, *C. tamarilloi* en tomate de árbol, mientras que (Castro et al., 2019) en base a sus estudios morfológicos, moleculares y patogénicos realizados en Cuenca-Ecuador, reportan que los agentes causantes de antracnosis en tomate de árbol corresponden a *C. acutatum* y *C. tamarilloi*, sin embargo por la amplia variabilidad de la especie en ocasiones resulta difícil identificarlo.

El control de la antracnosis se basa en la aplicación de fungicidas a diferentes dosis con el objetivo de combatir el hongo. Estos causan problemas ambientales, daños a la salud de los productores y de los consumidores, debido a que al colocar estos químicos en los frutos se concentra una alta cantidad de residuos tóxicos. Según Tamayo (2003) citado por (Pinto & Tiaguaro, 2012), esta enfermedad genera altos costos para los productores por el uso excesivo de químicos, ya que la dificultad de control obliga a que se apliquen diferentes ingredientes activos con frecuencias cortas.

El control biológico es una alternativa frente a enfermedades que se presentan durante el desarrollo del cultivo, pre y post cosecha, mediante el uso de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras que pueden ser aislados de diferentes flores, hojas y frutos o inoculados artificialmente (Arboleda, Diaz, & Rios, 2019), reduciendo considerablemente los daños causados por fitopatógenos y la probabilidad de desarrollo de resistencia. (Landerero, Lara, Andrade, Aguilar, & Aguado, 2016) reportan a *Rodhotorula minuta*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* sp, como microorganismos con alto potencial antagónico frente a *Colletotrichum* sp, estos microorganismos

tienen diferentes mecanismos de acción que evitan el desarrollo del patógeno ya sea por competencia de sustrato, inactivación de enzimas del patógeno, micoparasitismo, crecimiento quimiotrófico (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009) entre otras.

Existen diferentes formulaciones biológicas para el desarrollo y crecimiento de hongos entomopatógenos a través de la multiplicación del hongo y de sus estructuras, en diferentes sustratos naturales de granos y cereales ya sea de arroz, trigo, maíz, cebada y en algunos casos la mezcla con ciertos residuos de caña de azúcar, que cumplen con los requerimientos nutricionales del hongo para garantizar elevadas concentraciones de conidios (Bautista, Mesa, & Gómez, 2018), las investigaciones realizadas por (Oderay, Tinoco, Jaramillo, & Arrequín, 2016) indican que el arroz, trigo, maíz, cebada pueden contener suplementos nutricionales como melaza que sirve de fuente de carbono y por otro lado harina de amaranto, harina de soya y levaduras como fuente de nitrógeno.

Capítulo 1. Marco Conceptual

1. Cultivo de tomate de árbol

1.1 Descripción botánica

El tomate de árbol presenta un sistema radicular fasciculado, puede alcanzar profundidades de hasta 1m (Tamba, 2014); crece de 2 a 3 m de altura (Pinto & Tiaguaro, 2012), con tallos semileñosos en forma cilíndrica que se ramifica hasta formar una copa; las hojas son enteras con forma de corazón y pubescentes, de color verde y en ocasiones se tornan moradas (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015), distribuidas en forma alterna en la planta (Tamba, 2014), el rango de crecimiento varía entre 10 y 30 cm de largo y de 4 a 12 cm de ancho (Dávila, 2016); las flores son hermafroditas, actinomorfas (Guamán, 2018), agrupadas en racimos terminales de color rosa o blanco (Pinto & Tiaguaro, 2012), conformadas hasta por 40 flores, “son pentámeras con cinco estambres que alternan con los lóbulos de la corola y su pistilo está formado por dos carpelos unidos (Tamba, 2014) (p.4)”;

los frutos tienen forma ovoide y semillas de color rojo cuando ya es maduro (Pinto & Tiaguaro, 2012)

1.2 Taxonomía

Según Bohs (1995) citado por (Parachimba, 2018) la clasificación taxonómica del tomate de árbol es la siguiente (Tabla 1).

Tabla 1.

Taxonomía del Tomate de árbol

Reino: Vegetal
División: Fanerógama
Subdivisión: Angiosperma
Clase: Dicotyledonae
Subclase: Metaclamideas
Orden: Tubiflorales
Familia: Solanaceae
Género: <i>Solanum</i>
Especie: <i>Solanum betaceum</i>
Nombre Común: Tomate de árbol

Fuente: (Parachimba, 2018)

Elaborado por: Las Autoras, 2021

1.3 Variedades

Según (Dávila, 2016) dentro de Ecuador existen 5 variedades nativas, sin embargo (Parachimba, 2018) indica que los cultivares no son puros debido a la polinización cruzada en las plantaciones haciendo que exista gran variedad morfológica.

Dentro del país existen tres variedades que se comercializan estas son:

- Tomate común
- Tomate mora
- Tomate redondo

1.4 Ciclo fenológico del cultivo

Etapa vegetativa: Período comprendido entre la siembra o trasplante hasta el inicio de la floración, dura de 6 a 8 meses (Cangás, 2019), el tallo alcanza su máximo crecimiento en altura y resistencia, las hojas se masifican y aumentan de tamaño (Vargas, 2019).

Etapa reproductiva: Transcurre de 7 a 14 meses, es la fase donde inicia la floración hasta el inicio de la fructificación, se origina con las primeras inflorescencias en los extremos apicales y en cada bifurcación del tallo Vargas, (2019) cada planta posee de 4 a 5 racimos aunque tan solo el 68 % de estas flores permanecen en el árbol, este fenómeno suele suceder durante la primera floración después se mantiene constante (Larrea, 2002).

Etapa productiva: Dura entre 17 y 44 meses, la planta mantiene una producción constante y finaliza con declinación ya sea porque el árbol se encuentra viejo o porque existe un alto porcentaje de enfermedades que lo atacan (Larrea, 2002).

1.5 Zonas de producción del cultivo

(Feicán et al., 2016) refiere que: “En Ecuador, el tomate de árbol, ocupa una superficie comercial de cerca de 5000 ha, localizadas en los valles interandinos de las provincias de Carchi, Pichincha, Tungurahua, Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja” (p.79) (Fig. 1).

En cada provincia existen algunas localidades con mayor producción de cultivo de tomate de árbol, así en Tungurahua, tenemos, Baños, Patate y Pelileo (Alminate, 2017); en Pichincha: Checa, Puenbo, el Valle de Tumbaco y Yaruquí; en Imbabura: Cotacachi Natabuela, y Buenos Aires (Dávila, 2016).

A continuación, se presenta una imagen ilustrativa de las provincias con alta producción de tomate de árbol en el país.

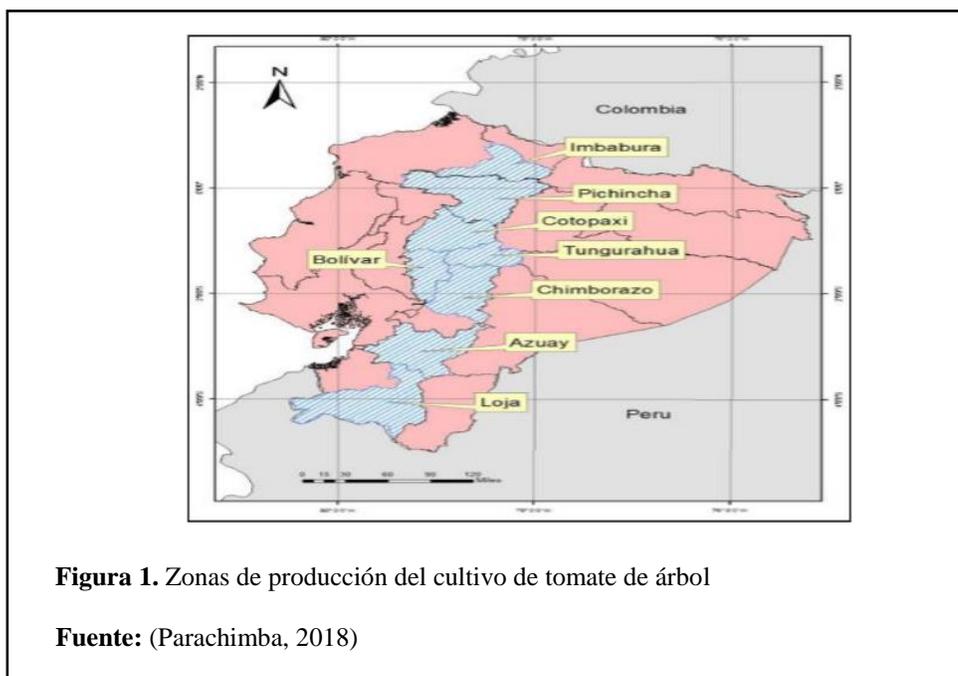


Figura 1. Zonas de producción del cultivo de tomate de árbol

Fuente: (Parachimba, 2018)

1.6 Importancia Económica

Actualmente la producción de tomate de árbol se ha visto impulsada por el manejo de cultivos ecológicos siendo una alternativa económica para mejorar de forma sustancial los ingresos de los agricultores principalmente en la provincia de Tungurahua en comparación con las provincias de Imbabura y Pichincha (Dávila, 2016).

Según Fernández (2018), citado por (Moreno, Molina, Ortiz, Peñafiel, & Moreno, 2020) el valor del fruto del tomate de árbol fresco fue de 0,85 USD por kg y para el mercado internacional se estima que varió entre 5,50 USD y 9,50 USD por kg; gracias al costo y buena calidad del producto hasta el 2019 en Ecuador se exportaba tomate de árbol en 33 países alrededor del mundo incluyendo Emiratos Árabes Unidos, Italia, Alemania Holanda, Bélgica, Francia y Suiza (EL COMERCIO, 2019).

1.7 Fitopatología del tomate de árbol

El cultivo de tomate de árbol presenta varios problemas fitosanitarios que se presentan a continuación.

1.7.1 Plagas

Chinche o chinchorro (*Leptoglossus zonatus*): es un insecto de color rojizo en su etapa juvenil y en su etapa adulta es de color café oscuro, ataca principalmente a los frutos en estado tierno o maduro (Feicán *et al.*, 2016), este insecto posee una toxina en su saliva que causa zonas endurecidas en los frutos (Parachimba, 2018) o lesiones oscuras rodeadas por un halo rojizo (Feicán *et al.*, 2016).

Mosca blanca (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*): estos insectos son vectores de diferentes virus y enfermedades, succionan los tejidos foliares (Tamba, 2014) e inyectan sustancias fitotóxicas a la planta, también pueden originar fumaginas que son excreciones azucaradas aptas para el desarrollo de hongos (Cruz, 2018).

Pulgones negros y verdes (*Aphis* spp., *Myzus persicae*): (Parachimba, 2018) aduce que son insectos pequeños que se alimentan de la savia de la planta que se localizan principalmente en las hojas y brotes tiernos, según (Feicán *et al.*, 2016) su saliva contiene sustancias tóxicas lo que causa deformaciones en las hojas, además pueden producir un retraso en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

1.7.2 Enfermedades producidas por bacterias

Marchitez Bacteriana *Pseudomonas solanacearum*: La infección se produce por labores culturales y su infección aumenta cuando la planta tiene cortes naturales o que se han producido por daños mecánicos (Ideas Biológicas, 2018), el hongo ataca a las raíces e induce a la germinación de las esporas o del micelio hasta invadir toda la planta, los síntomas que produce son amarillamiento foliar, caída de hojas y finalmente la muerte de la planta (Vásquez & Castaño, 2017).

1.7.3 Enfermedades producidas por nemátodos

Nudo de la raíz *Meloidogyne incognita*: ataca el sistema radicular de las plantas obstaculizando la filtración de líquidos y nutrientes (Ideas Biológicas, 2018).

(Carranza, 2019) menciona que los síntomas más frecuentes son las agallas o nódulos en las raíces como consecuencia se producen plantas raquílicas, este debilitamiento es progresivo por lo que las plantas se vuelven sensibles al ataque de bacterias oportunistas y hongos.

1.7.4 Enfermedades producidas por hongos

Alternariosis del tomate *Alternaria solani*: Los frutos con deficiencias nutricionales suelen ser más susceptibles al ataque del hongo, causa lesiones circulares con anillos de color castaño oscuro rodeados de halos cloróticos en las hojas y necrotiza el tejido provocando una consistencia quebradiza (Ideas Biológicas, 2018).

Lancha o tizón (*Phytophthora* sp.): el patógeno se encuentra en el suelo y se desarrolla en zonas húmedas y épocas lluviosas, ataca principalmente a las hojas y en ocasiones a las ramas y tallos produciendo manchas húmedas de color negro (Feicán *et al.*, 2016), también se presenta en las inflorescencia provocando la caída de las flores o frutos (Parachimba, 2018).

1.8 Antracnosis

Es una de las enfermedades más graves que afectan la producción de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el altiplano ecuatoriano, causada por *Colletotrichum* sp (Caicedo *et al.*, 2017).

1.8.1 Generalidades de *Colletotrichum* sp.

Según (Munir, 2015) la taxonomía de *Colletotrichum* ha cambiado considerablemente a lo largo de los años. Durante el siglo XIX y XX se describieron varias especies en base al huésped que fueron aisladas, sin embargo, en 1900 varias especies se combinaron de acuerdo a la morfología de las estructuras de los hongos y en 1957 Von Arx redujo la clasificación de *Colletotrichum* a 11 especies. Actualmente el número de especies ha variado considerablemente debido a las diferencias en la forma y tamaño de los conidios; presencia o ausencia de setas; aparición de colonias y tasa de crecimiento, la interacción patógeno-huésped. Algunas de estas especies de *Colletotrichum*

producen síntomas de enfermedad muy similares e infectan a los mismos huéspedes siendo este el caso de la antracnosis que se puede ver afectada por *C. glonoespoides*, *C. acutatum*, *C. tamarilloi*. Sin embargo (Caicedo *et al.*, 2017) menciona que el uso de datos de secuencia molecular multilocus de actina (ACT), β -tubulina (TUB2) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), histona 3 (HIS 3), quitina sintasa 1 (CHS-1) e ITS de cepas del complejo de especies de *C. acutatum* llevó a reconocer e identificar treinta y una especies dentro de este complejo, de las cuales 21 no se habían conocido previamente.

1.8.2 Caracterización morfológica

La especies del género *Colletotrichum* son semejantes morfológicamente, por ejemplo (Munir, 2015) manifiesta que *C. acutatum*, y *C. gloeosporioides* parecen ser similares pero el tamaño de esporas y la forma va a depender del medio de cultivo utilizado sin embargo (Lalanguí, 2015) manifiesta que *C. gloeosporioides* presenta un color gris a marrón con manchas rosadas en medio Potato Dextrose Agar (PDA), con conidias en forma cilíndrica y apresorios de forma irregular ovados.

(Parachimba, 2018) describe la morfología de *C. tamarilloi* como un hongo que produce conidios hialinos de paredes lisas, fusiformes de color salmón, con apresorios simples, subglobosas procedentes de hifas vegetativas. (Gañán *et al.*, 2015) difiere con algunas características de *C. tamarilloi* mencionando que sus colonias son irregulares con bordes semiondulados de micelio algodonoso que puede variar de color blanco a blanco grisáceo.

(Munir, 2015) en su estudio menciona que los aislamientos de *C. acutatum* se caracterizan por la producción de una coloración de rosa a roja en el medio, los conidios predominantemente fusiformes con extremos puntiagudos. (Damm, Cannon, Woudenberg, & Crous, 2012) describen a las hifas como hialinas, de paredes lisas, tabicadas, ramificadas y los conidióforos se forman

directamente en las hifas vegetativas. Las células conidiógenas son hialinas, de paredes lisas, cilíndricas a levemente infladas, a menudo no claramente separadas de las hifas subordinadas por un tabique.

1.8.3 Taxonomía de *Colletotrichum* sp

Cannon (2015), citado por (Lalangui, 2015) propone la siguiente taxonomía (Tabla 2):

Tabla 2.

Taxonomía de *Colletotrichum* sp.

Reino: Fungi
Filum: Ascomycota
Subfilum: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Familia: Glomerellaceae
Género: <i>Colletotrichum</i>

Fuente: (Lalangui, 2015)

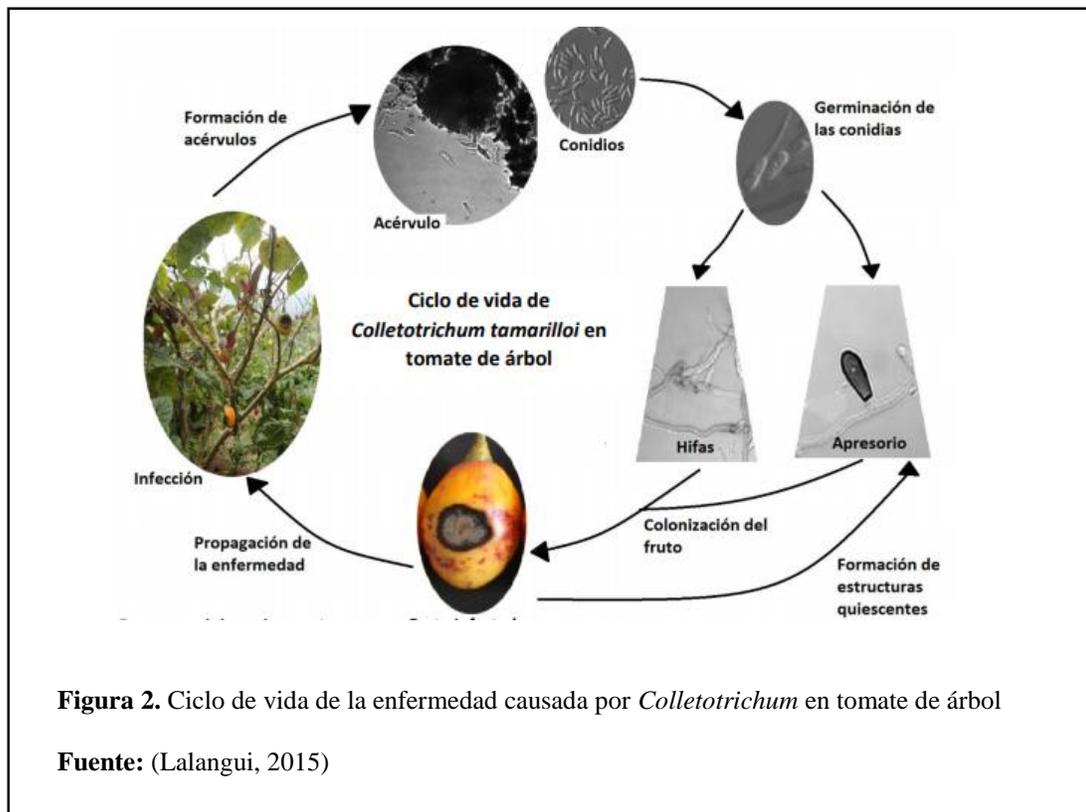
Elaborado por: Las Autoras, 2021

1.8.4 Ciclo biológico

El proceso de infección de *Colletotrichum* inicia con la formación de los conidios que se generan dentro de los acérvulos que son fuente principal de inóculo aptas para el desarrollo y diseminación de la enfermedad (Rodríguez, González, & Mayek, 2009). Una vez que los conidios germinan

forman los apresorios permitiendo la entrada a través de la cutícula o por medio de hifas de infección a través de los estomas (Fig. 2) (Sharma & Kulshrestha, 2015).

Después *Colletotrichum* pueden entrar dos fases: la fase biotrófica de corta duración y asintomática donde las estructuras de penetración invaden las células de la epidermis del hospedero sin causar daños al tejido (Cerón, Higuera, Sánchez, Bustamante, & Buitrago, 2006) y la fase necrotrófica, inicia con la aparición de hifas secundarias causando la destrucción de la células vegetales y la aparición de los síntomas de la antracnosis (Lalangui, 2015).



1.8.5 Signos y síntomas

El hongo causa daños en ramas y hojas en todos los estados fenológicos de la planta principalmente los frutos, (Tamayo, 2003) alega que los síntomas que produce el patógeno inician seis días después de la inoculación generando lesiones de color negro que pueden cubrir total o parcialmente

el fruto (Fig. 3) , en ciertos casos se produce una maduración prematura y posterior caída del fruto, (Castro et al., 2019) cita que, bajo condiciones de alta humedad, temperaturas entre 13 y 15 °C y fuertes lluvias la incidencia de la enfermedad aumenta, además dichas condiciones generan la proliferación de esporas del hongo.

El hongo puede mantenerse latente en hojas y ramas viejas emanando las esporas al resto de los órganos cuando encuentran las condiciones necesarias (SIPSA Sistema de Información de Precios y Abastecimiento del Sector Agropecuario, 2014).



Figura 3. Frutos de tomate de árbol *Solanum betaceae* con síntomas de antracnosis

Fuente: (E. Fernández & Vásquez, 2010)

1.9 Manejo integrado de la enfermedad

1.9.1 Control biológico

1.9.1.1 Microorganismos biocontroladores

Los microorganismos con potencial biocontrolador (hongos, bacterias y levaduras), tienen la capacidad de ejercer un control biológico frente a patógenos que generan diversas enfermedades en plantas (Hernández, Bautista, Velázquez, & Rodríguez, 2007).

Los hongos usados para el control biológico de diferentes plagas y enfermedades incluyen *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* spp., *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium* spp., pertenecientes al orden Hypocreales (Bautista et al., 2018), además existen especies del género *Trichoderma* (Cárdenas, 2010), *Nigrospora* sp., (Ríos, 2010) que pueden controlar el crecimiento de *Colletotrichum* sp.

Trichoderma es un organismo con alto potencial biocontrolador ya que produce diferentes tipos de propágulos (hifas, clamidosporas y conidios) que atacan a los fitopatógenos en diferentes etapas del ciclo de vida (Espino, Morales, Pedraza, & Morales, 2017); existen especies con buenas características para inhibir a *Colletotrichum* que se presentan a continuación:

- ✓ *Trichoderma asperellum*
- ✓ *Trichoderma paraviridescens*

1.9.2 Mecanismo de acción de los microorganismos biocontroladores

1.9.2.1 Micoparasitismo

Es una simbiosis antagónica entre organismos Infante *et al.*, (2009) en donde el antagonista crece hacia al patógeno (Sanchez, Sosa, & Reybet, 2011) gracias a la acción de enzimas extracelulares (quitinasas y celulasas) que se encargan de la degradación de la pared celular de los hongos parasitados (Martínez, 2020).

1.9.2.2 Antibiosis

Es una interacción biológica que imposibilita el crecimiento de varios microorganismos en el mismo espacio (Rojas, 2020), debido a la secreción de metabolitos que inhiben la actividad del microorganismo con mayor sensibilidad (Sanchez *et al.*, 2011).

1.9.3 Competencia

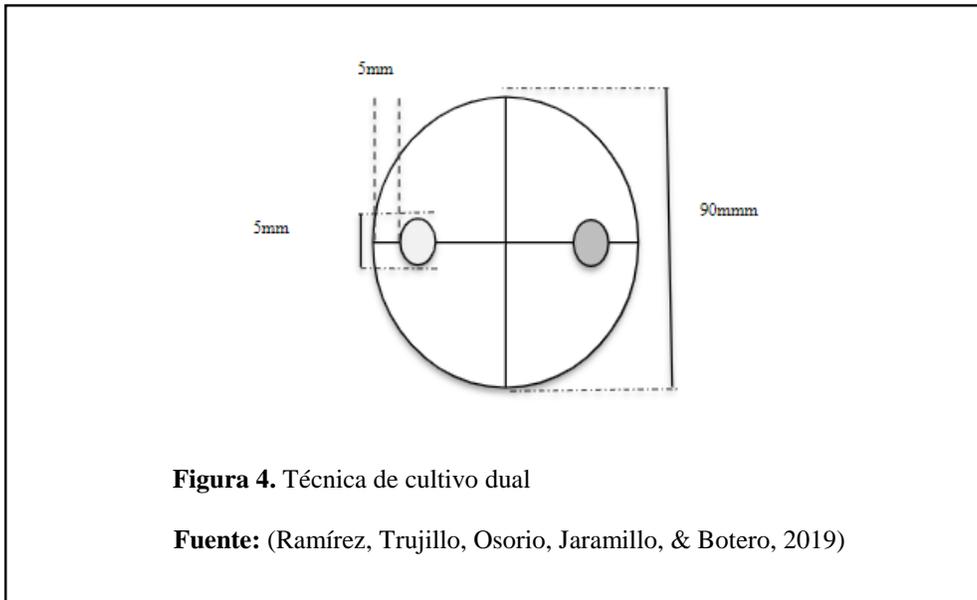
Este proceso ocurre cuando dos o más organismos compiten o requieren los mismos nutrientes o sustratos dentro de un mismo ambiente (Martínez, 2020) y el uso de este es utilizado por solo uno de los organismos de esta manera reduce los recursos, cantidad o espacio disponible de los otros organismos (Infante *et al.*, 2009).

1.10 Pruebas antagonicas

Es una interacción que se produce entre dos microorganismos que son enfrentados en un mismo ambiente y con las mismas condiciones en donde uno de ellos causa la pérdida de la actividad del otro (Sucaticona, 2018), estas pruebas ayudan a diagnosticar el ciclo de vida, reproducción y supervivencia de los hongos patógenos y las reacciones que desarrollan frente a organismos antagonistas (Espino *et al.*, 2017).

1.11 Cultivos duales

La técnica de cultivo dual permite implantar en un extremo o el centro de una caja Petri un disco que contenga un microorganismo antagonista y en el extremo opuesto un disco del mismo tamaño con un fitopatógeno (Calvo, Rivera, Orozco, & Orozco, 2012) (Fig. 4), ambos organismos buscan mecanismos de acción para colonizar el medio en el que crecen (Hernández *et al.*, 2007).



1.12 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Es una técnica molecular que se basa en la amplificación de una secuencia específica de ADN a partir de una sola molécula (Ibarra & Velasquillo, 2013), para este proceso se requiere ADN con las regiones que se desean amplificar, buffer o solución amortiguadora, *Taq* polimerasa, iniciadores (primers), Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), Agua destilada o desionizada estéril y Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) (Cornejo, Serrato, Rendón, & Rocha, 2014).

La reacción de PCR se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión, cada fase se realiza dentro de un termociclador por un tiempo determinado, con temperaturas y ciclos adecuados para la cantidad inicial de la secuencia diana que se desea amplificar (Greif, 2012).

1.13 Espacio Transcripto Interno (Internal Transcribed Spacer ITS)

Mediante la región ITS se caracteriza e identifica la taxonomía y filogenia de los hongos, el ITS está compuesta por dos regiones ITS1 e ITS2 separadas por el gen 5,8S (Sánchez, 2016) que

contiene una secuencia altamente conservada que ayuda a la unión de los cebadores o primers (Saltos, 2012).

En los hongos la región ITS está comprendida entre 600 y 800 pb que son amplificados por cebadores universales (Padilla, 2019), además el ITS es muy variable entre especies de hongos morfológicamente distintos, estas características hacen que esta zona sea apta para la identificación molecular (Sánchez, 2016).

1.14 Secuenciación de ADN

Es una herramienta que permite determinar la diversidad genética de un organismo a través de la comparación de secuencias de diversos taxones (Paredes & Yugsi, 2016), este proceso se realiza después de la reacción de PCR con el objetivo de determinar el orden de los nucleótidos de la cadena de ADN (Fuertes & Mallitasig, 2018).

1.15 Método de secuenciación de Sanger

Es una técnica consiste en la replicación de una cadena de ADN (Paredes & Yugsi, 2016) en la que intervienen ADN polimersa, cebadores, los desoxinucleótidos: adenina (dATP), tiamina (dTTP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y una cadena molde de ADN y dideoxinucleótidos o versiones terminantes de los cuatro nucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) (Pinedo & Ball, 2020) marcados con reactividad o fluoróforos (Cornejo *et al.*, 2014) que permiten la adición de nucleótidos consecutivos de forma que cuando uno de estos son incorporados por la polimerasa se detiene la síntesis de la nueva hebra (Fuertes & Mallitasig, 2018). Los fragmentos de ADN secuenciados son revelados por electroforesis de manera manual o automática (Cornejo *et al.*, 2014).

1.16 Análisis bioinformático de secuencias de ADN

Los análisis bioinformáticos son desarrollados en programas como el BLAST que permiten buscar las secuencias, realizar el análisis de secuencias, verificar que los parámetros Query Cover, Per Ident y Acc. Len, se encuentren dentro de los rangos establecidos (Gallou, Suaste, Serna, & Andrade, 2015).

1.17 Biopreparados

Son mezclas o sustancias en estado sólido o líquido que se obtienen por la fermentación o descomposición biológica de materiales orgánicos (Infante, 2011), que poseen propiedades repelentes, controladoras y curativas contra plagas y enfermedades (IPES/FAO, 2010).

1.17.1 Sustratos para la producción de biocontroladores

Los sustratos que son empleados para la producción de microorganismos deben mantener una relación estable de carbono: nitrógeno ya que de esto dependerá la formación de esporas, la mayoría de estos sustratos son subproductos de la agricultura o de la agroindustria procedentes del arroz, quinoa, maíz, avena, trigo, cascarillas de café entre otros (Poalacin, 2015).

1.17.1.1 Maíz (*Zea mays*)

El maíz pertenece a la categoría de las gramíneas, siendo un alimento fundamental a nivel mundial, según (Cumbajin & Flores, 2020) en Ecuador la producción de este grano se da en las provincias de Guayas, Ríos, Cotopaxi, Bolívar y Azuay.

1.17.1.1.1 Residuales de maíz

Según Nugra, (2018) el 50 % de la producción de maíz se recolecta en forma de grano, la otra proporción corresponde a otras estructuras de la planta: chalas (cáscara), espigas, mazorca, hojas y caña.

Los residuos de maíz contienen un 30 % de minerales K,P, N y Ca, el contenido de lignina varía entre el 14,6 % y 17,9 % (Cumbajin & Flores, 2020).

1.17.1.1.2 Composición química del ovario (tusa) de maíz

(Jaén, Ruiz, González, & Silva, 2019) en sus análisis realizados en la tusa mencionan que posee la siguiente composición química.

Tabla 3.

Composición elemental de la tusa de maíz

Porcentaje en volumen en base seca	
Carbón	48,40 – 40,00
Hidrógeno	5,40 – 5,87
Oxígeno	44,30 – 45,46
Nitrógeno	0,30 – 0,47
Sulfuro	0,01

Fuente: (Martillo et al., 2019)

Elaborado por: Las Autoras, 2021

1.17.1.1.3 Composición química de las hojas de maíz

Tabla 4.

Composición química de la hoja de maíz

Compuesto	Hoja de mazorca
	Porcentaje (%) base seca
Holocelulosa	78,86
α -Celulosa	43,14
Lignina	23,00
Cenizas	0,761

Fuente: (Prado et al., 2012)

Elaborado por: Las Autoras, 2021

1.17.1.2 Arroz (*Oriza sativa*)

Es un cereal rico en almidón (Poalacin, 2015) frecuentemente utilizado para la producción de biopreparados de manera artesanal o industrial (Pineda *et al.*, 2017).

1.17.1.2.1 Composición química

El arroz está compuesto por dos polímeros amilosa y amilopectina además contiene algunas vitaminas α - tocoferol (Vit. E) y iboflavina (Vit.B2), algunos minerales entre los cuales destaca el

fósforo y calcio y un alto contenido de aminoácidos, leucina, fenilalanina, tirosina y valina (Rodríguez, 2007).

Capítulo 2: Metodología

2 Localización

La investigación se llevó a cabo en dos fases: la primera fase fue en campo, se colectó muestras de suelo y material vegetal (hojas, fruto, flor) en la provincia de Tungurahua en tres lugares diferentes (Anexo 1). La segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana – Campus El Girón, en donde se realizó el aislamiento de hongos, identificación macroscópica y microscópica, identificación molecular-pruebas de antagonismo y elaboración de biopreparados sólidos.

2.1 Fase de campo

La muestra de suelo y material vegetal (hojas, fruto, flor) fueron recolectadas en tres lugares diferentes (Tabla 5) de la provincia de Tungurahua.

Tabla 5.

Ubicación de los lugares de recolección de la muestra de suelo y del material vegetal de *Solanum betaceum*

PROVINCIA	SECTOR	COORDENADAS	ALTITUD
TUNGURAHUA	Chiquicha 1	1°16'0" S y 78°31'60" W	2496 msnm
	Chiquicha 2	1°13'0" S y 75°33'57" W	2587 msnm
	Pillaro	S1°21'652"W78°38'366"	2616 msnm

Elaborado por: Las Autoras, 2021

2.1.1 Recolección de muestras o Muestreo

2.1.1.1 Muestreo de suelo

Se recorrió la parcela donde se encontraba el tomate de árbol con la finalidad de observar si existen diversos tipos de tierra, coloraciones distintas, etc., con la ayuda de una espátula se eliminó restos vegetales y abonos para cavar un hoyo de 15 cm de profundidad (ICIA, 2015), se tomó aproximadamente 15 g de muestra y se colocó en una funda plástica estéril la cual estuvo identificada con el nombre del lugar de recolección.

2.1.1.2 Recolección de material vegetal

En la recolección del material vegetal (hoja, flor y fruto) se separó varios puntos de la plantación para proceder a coleccionar, es decir de cada punto seleccionado se tomó una muestra del material vegetal, tomando en cuenta que los frutos se encuentren maduros presentando síntomas comunes de antracnosis como lesiones negras causadas por el hongo *Collectotrichum* sp (Castro *et al.*, 2019), las hojas se encuentren en buen estado teniendo un color verdoso y sean jóvenes y la flor debía ser completa y que no presente sequedad.

2.2 Fase de laboratorio

Se desarrolló en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana-Sede Quito El Girón; en las Áreas de Microbiología y Genética Molecular.

2.2.1 Limpieza de material vegetal

Las muestras vegetales recolectadas se depositaron en diferentes cajas Petri separando hojas, flores, fruto, se lavaron con agua estéril con la finalidad de eliminar residuos de tierra presentes en el material vegetal.

2.2.2 Diluciones en suelo

En las muestras de suelo se retiró raíces, piedras y residuos extraños, se pesó 10 g de cada muestra de suelo y se colocó en matraces que contienen 90 mL solución amortiguadora estéril Phosphate buffered saline (PBS), se agitó por 5 minutos para tener una mezcla homogénea y con la ayuda de una micropipeta se tomó 1 mL de la solución de cada matraz para realizar diluciones seriadas en tubos que contenían 9 mL buffer fosfato estéril hasta tener una dilución de 10^{-4} y proceder a sembrar las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (Fig. 5) (IECA, 2015).

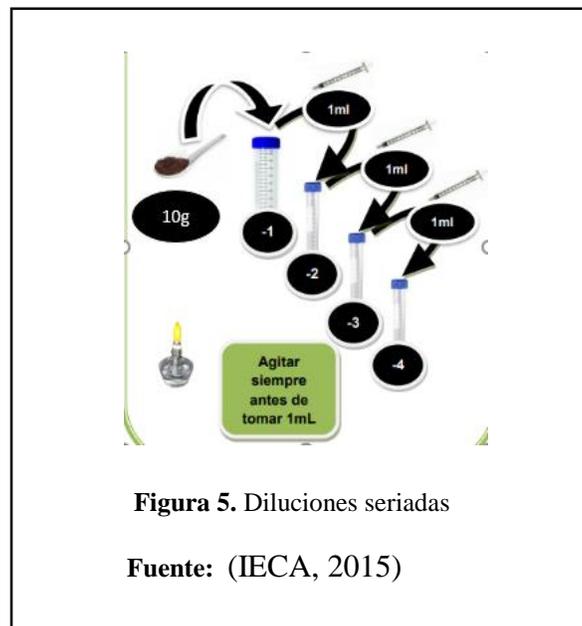


Figura 5. Diluciones seriadas

Fuente: (IECA, 2015)

2.2.3 Siembra directa en cajas Petri

2.2.3.1 Material vegetal

Se realizó la siembra dentro de una cámara de flujo laminar para evitar contaminación de agentes externos, con la ayuda de un bisturí estéril las muestras limpias fueron cortadas en pedazos de 5x5 mm aproximadamente, después se colocó 4 fragmentos de tejido a cierta distancia unas de otras en las cajas Petri que contenían el medio de cultivo (PDA + Cloranfenicol (0,01%)) (Duarte,

Echevarría, & Martínez, 2016). En cuanto a las flores se colocaron dos por cada caja Petri. Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 26 °C, durante 7 días (Bailey & Scott, 2009).

2.2.3.2 Suelo

Se tomó 100 µL de la solución madre y de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} previamente realizadas, y se sembró en las cajas Petri las cuales contienen medio de cultivo (PDA + Cloranfenicol (0,01 %)) (Duarte *et al.*, 2016) (Fig. 6), con la utilización de una asa Digrafsky estéril se extendió por toda la caja Petri y se incubó a 26 °C por 7 días (IECA, 2015).



2.2.3.3 Aislamiento de Hongos

Luego de los 7 días del periodo de incubación se seleccionaron los hongos que presenten esporulación y tengan un crecimiento sin contaminación (Fig. 7), para continuar con la purificación de los mismos (Orjuela, 2018).



2.2.3.4 Purificaci3n de Hongos

La purificaci3n de las cepas f3ngicas se llev3 a cabo mediante in3culos resultantes del aislamiento de los mismos a trav3s de la t3cnica de resiembra sucesivas (Romero, V3zquez, Reyes, Arzaluz, & Martinez, 2013), la cual con la ayuda de un palillo o una jeringa est3ril de insulina, se tom3 parte del micelio del hongo seleccionado y se sembr3 en otra caja Petri la cual contiene medio de cultivo (PDA + Cloranfenicol (0,01 %)) (Duarte *et al.*, 2016) posteriormente se dej3 en la incubadora a una temperatura de 26 °C durante un periodo de 1 a 2 semanas el cual es un tiempo aproximado para la obtenci3n de cepas puras como se observa en la (Fig. 8) (Orjuela, 2018) y continuar con su identificaci3n.



2.2.4 Estudios morfológicos de los hongos

2.2.4.1 Observación macroscópica

Para la identificación macroscópica se esperó a que el hongo crezca y llene los 2/3 de la caja Petri, para observar la textura, el tamaño y la forma (Marquez, 2017).

2.2.4.2 Observación microscópica

Para la observación microscópica se usó un portaobjetos (placa) en donde se colocó una gota de azul de lacto fenol con la finalidad de que esto ayude a colorear las estructuras y se pueda tener una mejor observación (Marquez, 2017); con la utilización de una pinza esteril se cortó segmentos de cinta adhesiva transparente y se tocó en la parte superior del hongo para obtener una cantidad suficiente del micelio, este se puso en el portaobjetos para su posterior observación (Jacome, Hernández, Colín, Cerón, & Cendejas, 2014) .

El portaobjetos (placa) se colocó en el microscopio óptico (Nikon Elipse E100) con aumento de 10 x hasta lograr una identificación de estructuras, luego se puso un aumento de 40 x para lograr una

mayor visualización y finalmente se colocó una gota de aceite de inmersión con un aumento de 100 x para la observación de las estructuras del hongo (Marquez, 2017).

2.2.5 Conservación de muestras

Para conservar a los hongos viables se efectuó la técnica de criopreservación o congelación en donde se utilizó un crioprotector (glicerina 85 %) (Escobar, 2017); para realizar esta técnica se esterilizó: tubos eppendorf de 2 mL, sacabocados, 50 mL de glicerina.

Se procedió a dispensar 1 mL de glicerina en los tubos eppendorf (Pinzón, Bustamante, & Buitrago, 2009), con la ayuda de los sacabocados se tomó 5 discos del hongo y se suspendieron en la glicerina, a continuación se colocó parafilm en la tapa del tubo eppendorf para evitar derrames del crioprotector, se etiquetó y las muestras se almacenaron en la refrigeradora a 20 °C (Pinzón *et al.*, 2009).

2.2.6 Pruebas antagónicas

Las pruebas antagónicas *in vitro* se desarrolló mediante la técnica de los cultivos duales, consistió en sacar con un sacabocados un disco de la caja Petri que contiene el micelio del patógeno (*Colletotrichum* sp) y del biocontrolador (Rivera, Meneses, & Zuñiga, 2015) (Anexo 2), esto se realizó con la ayuda de un sacabocados los cuales miden aproximadamente 1 cm de radio . Estos discos se procedieron a sembrar en una caja Petri las cuales contenían medio de cultivo (PDA + cloranfenicol). Se midió 1 cm del extremo de la caja Petri y se sembró el hongo patógeno, en el extremo opuesto de la caja Petri a la misma distancia se sembró el hongo biocontrolador, de cada muestra se realizó un triplicado y finalmente se sembró cajas Petri con el micelio testigo (*Colletotrichum* sp); se incubaron la muestras sembradas por 7 días a una temperatura de 26 °C (Chacon, Rivera, Villalobos, Orozco, & Orozco, 2017)

Se realizó 3 repeticiones de cada tratamiento (cepas en donde se obtuvo un mayor crecimiento de los hongos biocontroladores frente a *Colletotrichum* sp, tomando en cuenta que cada caja Petri con las muestras fueron una unidad experimental, teniendo así un total de 24 unidades experimentales.

Las variables medidas fueron: la capacidad antagónica de los hongos y el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) (Rivera *et al.*, 2015) (Chacon *et al.*, 2017).

2.2.7 Capacidad antagónica de los hongos

2.2.7.1 Escala de Bell

Para realizar esta evaluación se procedió a medir el crecimiento radial del patógeno y el antagonista; esta medición se realizó con un calibrador cada 48 horas (Anexo 3,4), transcurrido los 7 días que permanecen en incubadora, como referencia se tomó en cuenta la escala de Bell (Tabla 6) (Acurio, Ñacato, & Valencia, 2017).

Tabla 6.

Escala de Bell para evaluar la competencia por sustrato in vitro

CLASE	DESCRIPCION	CALIFICACION	RANGO
1	El antagonista ocupa toda la superficie del medio de cultivo cubriendo en su totalidad al patógeno.	Muy bueno	=60 mm
2	El antagonista llega a sobrepasar las dos	Bueno	<60 mm y =40mm

	terceras parte de la superficie del medio de cultivo		
3	El antagonista y el patógeno cada uno crece aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno domina al otro.	Deficiente	<40 mm y 30mm
4	El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista invadiendo las tres cuartas partes de la caja Petri	Malo	< 30 mm y >0
5	El agente patógeno llega a cubrir totalmente la caja Petri	Muy malo	=0

Fuente: (Acurio *et al.*, 2017)

Se consideró como organismo potencialmente biocontrolador a los que pertenecen a la clase 1 y 2, mientras que los que no son potenciales biocontroladores son de la clase 3, 4, 5.

Para determinar el porcentaje de crecimiento antagónico se realizó con la siguiente formula

$$\% \text{ de cubrimiento del antagonico} = \frac{\bar{X} \text{ del antagonico (mm)}}{86 \text{ (mm)}} * 100$$

Donde:

\bar{X} = promedio de radio de crecimiento del hongo antagonico (mm)

86mm: diámetro de la placa Petri

2.2.7.2 Porcentaje de Inhibición del crecimiento Radial

Este porcentaje se calculó a las 48 h, 120 h, 168 h sacando un promedio (Anexo 5,6,7) mediante la siguiente formula (Rivera *et al.*, 2015)

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

Donde:

R1: es el radio mayor; es decir el radio del patógeno como testigo (*Colletotrichum* sp)

R2: es el radio menor; es decir el radio del agente patógeno frente al biocontrolador

Para determinar si hay o no una significancia estadística en el PICR entre las muestras que se está estudiando, se analizó mediante el estadístico ANOVA (DCA) y test de rasgos múltiples de Tukey, con el software INFOSTAT interpretación 2020.

2.2.8 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los microorganismos fúngicos se utilizó el kit de extracción Purelink Microbiome DNA Purification de Invitrogen (Anexo 8), para lo cual se colocó 0,5 mL de hongo en un tubo eppendorf de 2 mL.

Para la extracción de ADN se siguió el manual de Invitrogen, esto se realizó a temperatura ambiente, en el tubo eppendorf que contiene la muestra de hongo se colocó 800 μ L del tampón de lisis, se agitó y se transfirió al tubo (bead tube) colocando 100 μ L del mejorador de lisis, se procedió a incubar a 65 °C durante 25 min, se homogenizo en el vortex a máxima velocidad durante 25 min, se centrifugo a 1400 g durante 2 min y después se traspasó 500 μ L del sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Se colocó 900 μ L de binding buffer y se agito (Anexo 8) (Invitrogen, 2006).

Siguiendo con el procedimiento se añadió 700 μ L de la muestra en el tubo de columna giratoria y se centrifugó a 1400 g durante 2 min, se desecho el líquido y se volvió a colocar 700 μ L de la muestra en el tubo de la columna y se centrifugó (Invitrogen, 2006).

Se colocó el tubo de la columna en un tubo de recolección limpio y se agregó 500 μ L de wash buffer (Anexo 8), el tubo de la columna giratoria se centrifugo a 1400 g durante 1.5 min, se descartó el líquido del tubo y se volvió a centrifugar (Invitrogen, 2006).

Para terminar la columna giratoria se colocó en un tubo eppendorf y se añadió 100 μ L de tampón de elución (Anexo 8), se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se colocó en la centrifugadora a 1400 g durante 1,5 min para obtener el ADN de los hongos (Invitrogen, 2006).

Para determinar la presencia o ausencia de ADN total, se utilizó la cámara de electroforesis Labnet en donde se colocó en el primer posillo el marcador de peso molecular Invitrogen™ 1 Kb Plus

DNA Ladder, y en los siguientes posillos se colocó las muestras con ADN, las cuales se corrieron en gel de agarosa al 0,5 % con 50 mL de TBE 1xy y 5 µL de SYBR Safe blue, durante 40 min a 90 V y bajo luz UV se leyó en el fotodocumentador Bio-imaging systems® (Fuertes & Mallitasig, 2018).

Las muestras que contienen ADN se guardaron en la congeladora -20 °C.

2.2.9 Amplificación de la región ITS (PCR)

Para la extensión de la región ITS de los posibles hongos biocontroladores, se utilizó los primers ITS 1 (5'CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), a través de la técnica de PCR: guiándonos en el manual Promega M7841, en tubos eppendorf estériles de 0,2 mL se colocó 12,5 µL de Master Mix Go Taq Promega, 1 µL de ITS 1, 1 µL de ITS 4, 1 µL de ADN extraído en pasos anteriores y 9,5 µL de agua PCR obteniendo un total de 25 µL para las muestras (Fuertes & Mallitasig, 2018)

Esta reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador ProFlex PCR System bajo las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial fue llevada a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, la alineación a 53 °C durante 1 min, la extensión inicial a 72 °C durante 1 min y la extensión final a 72 °C durante 10 min terminando con un mantenimiento a 4 °C (Fuertes & Mallitasig, 2018).

Para determinar la presencia del producto de PCR se realizó de la manera antes mencionada, corriendo las muestras en el gel de agarosa a las mismas condiciones.

2.2.10 Secuenciación

Del producto de PCR determinado, se llevó a cabo un primer lavado, en un tubo eppendorf de 2 mL se colocó 2 μ L de ExoSAP-IT® y 5 μ L de reacción de PCR, luego se transportó al termociclador ProFlex PCR System bajo las siguientes condiciones: incubación a 37 °C durante 15min en donde se activaron las enzimas y los productos indeseables se degradan y para que los componentes de ExoSAP-IT® se activen, se realizó una incubación a 80 °C por 15 min (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Para continuar con el proceso de secuenciación en otro tubo eppendorf de 2 mL se colocó 5 μ L de Big Dye Reaction Mix, 3,2 μ L de primer ITS 1(Forward), 3 μ L de producto de PCR (purificado anteriormente), 2 μ L de buffer (BigDye.Terminator V1.1 & V3.1 5x Sequencing Buffer) y 6,8 μ L de agua ultra pura sin ARNasas, alcanzando un volumen final de 20 μ L, esto se llevó a la centrifuga y se llevó las muestras al termociclador bajo las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial a 96 °C durante 1 min, por 25 ciclos una desnaturalización a 96 °C durante 10 s, la alineación a 50 °C durante 5 s, la extensión a 60 °C por un tiempo de 4 min y el mantenimiento a 4 °C (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Para preparar la reacción de secuenciación se colocó en un strip 90 μ L de SAM™ Solution, 20 μ L de BigDye® XTerminator (Fisher Scientific, 2006) y 20 μ L de las muestras preparadas anteriormente (Anexo 9); se cubrió el strip con papel aluminio y se colocó en el vortex durante 30 min después se centrifugó durante 2 min y finalmente se pasó al secuenciador SeqStudio™ Genetic Analyzer en la modo LongSeq_BDX y el Dye Set de Z_BigDye™ Terminator v3.1, las condiciones bajo las cuales las muestras fueron corridas son: tiempo de inyección por un lapso de 10 s con un voltaje de 4000 V.

2.2.11 Análisis de secuencias

Obtenidas las secuencias de ADN se procedió a utilizar dos programas Bioinformáticos para el análisis de las mismas, el primero es el Sequencing Analysis Software 6 el cual pertenece al equipo con el cual se secuenció las muestras, en este programa se analizó los electroferogramas, se eliminó secuencias que alteran los resultados finales y se determinó la región de buena calidad al principio y al final; el segundo programa es el BLAST, en el cual se colocó la secuencia de interés para buscar en la base de datos NCBI (Anexo 10), con la finalidad de obtener el nombre del microorganismos teniendo en cuenta los parámetros Query Cover, Per Ident y Acc. Len (Paredes & Yugsi, 2016)

2.2.12 Producción de biopreparados

Se lo realizó mediante un cultivo bifásico líquido-sólido (Méndez, Pozo, & García, 2009).

2.2.12.1 Preparación de medio de cultivo líquido

Se preparó 650 mL de una solución acuosa con 19,5 g de melaza y pH de 5,5 (Pineda *et al.*, 2017) se esterilizó y se dejó reposar hasta que se enfrié, se colocó 3,25 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), se llevó a la cámara de flujo donde se añadió 0,1 g de cloranfenicol, finalmente se realizó cortes pequeños de una caja Petri que contenía el hongo esporulado para añadir a la solución, se selló el frasco autoclavable de 500 mL y se llevó a un agitador orbital durante 3 días a 160 rpm y temperatura ambiente (Gómez, Soberanis, Tenorio, & Torres, 2013).

2.2.12.2 Preparación de sustratos sólidos

Se usó tres sustratos: grano de arroz comercial, hoja de maíz y tusa de maíz, estos dos últimos fueron obtenidos de los residuos orgánicos del Mercado San Roque en Quito.

Arroz: Se lavó con agua simple tres veces hasta eliminar todo el almidón después se colocó en un recipiente con agua hirviendo y se cocinó por 5 minutos, se escurrió todo el agua y se dispuso en un recipiente para que se enfrié (Méndez *et al.*, 2009).

Hoja y tusa de maíz: se procedió a cortar en pedazos pequeños para disminuir el tamaño de la partícula entre 0,5 y 10 mm y se lavó con agua destilada para eliminar las impurezas (Pineda *et al.*, 2017).

Se pesó 100 g de cada sustrato en fundas de propileno de 12x14 pulgadas y se añadió una solución enriquecedora de urea disuelta en agua destilada a razón de 2 g/L se sellaron las fundas sin dejar alguna fuga para evitar los derrames y se procedió a esterilizar (Gómez *et al.*, 2013). (Anexo 11). Finalmente se determinó la humedad (Méndez *et al.*, 2009) con un analizador de humedad HB43-S METTLER TOLEDO.

2.2.12.3 Inoculación del medio líquido en los sustratos sólidos

Una vez que las fundas fueron esterilizadas se las llevó a una cámara de flujo laminar durante 15 a 20 min para así evitar la contaminación de las mismas, se abrió cada funda y se colocó 20 mL de medio líquido y se midió la concentración inicial en una cámara de Neubauer de cada cepa a utilizarse Gómez *et al.*, (2013b) se cerró completamente la bolsa y se incubó a temperatura de 26 °C, al tercer día se removió todo el sustrato contenido en las fundas y al séptimo día se abrió cada funda para facilitar la oxigenación y deshumedecer el sustrato (Arévalo *et al.*, 2017) hasta el día que empezó la esporulación (Anexo 12).

2.2.12.4 Recuento de conidias

Para realizar el conteo de esporas se tomó 1 g de sustrato colonizado y se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía 9 mL de agua destilada estéril, luego se realizó la agitación en un vórtex,

se hizo diluciones hasta 10^{-2} y se determinó la concentración de conidias en una cámara de Neubauer (Arévalo et al., 2017a) cada medición se realizó a los 10 y 20 días después de la inoculación del medio líquido + microorganismos (Cumbajin & Flores, 2020).

Para determinar el número de esporas/mL se utilizó la siguiente fórmula planteada por (Hidalgo & Osorio, 2013).

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \text{número de esporas contadas} * 25,000 * \text{factor de dilución}$$

Los datos obtenidos en ufc/mL se transformaron a Log 10 que según (Collaguazo & Tenorio, 2018) sirven para obtener uniformidad en la varianza.

2.2.12.5 Análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento de las cepas biocontroladoras se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento cada uno con dos factores (cepas y sustrato orgánico). Los resultados fueron evaluados por el programa INFOSTAT versión 2020, mediante el análisis ANOVA y prueba Post Hoc de Tukey al 5 % (Collaguazo & Tenorio, 2018).

2.2.12.6 Viabilidad de conidias

Se usó la metodología de (Cumbajin & Flores, 2020) con ciertas modificaciones; se ocupó 3 g de sustrato con hongo de cada una de las fundas y se colocó en 500 mL de agua destilada estéril. Inmediatamente se realizó diluciones hasta 10^5 (dependiendo de la cantidad inicial de ufc/mL de cada muestra), hasta llegar a una concentración de 100 conidias, se procedió a sembrar las 100 conidias en una caja con medio PDA y se esperó 48 horas para contabilizar las conidias germinadas.

La fórmula que se empleó para determinar el porcentaje de viabilidad de conidias es la propuesta por (Espinoza & Vallejos, 2016), en donde:

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de conidias germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ de conidias totales}} * 100$$

Capítulo 3: Resultados y Discusión

3. Muestreo y aislamiento de hongos

Se muestreó tres lugares (Chiquicha 1, Chiquicha 2 y Pillaro) en la provincia de Tungurahua, después de haber realizado la purificación de las muestras se obtuvieron 94 cepas de hongos puros incluyendo las posibles cepas pertenecientes a *Colletotrichum* sp. Ver tabla 7.

Tabla 7.

Cantidad de hongos purificados en los diferentes lugares de recolección

Provincia	Total de hongos aislados	Lugar	Cantidad de hongos aislados
Tungurahua	94	Chiquicha 1	32
		Chiquicha 2	41
		Pillaro	21
Total	94	Total	94

Elaborado por: Las Autoras, 2021

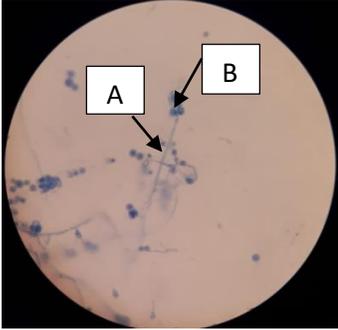
3.1 Identificación morfológica de hongos con potencial antagonico

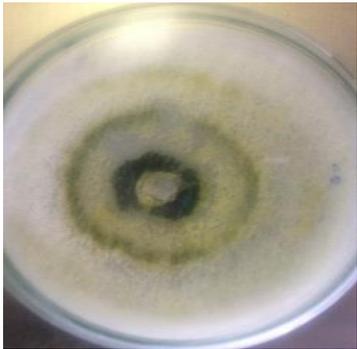
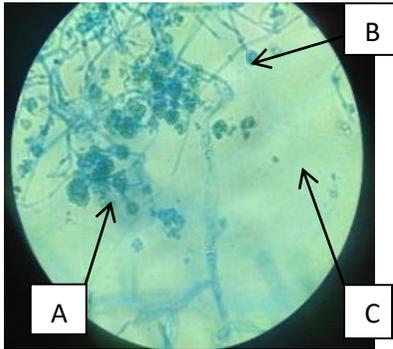
Las 94 cepas obtenidas de hongos puros se clasificaron de acuerdo a sus características de forma, color, tamaño, y estructuras reproductivas (hifas y esporas) de tal manera que se eliminaron muestras repetidas para tener un total de 55 cepas. (Jara, 2011) menciona que es necesario examinar tanto las estructuras macroscópicas y microscópicas para reconocer la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo.

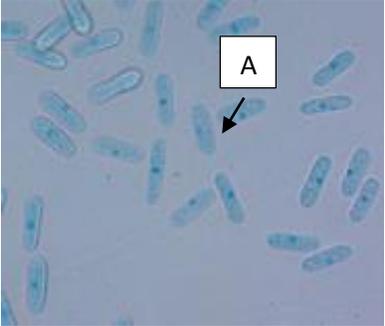
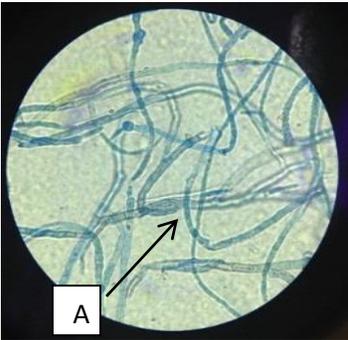
Para llevar a cabo las pruebas antagónicas se clasificaron las 55 cepas en 2 grupos con características de crecimiento rápido y crecimiento lento, una vez identificados los microorganismos se eligieron 2 cepas de Chiquicha I, 3 cepas de Chiquicha II y 3 cepas de Pillaro (Tabla 8) con un posible potencial biocontrolador frente a *Colletotrichum* en ensayos *in vitro*.

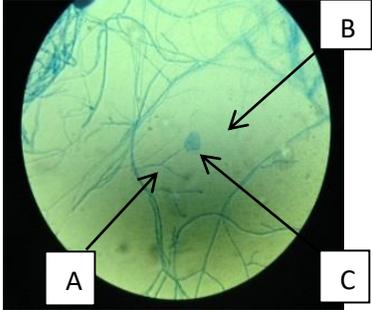
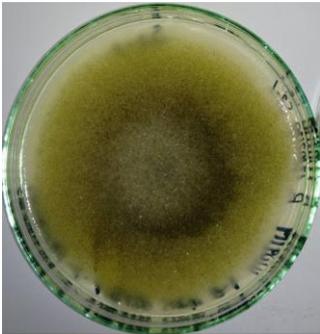
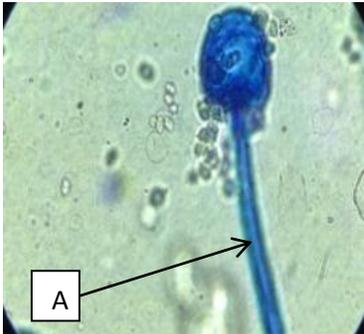
Tabla 8.

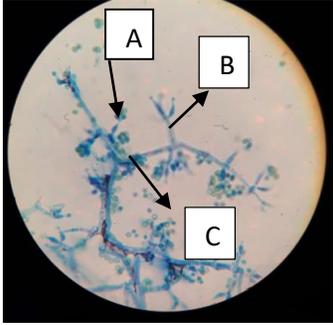
Descripción Macro y Micro de los hongos seleccionados

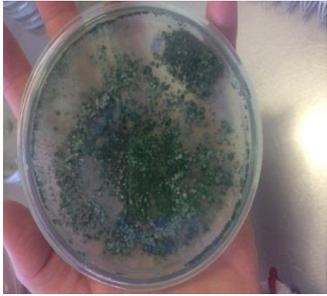
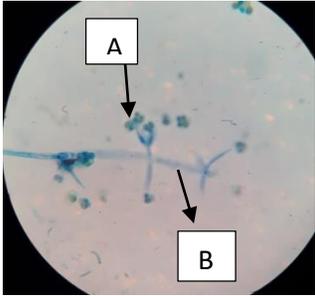
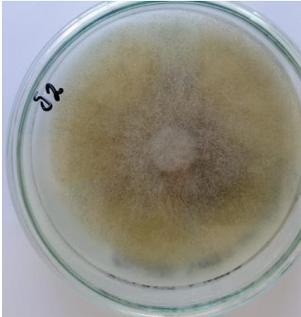
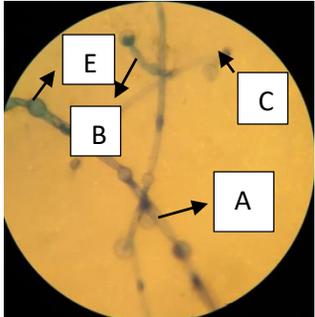
Lugar de recolección	Código	Vista Macroscópica	Vista Microscópica
Chiquicha I	H1-1	 <p data-bbox="678 1759 846 1791">Descripción</p>	 <p data-bbox="1138 1759 1305 1791">Descripción</p>

		<p>Color: Blanco</p> <p>Forma: concéntrica</p> <p>Textura: lisa con bordes plumosos.</p>	<p>A: Conidióforo</p> <p>B: Conidias hialinas</p>
S1-2	 <p style="text-align: center;">Descripción</p> <p>Color: blanco (micelio) con pigmentación verdosa (conidios).</p> <p>Forma: Anillos concéntricos bien definidos, plana.</p> <p>Textura: aterciopelada.</p>	 <p style="text-align: center;">Descripción</p> <p>A: Conidios multicelulares globosos.</p> <p>B: Conidióforos rectos y ramificados</p> <p>C: presencia de clamidospora</p>	

	<p>Fl6-1</p>	 <p>Descripción</p> <p>Color: blanco (micelio)</p> <p>Forma: Anillos concéntricos bien definidos, plana.</p>	 <p>Descripción</p> <p>A: Conidios</p>
<p>Chiquicha II</p>	<p>H2-1</p>	 <p>Descripción</p> <p>Color: verde con segmentos de color negro</p> <p>Forma: concéntrica</p>	 <p>Descripción</p> <p>A: Hifas septadas</p>

		Textura: algodonosa, luego aterciopelada.	
H3-3	 <p style="text-align: center;">Descripción</p> <p>Color: hialino mientras crece se torna blanco.</p> <p>Forma: concéntrica</p> <p>Textura: plana con bordes plumosos.</p>	 <p style="text-align: center;">Descripción</p> <p>A: Hifas cenocíticas (continuas)</p> <p>B: Fiálide en forma de botella</p> <p>C: Conidióforo recto</p>	
S2-1	 <p style="text-align: center;">Descripción</p>	 <p style="text-align: center;">Descripción</p>	

		<p>Color: centro café oscuro y bordes hialinos.</p> <p>Forma: Concéntrica</p> <p>Textura: algodonosa una vez que empieza esporular se torna aterciopelada.</p>	A) Conidióforo no ramificado
Pillaro	S3-3	 <p>Descripción</p> <p>Color: verde</p> <p>Forma: anillos concéntricos definidos.</p> <p>Textura: plegada y pulverulenta</p>	 <p>Descripción</p> <p>A: Esporas globosas (Conidios)</p> <p>B: Conidióforo</p> <p>C: Fálide</p>

	<p>S3-4</p>	 <p>Descripción</p> <p>Color: verde</p> <p>Forma: circular, esporas crecen dispersas</p> <p>Textura: micelio algodonoso, se torna de color verde (esporulación)</p>	 <p>Descripción</p> <p>A: Conidias hialinas, formando masas</p> <p>B: Conidióforo largo y no verticilado</p>
	<p>S2</p>	 <p>Descripción</p> <p>Color: blanco</p>	 <p>Descripción</p> <p>A: Conidióforo</p>

		Forma: Concéntrica Textura: algodonosa	B: Fiálides C: Conidios E: Clamidospora
--	--	---	--

Elaborado por: (Autoras, 2021)

3.2 Pruebas Antagónicas

El análisis estadístico se realizó en base al porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) del hongo patógeno *Colletotrichum* spp, frente a los posibles biocontroladores, a las 48 h, 120 h y 168 horas de incubación (Anexo 5, 6, 7). Los resultados se analizaron en un diseño completamente al azar utilizando el software estadístico Infostat interpretación 2020.

El análisis de varianza para 48 horas, mostró un valor estadístico $F = 0,80$ con un p-valor ($p > 0,005$) indicando que no existe una diferencia significativa para PICR (Tabla 9).

Tabla 9.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de cepas fúngicas contra *Colletotrichum* a las 48 h

CÓDIGO	MEDIAS \pm d.e
S3-4	32,82 \pm 18,48 ^a
H3-3	39,49 \pm 4,94 ^a

H1-1	42,05 ± 10,50 ^a
S1-2	42,56 ± 23,14 ^a
S3-3	45,13 ± 12,95 ^a
H2-1	48,97 ± 4,44 ^a
S2-1	51,03 ± 13,59 ^a
S2	54,10 ± 4,70 ^a

Elaborado por: Las Autoras, 2021

En la tabla 9 se muestra que las cepas S2-1 y S2 poseen un mayor porcentaje de inhibición con 51,03 % y 54,10 % respectivamente, seguidas de H2-1 con 48,97 %; S3-3 con 45,13 %; S1-2 42,56 % y H1-1 42,5 % sin embargo no presentan diferencia estadística significativa esto puede deberse porque aún no existe contacto entre el patógeno y el antagonista según (Calvo *et al.*, 2012) el tiempo de contacto que ejercen ambos organismos es importante debido a que entre menor sea mayor será la agresividad.

Los resultados evaluados a las 120 h mostraron que no existe diferencia significativa ya que se obtuvo un valor estadístico $F = 1,59$ con un p-valor ($p > 0,05$).

Tabla 10.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de cepas fúngicas contra *Colletotrichum* a los 120

h.

CÓDIGO	MEDIAS \pm d.e
H1-1	21,39 \pm 9,73 ^a
S2-1	23,75 \pm 19,87 ^a
H2-1	26,67 \pm 13,64 ^a
H3-3	27,08 \pm 13,35 ^a
S2	29,31 \pm 10,96 ^a
S3-4	36,94 \pm 8,97 ^a
S1-2	42,50 \pm 11,02 ^a
S3-3	48,47 \pm 14,87 ^a

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Las medias de los porcentajes de inhibición del crecimiento radial durante las 120 h (Tabla 10), empezaron a variar en relación a los resultados obtenidos a las 48 h la cepa S3-3 (48,47 %), S1-2

42,50 %) y S3-4 (36,94 %), se observa que existen variaciones en las medias pero el porcentaje se mantiene presentando la misma letra (a) esto se debe a que los microorganismos tanto patógeno y antagonista empiezan a competir por espacio y nutrientes (Infante & Martínez, 2019).

(Rivera et al., 2015), menciona que se debe tener 3 mediciones de los hongos teniendo así una última medición a las 168 h teniendo como resultados que existe diferencia significativa ya que se obtuvo un valor estadístico $F = 21,56$ con un p-valor.

Los resultados evaluados a las 120 h mostraron que no existe diferencia significativa ya que se obtuvo un valor estadístico $F = 1,59$ con un p-valor ($p < 0,005$), esto quiere decir que en un período de 7 días existen cepas que pueden controlar el crecimiento de *Colletotrichum* sp.

Tabla 11.

Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de cepas fúngicas contra *Colletotrichum* a los 168 h.

CÓDIGO	MEDIAS ± d.e
S2-1	53,97 ± 5,07a
H3-3	60,04 ± 1,97a
S2	63,46 ± 0,71ab

H2-1	72,86 ± 7,76bc
H1-1	75,73 ± 2,97c
S3-4	80,86 ± 2,76c
S1-2	82,14 ± 3,44c
S3-3	84,15 ± 4,57c

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Se puede identificar en la (Tabla 11) que la inhibición del crecimiento aumenta en algunas cepas y se mantienen otras, teniendo así que la cepa que mostró mayor actividad biocontroladora sobre *Colletotrichum* sp fue S3-3 con un porcentaje inhibitorio de 84,15 % seguida de S1-2 con 82,14 % y S3-4 con 80,60 %, en la Prueba Post Hoc Tukey nos indica que a pesar de que las cepas tienen medias diferentes poseen un rango (c) esto quiere decir que son estadísticamente iguales, esto se debe a que durante este período las cepas producen compuestos o metabolitos que ayudan a frenar el crecimiento del patógeno (Hernández, Ferrera, & Alarcón, 2019)

(Sanmartín Negrete, 2012) afirma que existen especies de hongos que generan actividad antagónica para *Colletotrichum* a través de la producción de compuestos volátiles o metabolitos secundarios, según (H. Vargas, Rueda, & Gilchrist, 2012) en su estudio las cepas de *Trichoderma* pueden generar una actividad antagónica de más del 70 % sobre *Colletotrichum*, a pesar de que las pruebas antagónicas no permitan evidenciar la capacidad micoparasítica del antagonista, también aseguran

que se generan de estructuras de invasión (apresorios) a 10 °C (Infante & Martínez, 2019) concuerdan con lo antes mencionado, además añaden que el micoparasitismo se da cuando las hifas entran en contacto con las del hospedante y forman apresorios que penetran la célula del patógeno degradando la pared celular y cabe resaltar que esto depende del aislamiento más no de la especie.

3.3 Capacidad antagónica de los hongos

La capacidad antagónica se estableció mediante el porcentaje de crecimiento radial de los hongos biocontroladores frente al hongo patógeno, en donde se realizó un promedio del crecimiento a las 168 h (7 días) con la escala de Bell (Tabla 6).

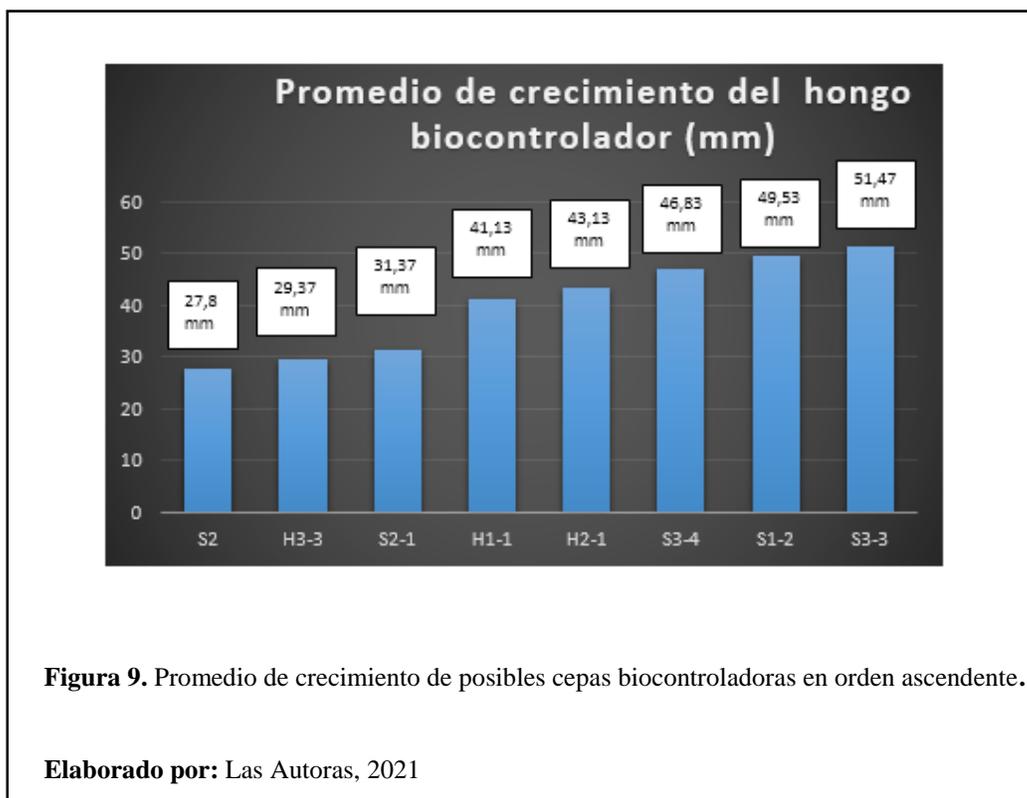
Tabla 12.

Evaluación en la Escala de Bell de los hongos Biocontroladores

Código	Tercer Medición (mm) 168h Número de Repetición 1	Tercer Medición (mm) 168h Número de Repetición 2	Tercer Medición (mm) 168h Número de Repetición 3	Promedio de crecimiento del hongo biocontrolador (mm)	Clase
S3-3	55,30	46,90	52,20	51,47	2
H1-1	42,00	35,80	45,60	41,13	2
S2	26,00	28,40	29,00	27,80	4
S3-4	48,30	48,30	43,90	46,83	2

S1-2	48,30	53,50	46,80	49,53	2
H2-1	42,70	47,30	39,40	43,13	2
H3-3	28,70	27,90	31,50	29,37	3
S2-1	29,90	32,10	32,10	31,37	3

Elaborado por: Las Autoras, 2021



Los resultados obtenidos en la escala de Bell (Tabla 12) indican que las cepas S3-3, S1-2, S3-4, H2-1, H1-1 presentan promedios altos como se indica en la (Fig. 9), de tal manera que se ubican en la clase 2 consideradas como cepas buenas dentro de la Escala de Bell (Tabla 6) esto se debe a que sobrepasan entre ambas la tercera parte de la superficie del medio de cultivo observando el crecimiento del patógeno especialmente la cepa S3-3 (Fig. 10), mientras que las cepas H3-3 y S2-1 se ubicaron en la clase 3 (Tabla 6) en donde las cepas son deficientes ya que el antagonista y el

patógeno cada uno coloniza aproximadamente la mitad del área del medio y ninguno parece dominar (Acurio *et al.*, 2017), es decir que estas no actúan frente a *Colletotrichum* durante los 7 días que permanecieron incubándose y finalmente tenemos la cepa S2 que se encuentra en la clase 4 (Tabla 6) considerada como mala, ya que el patógeno supera el crecimiento del antagonista invadiendo las tres cuartas partes de la caja Petri (Acurio *et al.*, 2017).

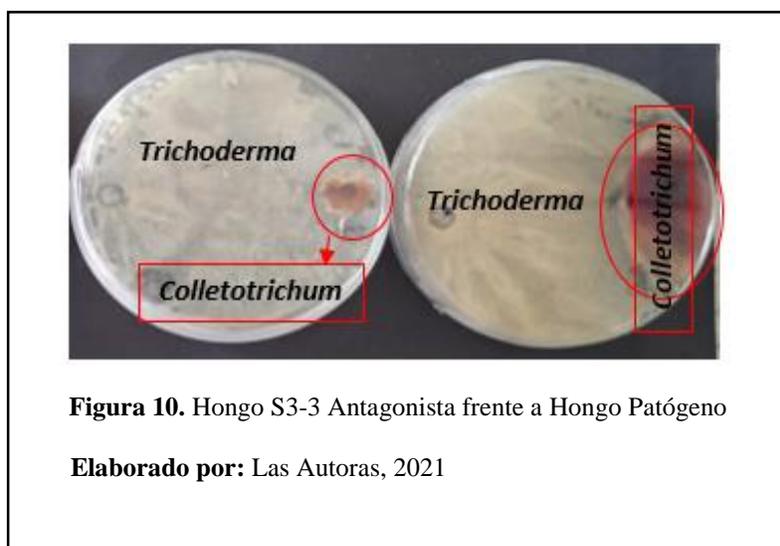


Figura 10. Hongo S3-3 Antagonista frente a Hongo Patógeno

Elaborado por: Las Autoras, 2021

3.4 Cuantificación de ADN

En la cuantificación de ADN genómico total de las 6 cepas se pudo determinar que el tamaño de las bandas para cada muestra es de aproximadamente 6000 pb, además se pudo visualizar la calidad e integridad del ADN (Fig. 11), tal como lo menciona (Cornejo *et al.*, 2014) una banda integra debe encontrarse cerca al pocillo en el que fue ubicada la muestra y no sobrepasar un cm de ancho, por lo que se puede determinar que las muestras con las que se está trabajando cumplen con los estándares de calidad y son aptas para la amplificación de la región ITS, en la misma figura se puede observar que la muestra S1-2 presenta un daño ya que la intensidad de la banda es baja sin embargo se la puede observar para la identificación de sus pares de bases; este daño puede ser ocasionado por diversos factores como: el ADN se puede encontrar degradado, la cantidad o la

concentración de ADN en la muestra cargada al gel eran insuficientes, el ADN durante la electroforesis se salió por un extremo del gel (Biomodel, 2014).

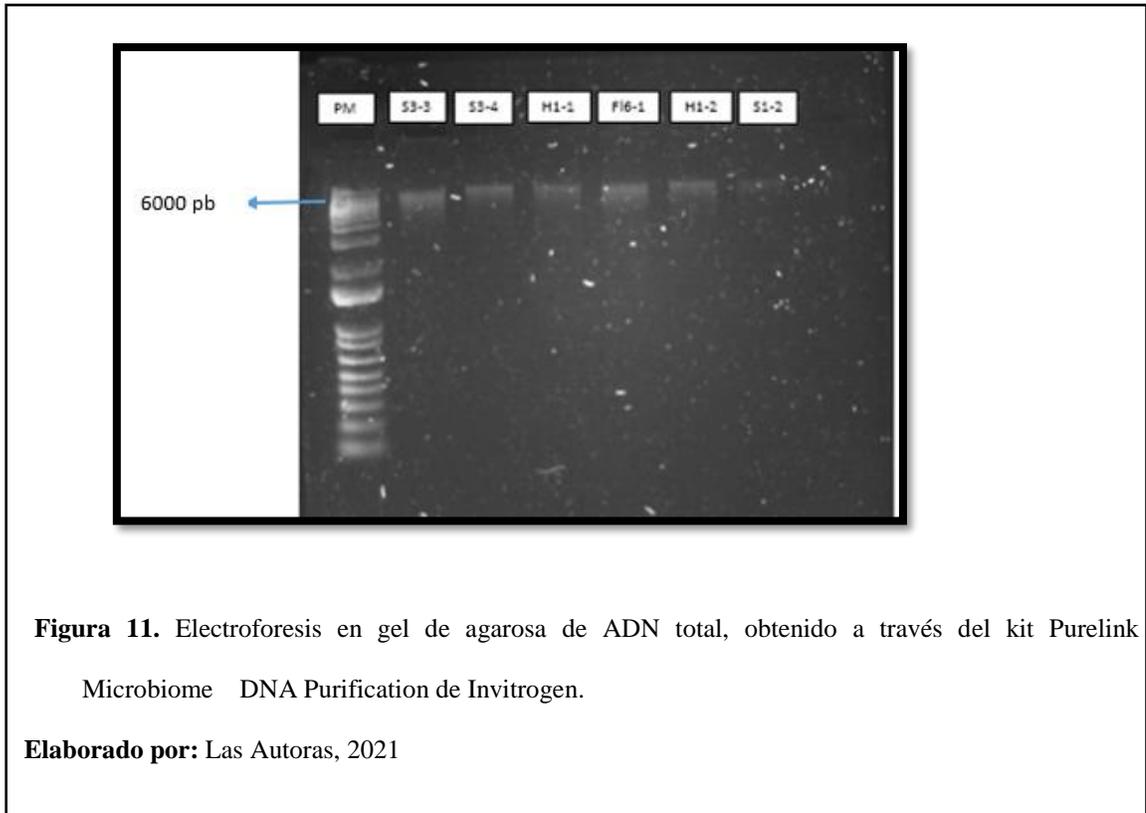


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de ADN total, obtenido a través del kit Purelink Microbiome DNA Purification de Invitrogen.

Elaborado por: Las Autoras, 2021

3.5 Amplificación de la región ITS

Para la amplificación se utilizó regiones espaciadoras internas transcritas de ADN ribosomal como son el forward ITS 1 y reverse ITS 4, los cuales son aplicados principalmente en hongos en cuanto al análisis de taxonomía y filogenia molecular (Andrade, Lapo, Reyna, & Baer, 2020).

Se pudo observar claramente las regiones amplificadas en donde el amplicon se encuentra entre 700 - 800 pb (Fig. 12), según (Paredes & Yugsi, 2016) los rangos de los valores en los que se lee las regiones ITS van desde los 350 pb hasta los 880 pb. Lo cual se verifica que el procedimiento

realizado es bueno ya que se cumple con los valores de los rangos establecidos, y también se puede determinar que la concentración de ADN fue correcta ya que los resultados de las bandas son claramente visibles.

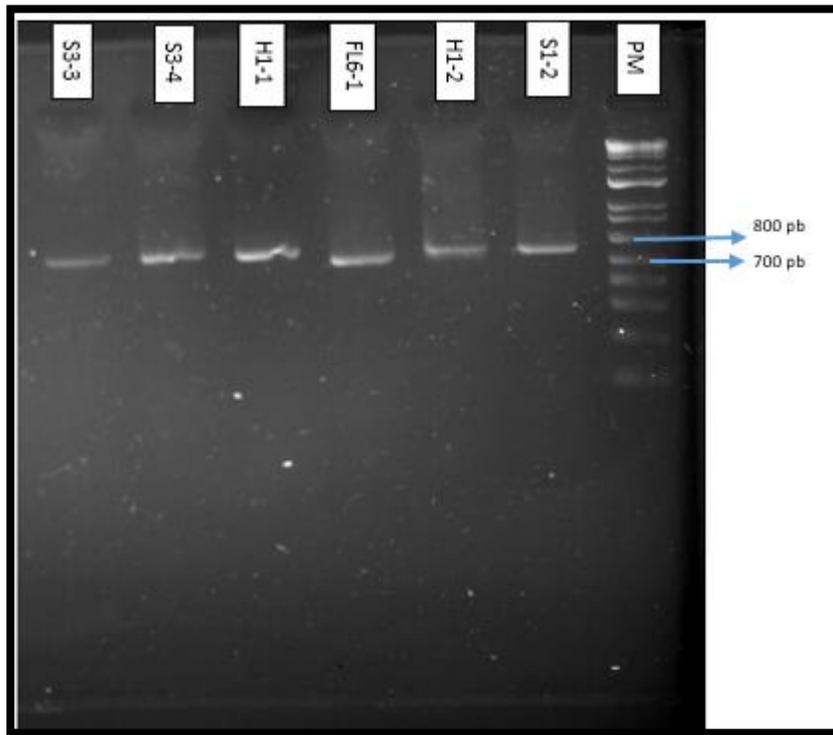


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa, amplificación del producto de PCR de sus regiones

Elaborado por: Las Autoras, 2021

3.6 Análisis de secuencias

La identificación se realizó en el programa Sequencing Analysis Software 6, en donde se corrió 6 muestras para determinar que especie corresponde cada una. Teniendo como resultado que las 5 cepas biocontroladoras son *Trichoderma*, mientras que la cepa FL6-1 es *Collectotrichum* el cual es el patógeno.

Las secuencias de las muestras se alineo mediante el programa BLAST (Standard Nucleotide BLAST) (Tabla 13) (Anexo 10).

Tabla 13.

Secuencias Alineadas

Código	Especie Identificada	Identidad (Ident)	Cobertura (QC)
S3-3	<i>Trichoderma asperellum isolate</i>	100%	100%
S3-4	<i>Trichoderma asperellum isolate</i>	100%	100%
H1-1	<i>Trichoderma paraviridescens isolate</i>	100%	100%
S1-2	<i>Trichoderma gamsii isolate</i>	99,81%	100%
Fl6-1	<i>Colletotrichum sp isolate</i>	100%	100%
H2-1	<i>Trichoderma asperellum isolate</i>	96,84%	100%

Elaborado por: Las Autoras, 2021

(Paredes & Yugsi, 2016) mencionan que el rango óptimo para una correcta identificación de cualquier microorganismo en cuanto a orden o género es de: IDENT 98-100 % y QC: 96-100 %.

Cuando se presentan estos dos parámetros con los valores óptimos se tiene una identificación de la especie del microorganismo, en el caso de que algunos de estos parámetros no se encuentren en los rangos establecidos solamente se obtendrá el género del microorganismo.

3.7 Masificación de *Trichoderma* en diferentes sustratos orgánicos

Los tres tratamientos para la producción de *T. asperellum* y *T. gamsii* (Tabla 14) se obtuvieron a partir de los residuos de maíz y arroz comercial, (Bautista et al., 2018) mencionan que existen algunas condiciones para el correcto desarrollo de *Trichoderma* como son la temperatura, humedad, aireación entre otras, mismas condiciones que se tuvieron presentes en el experimento realizado.

El crecimiento de *Trichoderma* se activa en presencia de humedad por lo que se realizó la medición de esta característica para cada sustrato, en el arroz se logró evidenciar un porcentaje de humedad del 40,67 % concordando con los resultados de (B. Martínez, InfanteI, & ReyesII, 2013) en donde menciona que el rango óptimo de porcentaje de humedad es de 60 % para el crecimiento de *Trichoderma*.

El porcentaje de humedad en la hoja y tusa de maíz es de 82,31 % y 76,85 % respectivamente (Raimbault, 1998) citado por Cumbajin & Flores, (2020) indica que el rango para el óptimo crecimiento del hongo se encuentra entre 30 y 85 % coincidiendo con los resultados obtenidos.

La temperatura de incubación para el crecimiento del hongo fue de 26 ± 2 °C debido a que es un factor muy importante para la producción de conidios, un estudio realizado por (Fernández, Maidana, & Maldonado, 2017) demuestra que para el género de *Trichoderma* la temperatura de

ideal es de 25 a 28 °C y (H. Vargas et al., 2012) describe que *T.asperellum* toleran temperaturas entre 4 a 30 °C, por lo que el rango de temperatura del estudio fue completamente viable.

Tabla 14.

Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Porcentaje de humedad (%)	Temperatura °C	Concentración inicial de esporas (ufc/mL)
Arroz	40,67	26 ±2	1x10 ⁸
Tusa de Maíz	76,85		
Hoja de Maíz	82,31		

Elaborado por: Las Autoras, 2021

3.8 Concentración de esporas de *Trichoderma*.

El análisis de varianza mostro una diferencia altamente significativa para las cepas y la interacción cepa*sustrato ya que presenta un valor de $p < 0,01$ y para los sustrato se evidenció una diferencia significativa con $p < 0,05$ por lo tanto se menciona que las cepas de *T. asperellum* y *T. gamsii* tienen diferente concentración en los diferentes sustratos a los 10 días de incubación.

En la tabla 15 se muestra que a los 10 días existe mayor concentración de conidios en la cepa S1-2 perteneciente a *T.gamsii* con una media de 5,02 ufc/g seguida de S3-4 y S3-3 *T.asperellum* con

3,95 y 3,62 ufc/g respectivamente, ambas cepas generaron micelio de color blanco a los 7 días sin embargo la producción de esporas se produjo a los 10 días concordando con la investigación realizada por (Arévalo *et al.*, 2017b) en donde menciona que el crecimiento de *Trichoderma* se da gradualmente, variando en la uniformidad sobre la superficie además de los nutrientes al que tenga acceso el microorganismo. Así mismo (Poalacin, 2015) plantea que entre mayor sea la coloración verdosa de *Trichoderma* mayor será la producción de conidios por esta razón se toma en cuenta los resultados obtenidos a los 20 días, en donde existe mayor producción de conidios, manteniendo a la cepa S1-2 con mayor concentración de esporas con una media de 8,71 ufc/g resultando ser la mejor cepa en cuanto a colonización, seguida de S3-4 y S3-3 con valores de 8,63 y 8,41 ufc/g respectivamente.

Tabla 15.

Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de concentración de conidios según la cepa

Cepa	Conteo 10 días	Conteo 20 días
	Medias ufc/g ± d.e	Medias ufc/g ± d.e
S1-2	5,02 ± 1,59a	8,71 ± 0,18a
S3-4	3,95 ± 0,67a	8,63 ± 0,16ab

S3-3	3,62 ± 0,52b	8,41 ± 0,32b
------	--------------	--------------

Nota: d.e = desviación estándar.

Elaborado por: Las Autoras, 2021

De acuerdo a la prueba de Tukey al 5 % realizada (Tabla 16), la concentración de conidios se dividen en dos grupos destacándose la hoja de maíz con un valor de 4,63 log (ufc/g) a los 10 días y 8,74 log (ufc/g) a los 20 días (Nugra, 2018) afirma que la producción de esporas de *Trichoderma* en hoja de maíz se da a partir del quinto día pero la concentración final es de 8,49 log (ufc/g) al octavo día, cabe resaltar que en su investigación se usa aproximadamente 7 g de sustrato de hoja de maíz es decir 14 veces menos de las usadas en estos ensayos, por otra parte (Cumbajin & Flores, 2020) afirman que la hoja de maíz tiene buena producción de conidias a los 28 días con un valor de 7,50 log (ufc/g) siendo el mejor tratamiento, con estos datos se puede analizar que la hoja de maíz es el mejor sustrato para la siembra de *Trichoderma*, seguido de la tusa de maíz con una concentración de 4,51 log (ufc/g) y 8,53 log (ufc/g) existen pocos estudios que demuestran que la tusa de maíz es apta para el crecimiento de *Trichoderma* sin embargo (Nugra, 2018) afirma que la producción de esporas en tusa de maíz es menor que otros sustratos orgánicos como la cáscara de naranja.

Finalmente para el arroz se tuvo una concentración de 3,44 log (ufc/g) a los 10 días y 8,49 log (ufc/g) a los 20 días, a pesar de tener un buena concentración de conidias esta es baja en comparación a la hoja y tusa de maíz (López, 2012) en su estudio plantea que para obtener altas concentraciones de *T. asperellum* debe existir una humedad del sustrato de entre 28,58 % y 29,27 % lo que difiere este estudio ya que el porcentaje de humedad es de 40,67 esta es una razón para

que el microorganismo no produzca gran cantidad de esporas, así mismo (Hernández, Rodríguez, & Castellanos, 2016) recomiendan usar pocas cantidades de arroz ya que al emplearse gran cantidad de sustrato este tiende a compactarse lo que impide la colonización total de la superficie y la disminución de la concentración de conidios.

Tabla 16

Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de concentración de conidios (ufc) según el sustrato

Sustrato	Conteo 10 días	Conteo 20 días
	Medias ufc/g ± d.e	Medias ufc/g ± d.e
Hoja de maíz	4,63 ± 1,03a	8,74 ± 0,23 a
Tusa de maíz	4,51 ± 1,49a	8,53 ± 0,27ab
Arroz	3,44 ± 0,45b	8,49 ± 0,22b

Elaborado por: Las Autoras, 2021

La prueba Post Hoc Tukey que se elaboró (Tabla 17), se detalla las medias de la concentración de esporas de la interacción cepa* sustrato.

En los diferentes sustratos donde la interacción S1-2 arroz y S1-2 hoja de maíz tienen la mayor concentración de esporas, seguidas de las muestras S3-4 de hoja de maíz y S3-3 de arroz.

Tabla 17

Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de concentración de interacción de cepas*sustratos.

Concentración 10 días (ufc)			Concentración 20 días (ufc)		
Cepa	Sustrato	Medias ufc/g ± d.e	Cepa	Sustrato	Medias ufc/g ± d.e
S1-2	Tusa de Maíz	6,36 ± 0,62a	S1-2	Tusa de Maíz	8,80 ± 0,05a
S1-2	Hoja de Maíz	5,66 ± 0,71 ab	S3-4	Hoja de Maíz	8,79 ± 0,05a
S3-4	Hoja de Maíz	4,57 ± 0,62b	S1-2	Hoja de Maíz	8,78 ± 0,22 a
S3-3	Arroz	3,96 ± 0,12bc	S3-4	Arroz	8,68 ± 0,07a
S3-4	Tusa de Maíz	3,95 ± 0,41c	S3-3	Hoja de Maíz	8,65 ± 0,38a

S3-3	Hoja de Maíz	3,66 ± 0,56cd	S1-2	Arroz	8,55 ± 0,18 a
S3-4	Arroz	3,33 ± 0,35cd	S3-4	Tusa de maíz	8,44 ± 0,06 a
S3-3	Tusa de Maíz	3,24 ± 0,55 cd	S3-3	Tusa de maíz	8,36 ± 0,35 a
S1-2	Arroz	3,03 ± 0,12 d	S3-3	Arroz	8,23 ± 0,04 a

Elaborado por: Las Autoras, 2021

3.9 Viabilidad de conidias

La viabilidad fue determinada a los 25 días de incubación de *T.gamssi* y *T.asperellum*, mediante el análisis de varianza, se evidenció que existe diferencia altamente significativa para la variable sustrato con un valor de $p < 0,0001$ y un valor de (F) de 65,01 mientras que para las variables cepa y cepa*sustrato no existió diferencia significativa con valores de p-valor (0,0003) y (0,2014) respectivamente, con variaciones entre las medias de las muestras (F) de 12,84 para sustrato y 1,67 para cepa*sustrato

Los porcentajes de viabilidad que se presentan en la prueba Tukey (Tabla 18) nos indican la diferencia que existe entre el porcentaje mayor y el porcentaje menor es de 28,7 %, teniendo así que el mejor sustrato es la Hoja de Maíz con la cepa S1-2 ubicándose en el primer rango (a) con una viabilidad de 91,08 %, seguido de la Tusa de Maíz con la cepa S3-4 colocándose en el segundo

rango (b) con 83,59 % de viabilidad y en el último rango (c) el sustrato Arroz con la cepa S3-3 con un porcentaje de 62,30 % (Gómez et al., 2013).

Los tratamientos realizados con hoja de maíz y tusa de maíz muestran un porcentaje alto de viabilidad indicando que en estos sustratos no se tiene sustancias que afecten a la germinación de las esporas, lo contrario que sucedió con el arroz que en este sustrato no se obtuvo una buena esporulación esto se puede deber a que el hongo tiene una acción negativa frente a este sustrato y teniendo así una viabilidad baja y la cual no puede ser utilizada para aplicarla en campo (Aceves, Sanchez, & Morán, 2008).

En la prueba Tukey nos indica que se tiene mismos rangos pero diferentes medias para cada cepa esto se puede deber a que hay factores que afectan a la viabilidad de los hongos, estos factores pueden ser el pH del medio de cultivo, edad de las células, la temperatura de almacenamiento, el empleo de agentes crioprotectores (Cárdenas, 2010).

Tabla 18.

Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 % de viabilidad de conidias.

Viabilidad de conidios			
Cepas 25 días		Sustratos 25 días	
Cepa	Medias % de viabilidad ± d.e	Sustrato	Medias % de viabilidad ± d.e

S1-2	85,78 ± 13,94a	Hoja de Maíz	91,08 ± 6,04a
S3-4	78,67 ± 16,89b	Tusa de maíz	83,59 ± 7,99b
S3-3	72,52 ± 10,82b	Arroz	62,30 ± 9,69c

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Conclusiones

Se logró aislar las 94 cepas de hongos de los tres lugares de la provincia de Tungurahua.

El alineamiento de las muestras mediante el programa BLAST (Standard Nucleotide BLAST), permitieron obtener un Ident del 100 % y una cobertura de QC del 100 % para las cepas S3-3, S3-4, H1-1, S1-2, teniendo una variación de QC de 96,84 % en la cepa H2-1.

Se logró obtener la cepa del hongo *Trichoderma asperellum isolate* (S3-3) con mayor potencial biocontrolador frente a *Colletotrichum*, presentando un PICR de 84,15 % y ubicándose en la clase 2 de acuerdo a la escala de Bell.

Se determinó que el mejor sustrato para la producción de esporas de *Trichoderma* fue la hoja de maíz con una humedad de 82,31 %, temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ una concentración de 8,74 log (ufc/g) a los 20 días de la siembra del inóculo inicial, mientras que la cepa que generó mayor concentración de esporas fue S1-2 *T. gamsii* y con una viabilidad del 91,8 % .

Recomendaciones

Hacer alícuotas con las muestras de ADN extraídas, para evitar la degradación o desnaturalización del material genético.

Utilizar cebadores universales y específicos para la región ITS de la especie a secuenciar.

Validar el sustrato en base a hoja de choclo en masificación y escalamiento de la producción de *Trichoderma*.

Realizar aplicaciones en campo de las cepas obtenidas en este trabajo en los cultivos de tomate de árbol.

Bibliografía

- (SIPSA) Sistema de Información de Precios y Abastecimiento del Sector Agropecuario. (2014). *Antracnosis, importancia y manejo integrado en el cultivo de tomate de árbol (Cyphomandra betaceae). Prevención: la mejor alternativa*. Retrieved from <http://www.catalunyaplants.com>
- Aceves, A., Sanchez, M., & Morán, N. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos.
- Acurio, R., Ñacato, C., & Valencia, M. (2017). Cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol in vitro de *Alternaria* spp . en Brassica oleracea var . italica . *Bionatura Latin American Journal of Biotechnology and Life Sciences*, 3, 607–611. <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.02.8>
- Alminate, G. (2017). *Evaluación in vitro de la germinación y viabilidad del polén de Tomate de árbol (Solanum betaceum), en función del tiempo de almacenamiento*. (Universidad de las Américas). Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8038/1/UDLA-EC-TIAG-2017-34.pdf>
- Andrade, H., Lapo, J., Reyna, A., & Baer, N. (2020). Estandarización de PCR con primers para la región ITS en ADN vegetal.
- Arboleda, T., Diaz, A., & Rios, L. (2019). Biological control strategies used for the management of antracnosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in mango: a systematic Review. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(3), 595–611. Retrieved from <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2699>
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, B., & Leon, B. (2017a).

Optimización de sustratos para la producción de conidias de Trichoderma harzianum. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. 19, 135–144.

Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, B., & Leon, B. (2017b). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum* por fermentación sólida en la Region de San Martin Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 19(2), 135–144. <https://doi.org/10.18271/ria.2017.272>

Bailey & Scott. (2009). *Diagnóstico Microbiológico - Betty A. Forbes* (12th ed.). Médica Panamericana.

Barrera, S. (2018). *Caracterización genotípica y de virulencia de Colletotrichum tamarilloi y Colletotrichum sp. causantes de la antracnosis en tomate de árbol* (Universidad Central del Ecuador). Retrieved from <http://200.12.169.19:8080/bitstream/25000/15051/1/T-UCE-0004-A75-2018.pdf>

Bautista, E., Mesa, L., & Gómez, M. (2018). Alternatives for the production of microbial biopesticides based on fungi: the case of Latin America and the Caribbean. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 585–604. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.15>

Biomodel. (2014). Recursos educativos digitales.

Caicedo, J. D., Lalangui, K. P., Pozo, A. N., Cevallos, P. A., Arahana, V. S., & Méndez, K. S. (2017). Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 983–996. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1155-3>

- Calvo, J., Rivera, G., Orozco, S., & Orozco, R. (2012). Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 225–231. Retrieved from http://www.mag.go.cr/rev_meso/v23n02_0225.pdf
- Cámara de Comercio de Bogotá. (2015). *Manual:Tomate de árbol*. Bogotá-Colombia: Núcleo Ambiental S.A.S.
- Cangás, C. (2019). “Eficacia de la aplicación de fitohormonas y fosfitos, en el cuajado, rendimiento y calidad del fruto, en el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav), Cantón Montúfar.” (Universidad Politécnica Estatal del Carchi). Retrieved from chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?pdf=http%3A%2F%2F181.198.77.143%2Fbitstream%2F123456789%2F829%2F1%2F360%2520Eficacia%2520de%2520la%2520aplicaci%25c3%25b3n%2520de%2520fitohormonas%2520y%2520fosfitos%252c%2520en%2520
- Cárdenas, Y. (2010). *Métodos de conservación y formulación de Trichoderma harzianum Rifai* (Vol. 14).
- Carranza, L. (2019). *Estudio agroproductivo del cultivo de tomate de árbol (Solanum betaceum) en la parroquia del cantón Chiquicha en el cantón Pelileo provincia de Tungurahua*. Universidad Estatal de Bolívar, Pelileo.
- Castro, P., Bravo, C., Cabrera, A., Quillay, N., Ramón, M., Belesaca, I., & Diaz, L. (2019). Caracterización morfológica y molecular del agente causal de la antracnosis en tomate de árbol en Azuay y Loja. *Revista Indexada Bosques Latitud Cero*, 9(1), 1–15.
- Cerón, L., Higuera, B., Sánchez, J., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2006). Crecimiento y

- desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos. In *Acta Biológica Colombiana* (Vol. 11). Bogotá.
- Chacon, M., Rivera, G., Villalobos, K., Orozco, R., & Orozco, S. (2017). Evaluación de hongos antagonistas de *Botrytis cinerea* pers., en plantaciones de mora, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 41(1), 7–18. <https://doi.org/10.15517/rac.v41i1.29737>
- Chamba, J. (2018). *Caracterización molecular de un grupo de segregantes y de cuatro variedades comerciales de tomate de árbol Solanum betaceum*. Universidad Central del Ecuador.
- Collaguazo, A., & Tenorio, E. (2018). *Elaboración de biopreparados a base de Bacillus sp. para controlar Alternaria spp. en el cultivo de Brassica oleracea var. italica*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/280731680>
- Cruz, A. (2018). *Extractos de Neem (Azadirachta indica A. Juss.) para el control de la mosca blanca (Bemisia tabaci Genn.) en el cultivo de tomate* (Universidad Autónoma de Nuevo León). Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/16025/1/1080290872.pdf>
- Cumbajin, A., & Flores, A. (2020). Evaluación de sustratos orgánicos destinados a la propagación de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador para fincas agroecológicas de la ASOCAMCAY, al norte de la provincia de Pichincha-Ecuador (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Dávila, M. (2016). *Estudio de factibilidad para la producción de tomate de árbol en la provincia de Imbabura y su comercialización en los mercados del Distrito Metropolitano de Quito*. Universidad Central del Ecuador, Quito.
- De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2, 70–78. Retrieved from www.medigraphic.org.mx
- Duarte, Y., Echevarría, A., & Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3), 173–183.
- EL COMERCIO. (2019, January 15). Ecuador envía 600 kilos de tomate de árbol por primer vez a EE.UU. | El Comercio. Retrieved February 14, 2021, from <https://www.elcomercio.com/actualidad/exportacion-tomate-arbol-estados-unidos.html>
- Escobar, P. (2017). Influencia de tres métodos de conservación sobre la estabilidad y producción del hongo *Pleurotus ostreatus*. *Instituto de Investigación En Microbiología y Biotecnología Agroindustrial*.
- ESPAC, & INEC. (2018). *Superficie según producción y ventas de tomate de árbol (fruta fresca) por provincia y región*. Retrieved from www.ecuadorencifras.gob.ec
- Espino, Á., Morales, J., Pedraza, M., & Morales, K. (2017). Pruebas de antagonismo con hongos

- asociados al síntoma de marchitez de árboles de aguacate en Michoacán, México. *Memorias Del V Congreso Latinoamericano Del Aguacate*, 173–180.
- Espinoza, C., & Vallejos, F. (2016). *Desarrollo de formulaciones bioplaguicidas a base de Beauveria bassiana (Bals & Vuils) con materiales sólidos y líquidos*. Universidad Nacional Agraria , Managua - Nicaragua .
- Feicán, C., Encalada, C., & Becerril, A. (2016). Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Retrieved September 28, 2020, from Agroproductividad website:
https://www.researchgate.net/publication/312938646_DESCRIPCION_AGRONOMICA_DE_EL_CULTIVO_DE_TOMATE_DE_ARBOL_Solanum_betaceum_Cav
- Fernández, E., & Vásquez, S. (2010). Control biológico de la Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc.) en Tomate de Árbol (*Solanum betaceum* Cav.) mediante hongos endófitos antagonistas. *La Granja* , 11(1), 36–43. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047395006>
- Fernández, M., Maidana, M., & Enciso, G. (2017). Molecular identification and growth rate of native strains of *Trichoderma* spp. isolated from the Northern Region of Paraguay. *Investigación Agraria*, 19(2), 127–132.
<https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2017.diciembre.127-132>
- Fisher Scientific, T. (2006). *BigDye X Terminator Purification Kit Quick Reference (Pub. No. 4383427 C)*.
- Fuertes, B., & Mallitasig, D. (2018). *Identificación morfológica y molecular de hongos*

micorrízicos de especies del género Dracula y Epidendrum D (Orchidaceae).

Gallou, A., Suaste, A., Serna, M., & Andrade, G. (2015). *Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular.*

Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño Zapata, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339. <https://doi.org/10.18257/racefyn.192>

Garzón, R. (2015). *Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de tomate de árbol (Solanum betaceum), Sector Patain – Cotopaxi.* Latacunga-Cotopaxi.

Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M., & Torres, E. (2013). *Manual de Producción y Uso de Hongos Antagonistas.* Perú.

Greif, G. (2012). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.* Retrieved from www.karymullis.com

Guamán, M. (2018). *Caracterización morfológica, molecular y de resistencia a fungicidas de Colletotrichum sp., aislado de tomate de árbol (Solanum betaceum).* Universidad Central del Ecuador.

Hernández, D., Ferrera, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma: Agricultural and biotechnological importance, and fermentation systems for producing biomass and enzymes of industrial interest.* *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 35(1), 98–112. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>

Hernández, M., Rodríguez, A., & Castellanos, L. (2016). Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato arroz entero para la reproducción de *Trichoderma* spp. *Agroecosistemas/ Revista Para La Transformación Agraria Sostenible*, 4, 39–45.

Hernández, N., Bautista, S., Velázquez, M., & Hernández Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Retrieved March 23, 2020, from Revista Mexicana de Fitopatología website: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009

Hidalgo, E., & Osorio, E. (2013). *Evaluación y determinación de la capacidad secuestrante de los metales pesados cromo (Cr) y cadmio (Cd) por taxas de mohos aisladas de los alrededores de los ríos Cutuchi y Machángara*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito.

ICIA. (2015). Instituto Canario de Investigaciones Agrarias .

Ideas Biológicas. (2018). *Plan fitosanitario: cuidado del cultivo de Tomate de árbol*. Retrieved from www.ideasbiologicas.com

IECA. (2015). Laboratorio de Microbiología del suelo. Retrieved from Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales website: https://www.icia.es/icia/index.php?option=com_content&view=article&id=3065&Itemid=420

Infante, A. (2011). *Manual Biopreparados para la agricultura ecológica* (pp. 7–35). pp. 7–35. Santiago de Chile.

Infante, D., & Martínez, B. (2019). *Samuels , Lieckfeldt & Nirenberg sobre aislados de diferentes grupos anastomósicos de Rhizoctonia solani Kühn Antagonistic activity of Trichoderma*

asperellum Samuels , Lieckfeldt & Nirenberg on isolates of different anastomosis groups of *Rhizoctonia solan*. 34(2), 1–7.

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*, 24(2), 14–21.

Invitrogen. (2006). *DNA reference guide Sample preparation and purification solutions*.

IPES/FAO. (2010). *Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana*. Retrieved from www.ipes.org

Jacome, L., Hernández, M., Colín, C., Cerón, G., & Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. 3, 7–8.

Jara, A. (2011). *Screening de hongos del suelo ante microorganismos fitopatógenos*. Universidad de Cuenca, Cuenca.

Lalangui, K. (2015). *Caracterización morfológica y molecular de Colletotrichum spp., en tomate de árbol (Solanum betaceum) en la sierra ecuatoriana*. Universidad Central del Ecuador, Quito.

Landero, N., Lara, F., Andrade, P., Aguilar, A., & Aguado, G. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000501189

Larrea, J. (2002). Efecto de la fertilización química y orgánica en el tomate de árbol. Retrieved October 27, 2020, from 2003 website: <https://books.google.com.ec/books?id=DokzAQAAMAAJ&pg=PA6&dq=Fenología+del+to>

mate+de+árbol&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj22ezgxtXsAhWPmVkkHRMECh8Q6AEw
AXoECAkQA#v=onepage&q=Fenología del tomate de árbol&f=false

López, Y. (2012). *Producción y formulación de Trichoderma asperellum para el manejo de patógenos de la raíz de caña de azúcar*. 7(3).

Marquez, R. (2017). *Micología- Microbiología ambiental*. 8–9.

Martillo, J., Lesmé, R., Oliva, L., Martínez, A., & Electo, E. (2019). Análisis de ciclo de vida del aprovechamiento energético de los residuos (tusa) de la cosecha de maíz (*Zea mays*) en la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Tecnología Química*, 39(3), 655–672.

Martínez, B., InfanteI, D., & ReyesII, Y. (2013). *Trichoderma* spp. and their role in the control of crop pests. *Rev. Protección Veg*, 28(1), 1–11.

Martínez, M. (2020). *Comparación del efecto antagonista entre Trichoderma spp., Bacillus licheniformis Y Bacillus polymyxa sobre hongos fitopatógenos de la papa sobre (Solanum tuberosum) en condiciones in vitro* (Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez).
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19931.92967>

Méndez, A., Pozo, E., & García, I. (2009). Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Rev. Protección Veg.*, 24(3), 156–161.

Moreno, C., Molina, J., Ortiz, J., Peñafiel, C., & Moreno, R. (2020). The value chain of tree tomato (*Solanum betaceum*) network in Ecuador. *Agronomy Mesoamerican*, 31(1), 13–29.
<https://doi.org/10.15517/AM.V31I1.36887>

Munir, M. (2015). *Characterization of Colletotrichum species causing bitter of apples in Kentucky*

Orchards. University of Kentucky.

Nugra, A. (2018). *Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del Trichoderma spp.*

Universidad Politécnica Salesiana.

Oderay, C., Tinoco, O., Jaramillo, M., & Arrequín, M. (2016). Evaluación de los suplementos nutritivos sobre sustratos sólidos para la producción en masa de *Beauveria bassiana*(bálsamo)

Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin nativos en el laboratorio.

Retrieved March 25, 2020, from Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO), FIGMMG-

UNMSM

website:

<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/12951/11568>

Orjuela, D. (2018). Microorganismos endófitos como alternativa para el control de hongos patógenos asociados al cultivo de aguacate en Colombia. *Universidad Nacional de Colombia-Facultad de Ciencias*, 84–85.

Padilla, J. (2019). *Caracterización morfo molecular de aislados fúngicos con capacidad de biosorción de metales pesados.*

Parachimba, A. (2018). *Evaluación de población segregante de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) con tolerancia/resistencia a Colletotrichum tamarilloi.* Universidad Central del Ecuador.

Paredes, M., & Yugsi, E. (2016). *Identificación de cepas de levaduras con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica aisladas de Pitahaya (Stenocereus queretaroensis f.a.c Weber).* Universidad Politécnica Salesiana, Quito.

Pineda, A., Benavides, E., Duarte, A., Burgos, C., Soto, C., Pineda, C., ... Álvarez, S. (2017).

- Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revis. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 51, 47–52. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223153894008>
- Pinedo, S., & Ball, E. (2020). Next generation sequencing: use in dermatology. *Med Cutan Iber Lat Am*, 48(1), 47–62. <https://doi.org/10.35366/93979>
- Pinto, L., & Tiaguaro, K. (2012). *Caracterización patológica y molecular de la antracnosis del tomate de árbol (Solanum betaceum) y chocho (Lupinus mutabilis)*. Escuela Politécnica del Ejército.
- Pinzón, Y., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2009). *Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Poalacin, J. (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma harzianum y Trichoderma hamatum en sustrato sólido*. Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador.
- Prado, M., Anzaldo, J., Becerra, B., Palacios, H., Vargas, J., & Rentería, M. (2012). Caracterización de hojas de mazorca de maíz y de bagazo de caña para la elaboración de una pulpa celulósica mixta. *Madera Bosques*, 18(3), 37–51. <https://doi.org/10.21829/myb.2012.183357>
- Ramírez, J., Trujillo, J., Osorio, V., Jaramillo, M., & Botero, L. (2019). In vitro antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, and *Fusarium oxysporum*. *Revista UIS Ingenierías*, 18(2), 159–166. <https://doi.org/10.18273/revuin.v18n2-2019015>
- Ríos, M. (2010). *Control Biológico de la Antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides Penz) en tomate de árbol (Solanum betaceum), en el ecotipo : Amarillo puntón, mediante hongos*

endófitos antagonistas. (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3806/1/UPS-CT001974.pdf>

Rivera, W., Meneses, K., & Zuñiga, C. (2015). Antagonismo de *Trichoderma* sp. ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla *Trichoderma's* antagonism in front of the pathogen *Stromatinia cepivora* in onion crops.

Rodríguez, E., González, J., & Mayek, N. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 53–63.

Rodríguez, M. (2007). *Determinación de la composición química y propiedades físicas y químicas del pulido de arroz (Oryza sativa L.)*. Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile.

Rojas, G. (2020). *Sensibilidad in vitro de cinco aislados de Trichoderma spp., a fungicidas*. Universidad Autónoma del Estado de México.

Romero, D., Vázquez, H., Reyes, B., Arzaluz, J., & Martinez, A. (2013). Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(1), 51–59.

Saltos, N. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulwarthia grandispora*. 91.

Sanchez, A., Sosa, M., & Reybet, G. (2011). *Biocontrol de patógenos del suelo con Trichoderma*. Retrieved from <http://sites.google.com/site/>

Sánchez, L. (2016). *Identificación y caracterización de hongos de interés para su uso industrial y,*

en especial, en la industria alimentaria mediante el uso de métodos moleculares. Universidad Pública de Navarra.

Sanmartín Negrete, P. (2012). Análisis del modo de acción de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Tumbaga*, 2(7), 3.

Sharma, M., & Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides*: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables | Biosciences Biotechnology Research Asia. *Biosciences Biotechnology*, 12(2). Retrieved from <http://www.biotech-asia.org/vol12no2/colletotrichum-gloeosporioides-an-anthracnose-causing-pathogen-of-fruits-and-vegetables/>

Sucaticona, F. (2018). *Actividad antagónica in vitro de los hongos Trichoderma spp y Lecanicillium spp. frente al hongo de la roya amarilla del café (Hemileia vastatrix) en condiciones de laboratorio.* Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.

Tamayo, P. J. (2003). *Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia.* Colombia.

Tamba, M. V. (2014). *Selección de materiales promisorios de tomate de árbol (Solanum betaceum) con resistencia a antracnosis (Colletotrichum acutatum), productividad y calidad del fruto* (Universidad Centarl del Ecuador). Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2480>

Thermo Fisher Scientific. (2017). *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup.*

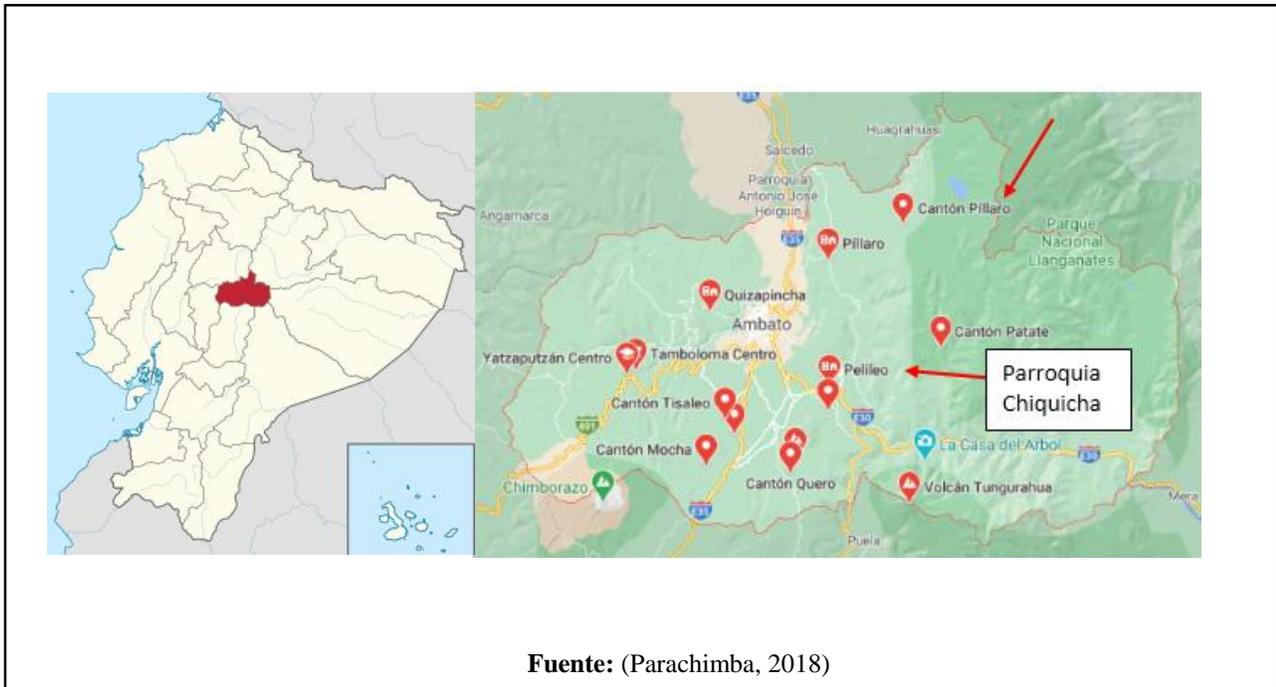
Vargas, H., Rueda, E., & Gilchrist, E. (2012). Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (Fungi: Ascomycota) a diferentes temperaturas. *Acta Biologica*, 34(96), 103–112.

Vargas, J. (2019). *Germinación y crecimiento de plántulas de tomate de árbol (Cyphomandra betacea) variedad amarillo, utilizando el compost, humus de lombriz y arena de río Vilcabamba-Grau*. Universidad Nacional Micaela Bastias de Apurímac.

Vásquez, L., & Castaño, J. (2017). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 363–374. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v20n2/v20n2a14.pdf>

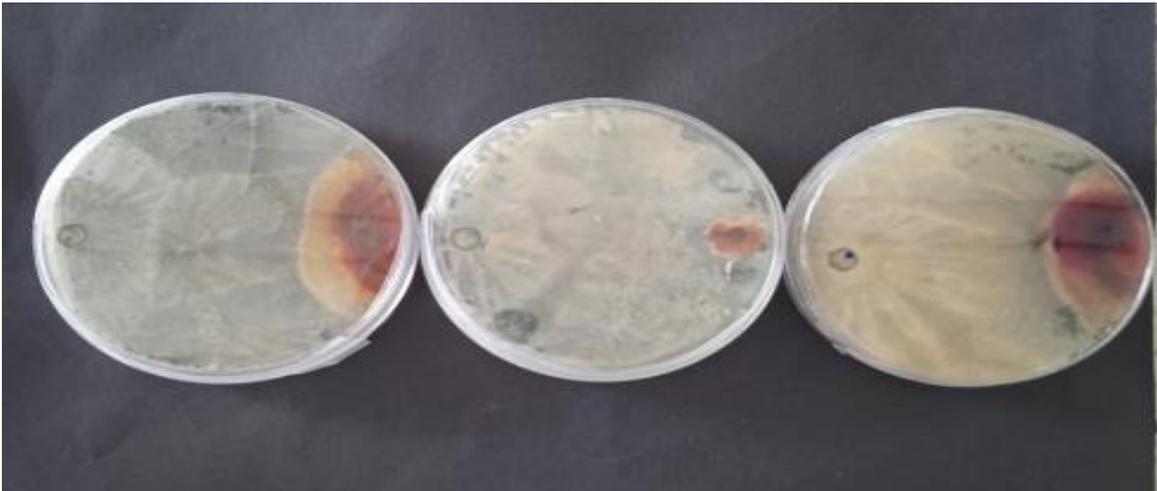
Anexos

Anexo 1. Ubicación Geográfica de los lugares de muestreo en la provincia de Tungurahua

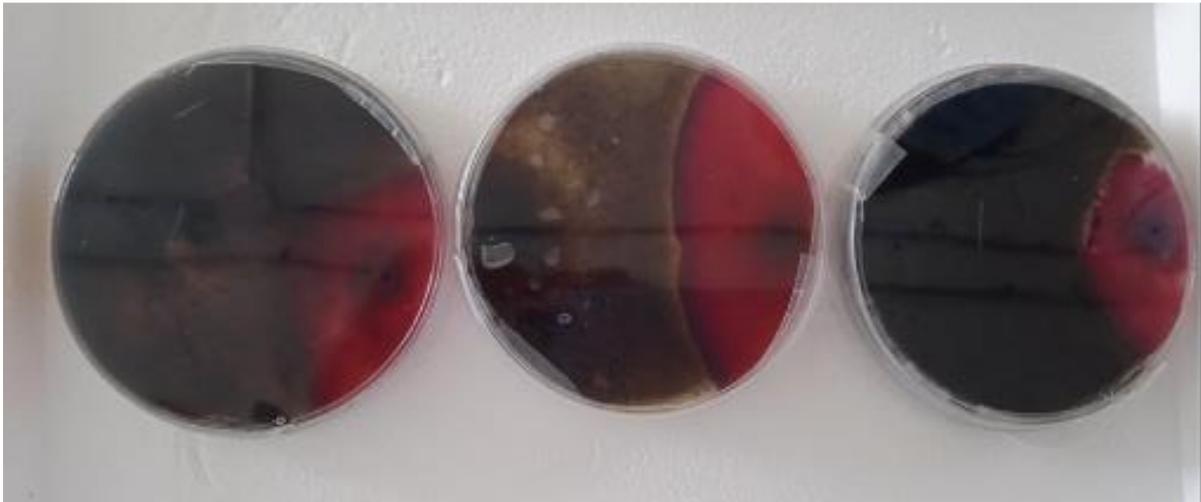


Anexo 2. Patógeno y posible biocontrolador en enfrentamiento mediante la técnica de cultivos duales.

- S3-3

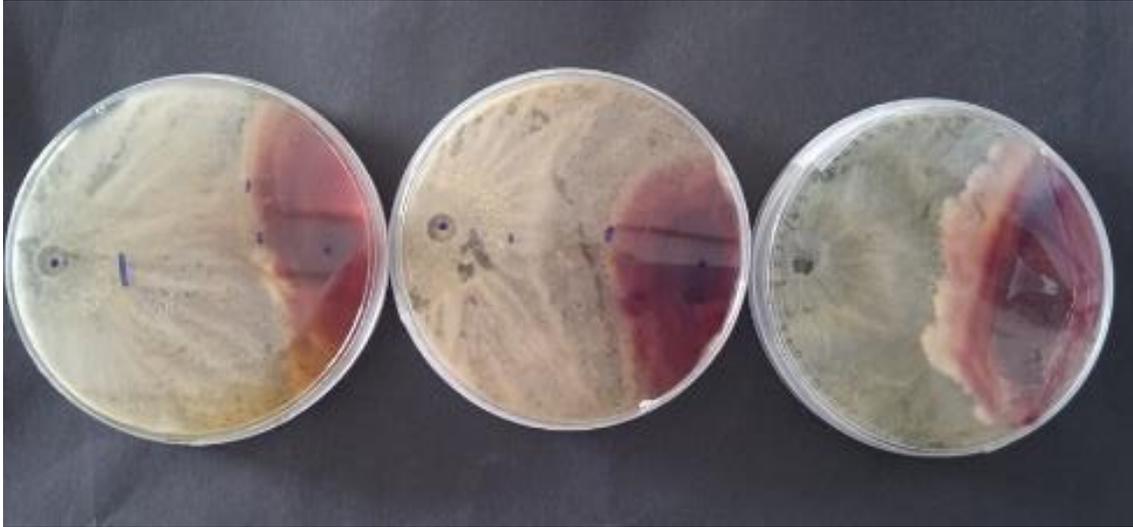


- H2-1



Elaborado por: Las Autoras, 2021

- S3-4



- H1-1



- S1-2



Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 3. Resumen de mediciones de hongos a las 48 h, 120 h, 160 h.

Localidad	Código	Numeración	Patógeno/Biocontrolador	Primera medición (cm) 48h	Segunda Medición (cm) 120h	Tercer Medición (cm) 168h
PILLARO	S3-3	1	Patógeno	0,75	1,57	1,57
			Biocontrolador	1,88	5,22	5.53
		2	Patógeno	0,86	0,86	0,86
			Biocontrolador	2,39	6,27	4,69
		3	Patógeno	0,53	1,28	1,28
			Biocontrolador	1,77	5.22	5.22
	S3-4	1	Patógeno	0,86	1.27	1.27
			Biocontrolador	1,77	4,18	4.20
		2	Patógeno	1.12	1.59	1.59
			Biocontrolador	1,78	3.56	3.58
		3	Patógeno	0.64	1,68	1,68
			Biocontrolador	1,39	4.54	4.56
	S2	1	Patógeno	0,61	1,53	2,91

CHIQUICHA		2	Biocontrolador	1.1	2.20	2,6
			Patógeno	0,53	1.56	2,84
		3	Biocontrolador	1,01	2,31	2,84
			Patógeno	0.65	2.0	2.80
		3	Biocontrolador	1.5	2,29	2,90
			Patógeno	0,90	2,14	2.14
	H1-1	1	Biocontrolador	2.33	3.73	4.83
			Patógeno	0,63	1,68	1.68
		2	Biocontrolador	1.86	4.83	4.83
			Patógeno	0.73	1.84	1,86
		3	Biocontrolador	1,92	4.38	4.39
			Patógeno	0,9	1,28	1,28
S1-2	1	Biocontrolador	0.9	2,92	4.83	
		Patógeno	0,4	1,18	1,20	
	2	Biocontrolador	2,83	5.30	5.35	
		Patógeno				

		3	Patógeno	0,94	1,68	1,70	
			Biocontrolador	2,81	4,66	4,68	
	FL6-1	1	Caja control Patógeno	1,3	2,4	7,8	
CHIQUICHA (2)	H2-1	1	Patógeno	0,73	1,68	2,71	
			Biocontrolador	1,85	3,72	4,27	
		2	Patógeno	0,63	1,48	1,50	
			Biocontrolador	2,24	4,64	4,73	
		3	Patógeno	0,63	2,12	2,14	
			Biocontrolador	1,77	3,91	3,94	
	H3-3	1	Patógeno	0,86	1,94	2,94	
			Biocontrolador	0,94	1,36	2,87	
		2	Patógeno	0,76	1,38	3,22	
			Biocontrolador	0,73	1,83	2,79	
		3	Patógeno	0,74	1,93	3,19	
			Biocontrolador	0,83	2,22	3,15	

	S2-1	1	Patógeno	0,84	1,28	3,16
			Biocontrolador	1,81	2,71	2,99
		2	Patógeno	0,55	3,24	3,94
			Biocontrolador	1,76	2,65	3,21
		3	Patógeno	0,52	2,13	3,67
			Biocontrolador	1,58	2,08	3,21

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 4. Resumen medición *Collectotrichum*

Localidad	Código	Numeración	Patógeno/Biocontrolador	Primera medición (mm) 48 h	Segunda Medición (cm) 120 h	Tercer Medición (cm) 168 h
Chiquicha	Fl6-1	1	Patógeno (Testigo)	1,3	2,4	7,8

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 5. Promedio PICR del hongo patógeno *Collectotrichum* sp a las 48 h

Código	Número de Repetición	Hongo	Primera medición (mm) 48h	PICR
S3-3	1	Patógeno	0,75	42,307692
	2	Patógeno	0,86	33,846154
	3	Patógeno	0,53	59,2307692
S3-4	1	Patógeno	0,86	33,8461538
	2	Patógeno	1,12	13,8461538
	3	Patógeno	0,64	50,7692308
S2	1	Patógeno	0,61	53,0769231
	2	Patógeno	0,53	59,2307692
	3	Patógeno	0,65	50
H1-1	1	Patógeno	0,9	30,7692308
	2	Patógeno	0,63	51,5384615
	3	Patógeno	0,73	43,8461538
S1-2	1	Patógeno	0,9	30,7692308
	2	Patógeno	0,4	69,2307692
	3	Patógeno	0,94	27,6923077
H2-1	1	Patógeno	0,73	43,8461538
	2	Patógeno	0,63	51,5384615
	3	Patógeno	0,63	51,5384615
H3-3	1	Patógeno	0,86	33,8461538
	2	Patógeno	0,76	41,5384615
	3	Patógeno	0,74	43,0769231
S2-1	1	Patógeno	0,84	35,3846154
	2	Patógeno	0,55	57,6923077
	3	Patógeno	0,52	60

Código	Promedio PICR	Desviación Estándar
S3-3	45,128205	12,952135
S3-4	32,820513	18,482894
S2	54,102564	4,7000776
H1-1	42,051282	10,500305
S1-2	42,564103	23,145198
H2-1	48,974359	4,4411559
H3-3	39,48718	4,9454619
S2-1	51,025641	13,594581

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 6. Promedio PICR del hongo patógeno *Collectotrichum* sp a las 120 h

Código	Número de Repetición	Hongo	Primera medición (mm) 120 h	PICR
S3-3	1	Patógeno	1,57	34,5833333
	2	Patógeno	0,86	64,1666667
	3	Patógeno	1,28	46,6666667
S3-4	1	Patógeno	1,27	47,0833333
	2	Patógeno	1,59	33,75
	3	Patógeno	1,68	30
S2	1	Patógeno	1,53	36,25
	2	Patógeno	1,56	35
	3	Patógeno	2	16,6666667
H1-1	1	Patógeno	2,14	10,8333333
	2	Patógeno	1,68	30
	3	Patógeno	1,84	23,3333333
S1-2	1	Patógeno	1,28	46,6666667
	2	Patógeno	1,18	50,8333333
	3	Patógeno	1,68	30
H2-1	1	Patógeno	1,68	30
	2	Patógeno	1,48	38,3333333
	3	Patógeno	2,12	11,6666667
H3-3	1	Patógeno	1,94	19,1666667
	2	Patógeno	1,38	42,5
	3	Patógeno	1,93	19,5833333
S2-1	1	Patógeno	1,28	46,6666667
	2	Patógeno	2,13	11,25
	3	Patógeno	2,08	13,3333333

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Código	Promedio PICR	Desviación Estandar
S3-3	48,472222	14,8740857
S3-4	36,944444	8,97849798
S2	29,305556	10,9634283
H1-1	21,388889	9,73015549
S1-2	42,5	11,0239638
H2-1	26,666667	13,6422546
H3-3	27,083333	13,3528503
S2-1	23,75	19,8737334

Anexo 7. Promedio PICR del hongo patógeno *Collectotrichum* sp a las 168 h

Código	Número de Repetición	Hongo	Primera medición (mm) 168 h	PICR
S3-3	1	Patógeno	1,57	79,8717949
	2	Patógeno	0,86	88,974359
	3	Patógeno	1,28	83,5897436
S3-4	1	Patógeno	1,27	83,7179487
	2	Patógeno	1,59	79,6153846
	3	Patógeno	1,68	78,4615385
S2	1	Patógeno	2,91	62,6923077
	2	Patógeno	2,84	63,5897436
	3	Patógeno	2,8	64,1025641
H1-1	1	Patógeno	2,14	72,5641026
	2	Patógeno	1,68	78,4615385
	3	Patógeno	1,86	76,1538462
S1-2	1	Patógeno	1,28	83,5897436
	2	Patógeno	1,2	84,6153846
	3	Patógeno	1,7	78,2051282
H2-1	1	Patógeno	2,71	65,2564103
	2	Patógeno	1,5	80,7692308
	3	Patógeno	2,14	72,5641026
H3-3	1	Patógeno	2,94	62,3076923
	2	Patógeno	3,22	58,7179487
	3	Patógeno	3,19	59,1025641
S2-1	1	Patógeno	3,16	59,4871795
	2	Patógeno	3,94	49,4871795
	3	Patógeno	3,67	52,9487179

Código	Promedio PICR	Desviación Estándar
S3-3	84,145299	4,5766418
S3-4	80,598291	2,7626148
S2	63,461539	0,7138159
H1-1	75,726496	2,9718528
S1-2	82,136752	3,4432884
H2-1	72,863248	7,7607355
H3-3	60,042735	1,9709015
S2-1	53,974359	5,0782827

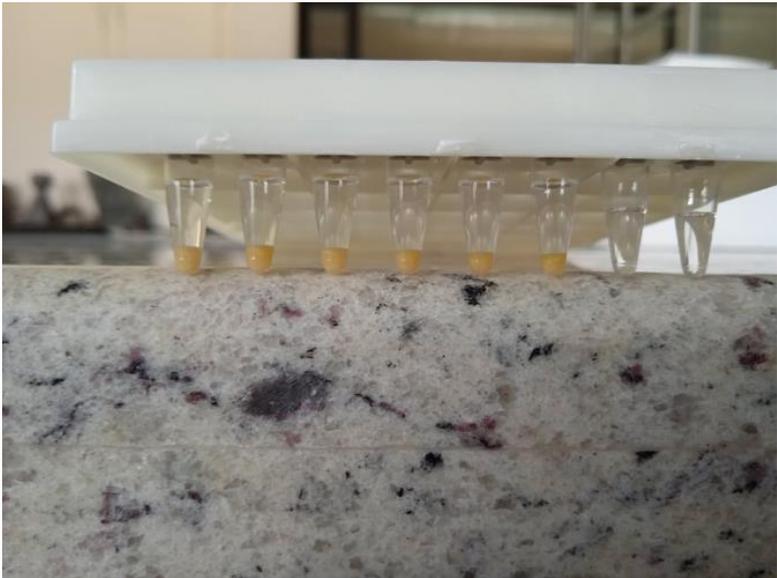
Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 8. Extracción de ADN a través del kit de extracción Purelink Microbiome DNA Purification de Invitrogen.



Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 9. Purificación de la reacción de secuenciación (Secuenciación)



Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 10. Secuencias Alineadas mediante el programa BLAST (Standard Nucleotide BLAST)

- **S3-3**

CACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAACCA
 AACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATCA
 AAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
 AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
 ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
 CCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCC
 GGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACA
 ACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAAC

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
2	Trichoderma asperellum isolate MICO1_2_11 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ...	Trichoderma as...	822	822	100%	0.0	100.00%	547	MN452804.1
2	Trichoderma asperellum isolate MICO1_2_20 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ...	Trichoderma as...	822	822	100%	0.0	100.00%	525	MN452707.1

- **S3-4**

GGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCA
 ACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAA
 TTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA
 ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
 TTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT
 TCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGG
 TGCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTG
 CAAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTTCTGA
 AATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichoderma asperellum isolate MICO1_2_11 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA...	Trichoderma as...	913	913	100%	0.0	100.00%	547	MN452804.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichoderma asperellum isolate MICO1_2_20 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA...	Trichoderma as...	913	913	100%	0.0	100.00%	525	MN452707.1

- **H1-1**

CGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGG
GACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGC
AAAAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGC
GTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTA
AGACGGGATCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCATGCGCA
GTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAA
CTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAACA

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichoderma paraviridescens isolate CTCCSJ-F-KZ40737 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribo...	Trichoderma pa...	944	944	100%	0.0	100.00%	586	KY750519.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichoderma paraviridescens isolate CTCCSJ-G-QT40814 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribo...	Trichoderma pa...	944	944	100%	0.0	100.00%	584	KY750476.1

- **S1-2**

TCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAG
GGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGA
GCAAAAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA

TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGSGGGCATGCCTGTCCGA
 GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCC
 TAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCG
 CAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCCGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCC
 AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
 CTA

Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Trichoderma gamsii isolate CTCCSJ-G-QT40601 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal R...	Trichoderma ga...	948	948	100%	0.0	99.81%	586	KY750357.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trichoderma gamsii strain TR29 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and inte...	Trichoderma ga...	946	946	99%	0.0	99.81%	654	KP211551.1

- **F16-1**

GCGGAGGGATCATTATCGAGTTACCGCTCCTTATAACCCTTTGTGAACATACCCCAA
 ACGTTGCCTCGGCGGGCAGCCGGAGCCCAGCTCCGGCGCCCGGAGCCGCGTCTCGG
 CGCGCCCCACCCGCCGGCGGACCACTAACTCTATTTAAACGACGTCTCTTCTGAGT
 GGCACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
 AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCG
 TCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGCGTTGGGGCCCTACGGCTTCCGTAGGCCCC
 GAAATACAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATAACCACCTCGC
 ACTGGGATCCGGAGGGACTCCTGCCGTAAAACACCCCACTTTCAAAGGTTGACCTC
 GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Colletotrichum gloeosporioides isolate UPBT_AN05 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: int...	Colletotrichum g...	1018	1018	100%	0.0	100.00%	576	MT712202.1
<input checked="" type="checkbox"/> Colletotrichum sp. isolate ATN5 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene an...	Colletotrichum sp.	1018	1018	100%	0.0	100.00%	551	MW391581.1

- **H2-1**

TCACGCCSCGGGTGCGTCGCAGSCCCGGAACCAGGCGCCCGMCGGAGGAACCAACC
 AAACTCTKTCTGWASTCCCCTCGCGGACGWATTTCTTTACAGYTCTGAGCAMAAT
 CMAAATGAATCARAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCRATGAAGAAC
 GCARCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
 GAACGCACATTGYGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT
 AACCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGYGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGT
 GCCGGCCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGC
 ACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCMAACTTTCTGA
 AATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichoderma asperellum isolate MICO1_2_20 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA g...	Trichoderma as...	876	876	100%	0.0	96.84%	525	MN452707.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Trichoderma asperellum isolate T-11-25 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s...	Trichoderma as...	876	876	100%	0.0	96.84%	595	MT341772.1

Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 11. Preparación de sustratos



Elaborado por: Las Autoras, 2021

Anexo 12. Esporulaci3n de las cepas de *Trichoderma*.



Elaborado por: Las Autoras, 2021