

Ambato, 22 de noviembre de 2021

Doctor.

Marco Perez Salinas

Decano

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Presente

De mi consideración:

ANGEL RICARDO VELIZ PEREZ con cedula de identidad N° **180444989-8**, estudiante de la carrera de Ingeniería Agronómica, de la facultad de Ciencias Agropecuarias, solicito se fije lugar , fecha y hora para la SUSTENTACIÓN ORAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CON EL TEMA “Aislamiento y caracterización de *Trichoderma spp.* Asociada con el cultivo de cebolla en suelos de la provincia de Tungurahua”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Por la favorable atención que se le dé al presente, anticipo mis sinceros agradecimientos.

Atentamente.



ANGEL RICARDO VELIZ PEREZ

CI: 1804449898

CEL: 0987537041

E-MAIL. Rickycard12@hotmail.com

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERÍA AGRONÓMICA



**Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. asociada
con el cultivo de cebolla en suelos de la provincia
Tungurahua.**

Proyecto de Investigación

Nombre: Angel Ricardo Veliz Perez

Tutor: Dr. Michel Leiva Mora

Cevallos 2020-2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

“Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. asociada con el cultivo de cebolla en suelos de la provincia Tungurahua.”

Revisado por



Firmado electrónicamente por:
MICHEL LEIVA MORA

Ing. MICHEL LEIVA MORA Dr.
TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS CALIFICADORES



.....
Ing. Marco Pérez Salinas PhD

Fecha: 20/09/2021

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



.....
Ing. MSc. Rita Santana

Fecha: 20/09/2021

Miembro del tribunal de calificación



.....
Ing. Manolo Muñoz PhD

Fecha: 20/09/2021

Miembro del Tribunal de calificación

DERECHO DE AUTOR

Al presente Informe Final del Proyecto de investigación titulado “Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. Asociada con el cultivo de cebolla en suelos de la provincia Tungurahua” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, Autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo a que se realice cualquier copia de este informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia Económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor. Autorizo a la Universidad de Ambato de la publicación de este Informe Final, o parte de él.

ANGEL RICARDO VELIZ PEREZ

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida y darme la sabiduría para obtener una meta más en mi vida y culminar mis estudios universitarios.

Agradezco a mis docentes, compañeros y a todas las personas que en su debido momento aportaron para poder lograr este objetivo planteado al inicio de la Carrera y así poder aportar a la sociedad con todos los conocimientos adquiridos.

Al Doctor Michel Leiva un eterno agradecimiento por sus bastos conocimientos y apoyarme para lograr culminar este Proyecto.

DEDICATORIA

Este logro tan importante de mi vida lo dedico a mi madre Liz del Roció Pérez por confiar y ayudarme a conseguir este logro y a su vez a mis abuelitos Ángel Pérez y Luz María Pérez que son pilares fundamentales y me acogieron como un hijo más con sus consejos y oraciones siempre me ayudaron. Además, a mi hijo y compañera de vida por confiar en que este sueño se podía cumplir.

Resumen

Con el método de inclusión de raíces y cebo con fragmentos de coco no se pudo aislar *Trichoderma*. Mediante el uso de tarrinas con sustrato de arroz, melaza y harina de pescado se obtuvo un aislado de *Trichoderma* (P10M2) mientras que el aislamiento directo a partir de diluciones seriadas de muestras de suelo se obtuvo tres aislados de *Trichoderma* (P4M2, P5M1 y P6M3). En las colonias de los aislados cuando jóvenes prevalecieron colores blanco y verde claro en el anverso de las colonias y presencia de pigmentación amarilla en el aislado P5M1. Las colonias fueron circulares algunas con anillos concéntricos y bordes irregulares. La textura predominante de las colonias fue algodonosa. Morfológicamente los aislados fueron similares respecto al diámetro de las hifas, diámetro de conidios y longitud de fiálides. Conidióforos ramificados con las ramas principales que producían ramas laterales. Ninguna cepa logró mostrar capacidad antagónica importante en el ensayo de cultivo dual ya que ninguna no fue capaz de crecer sobre la colonia del agente fitopatógeno ni esporular sobre esta. Ninguno de los cuatro aislados de *Trichoderma* fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial de *S. cepivora* al no ser productoras de compuestos volátiles antifúngicos. Como principales interacciones hifales observadas en microcultivos duales se destacaron: enrollamiento hifal, adhesión hifal y lisis hifal. Se logró el aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Trichoderma* spp. asociadas con el cultivo de cebolla como punto de partida para desarrollar a futuro medidas de control biológico de la pudrición blanca de la cebolla.

Palabras clave: antagonismo, biocontrol, hongos fitopatógenos, interacciones hifales, pudrición blanca.

Abstract

With the method of inclusion of roots and bait with coconut fragments, *Trichoderma* could not be isolated. Through the use of containers with rice substrate, molasses and fish meal, an isolate of *Trichoderma* (P10M2) was obtained, while direct isolation from serial dilutions of soil samples three isolates of *Trichoderma* (P4M2, P5M1 and P6M3) were obtained. Young colonies of *Trichoderma* were white and light green colors at anverse of the colonies and the presence of yellow pigmentation in the P5M1 isolate were observed. Colonies were circular, some with concentric rings and irregular edges. Predominant texture of the colonies was cottony. Morphologically the isolates were similar with respect to the diameter of the hyphae, the diameter of the conidia and the length of the phyalides. Branched conidiophores with the main branches producing lateral branches. No strain was able to show significant antagonistic capacity in the dual culture test since none was able to grow on the colony of the phytopathogenic agent or sporulate on it. None of the four *Trichoderma* isolates were able to inhibit the mycelial growth of *S. cepivora* as they were not producers of volatile antifungal compounds. The main hyphal interactions observed in dual microcultures were: hyphal coiling, hyphal adhesion and hyphal lysis. The isolation and characterization of native strains of *Trichoderma* spp. associated with onion cultivation as a starting point to develop future biological control measures for onion white rot.

Keywords: antagonism, biocontrol, plant pathogenic fungi, hyphal interactions, white rot.

Contenido

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DERECHO DE AUTOR Y CALIFICADORES	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
CAPITULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
<u>1.1.</u> Introducción	1
<u>1.2.</u> Justificación	2
<u>1.2.1.</u> Cebolla a nivel mundial	2
<u>1.2.2.</u> Producción Nacional	3
<u>1.2.3.</u> Taxonomía	3
<u>1.2.4.</u> Generalidades de la cebolla	3
<u>1.2.5.</u> Requerimientos edafoclimáticos	4
<u>1.2.6.</u> Principales plagas y enfermedades	5
<u>1.2.6.1.</u> Plagas	5
<u>1.2.3.1.</u> Control químico:	7
<u>1.2.3.2.</u> Control biológico:	7
<u>1.2.4.</u> Trichoderma	8
<u>1.2.4.1.</u> Taxonomía	8
<u>1.2.4.2.</u> Mecanismo de acción	8
<u>1.2.5.</u> Control de Trichoderma spp ante Sclerotinia sepivorum.	9
<u>1.3.3.</u> Objetivo general	9
<u>1.3.4.</u> Objetivos específicos	10

<u>1.4.</u> Hipótesis.....	10
CAPITULO II.....	1
<u>2.</u> METODOLOGÌA.....	1
<u>2.2.1</u> Materiales	1
<u>2.2.2</u> Métodos.....	3
2.2.4.Inclusión de raíces a partir de plantas sanas	3
<u>2.2.5.</u> Método de directo a partir de muestras de suelo.....	5
<u>2.2.6.</u> Preparación de los medios de cultivo	6
<u>2.2.7.</u> <i>Para la preparación del medio de cultivo PDA.</i>	6
<u>2.2.7.1.</u> Para la preparación del medio de cultivo Agar Rosa Bengala.	7
<u>2.2.7.2.</u> Aislamiento del agente causal de la pudrición banca de la cebolla.....	8
<u>2.2.8.</u> Se tomaron muestras de las siguientes localidades:.....	9
<u>2.2.9.</u> asociada al cultivo de cebolla.....	9
<u>2.2.9.1.</u> Caracterización de actividad biocontroladora mediante cultivo dual.....	9
<u>2.2.10.</u> Análisis de las interacciones hifales en microcultivo.....	10
<u>2.2.11.</u> Producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica	10
CAPITULO III.....	11
3.RESULTADOS y DISCUSIÓN	11
<u>3.2.</u> Análisis y discusión de los resultados	11
<u>3.2.1.</u> Inclusión de raíces a partir de plantas sanas	11
3.2.2. Cebo fragmento de coco	12
3.2.3. Trampas con sustrato arroz.....	12
3.2.4. Método directo a partir de muestras de suelo.....	14
3.2.5. Caracterización cultural de los aislados obtenidos de Trichoderma	15
3.2.6. color blanco	16

3.2.7.	Aislamiento del agente causal de la pudrición banca de la cebolla.....	25
3.3.	Verificación de hipótesis	26
3.3.1.	Caracterización de actividad biocontroladora mediante cultivo dual.....	26
3.3.2.	Producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica.	29
3.3.3.	Análisis de las interacciones hifales en microcultivo.....	31
CAPITULO IV		35
4.	Colusiones y recomendaciones.....	35
4.1.	Conclusiones	35
4.2.	Recomendaciones	36
5.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS V.....		37
Anexos VI		41
6.Anexo 41		

Contenido

Figura 1.	Colonias de hongos filamen.....	11
Figura 2.	Colonias de hongos filamentosos establecidas en el mesocarpo de cocos establecidos en condiciones de campo donde se ha cultivado cebollas.	12
Figura 3.13		
Figura 4.	Colonias de aislados de <i>Trichoderma</i> crecidas en el medio de cultivo PDA durante 10 días a 25°C.	14
Figura 5.	Otros géneros de hongos que aparecieron en cajas de Petri utilizando el método de aislamiento directo. Colonia de <i>Penicillium</i> (A), Colonia de <i>Fusarium</i> (B) y Colonias de <i>Aspergillus</i> (C).	15
Tabla. 1	Descripción de cepas <i>Trichoderma</i> a los 5 días después de la siembra.	16

Tabla 2. Descripción de cepas- <i>Trichoderma</i> spp. a los 10 días después de la siembra.	19
Tabla 3. Caracterización morfológica de los aislados obtenidos de <i>Trichoderma</i> .	.. 23
Tabla 4. Vista bajo el microscopio de estructuras fúngicas- <i>Trichoderma</i> spp. 23
Figura 6. Colonias de <i>S. cepivora</i> blancas lanosas de 5 días de crecidas (A). Colonias de 21 días de crecidas en el medio de cultivo PDA con textura lanosa y color gris con la presencia de numerosos de pequeños esclerocios. 25
Tabla 7. Imágenes del ensayo de confrontación dual de los cuatro aislados de <i>Trichoderma</i> vs <i>S. cepivora</i> 27
Tabla 8. Imágenes del ensayo de producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica de los cuatro aislados de <i>Trichoderma</i> vs <i>S. cepivora</i> 30
Tabla 9. Microfotografías de las interacciones hifales de aislados de <i>Trichoderma</i> vs <i>S. cepivora</i> utilizando la técnica del microcultivo 31

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción

La cebolla (*Allium cepa L.*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial en cuanto a rendimiento Agrícola, tomando en cuenta que en el 2018 la producción destinada a cebollas secas a nivel mundial se estima a 5.039.908 ha cosechadas **(faostat. 2018)**.

La cebolla en el Ecuador uno de los cultivos más importantes. de las 40.000 ha dedicadas a cultivos hortícola, la producción de cebolla ocupa 7.920 ha. La producción registra un crecimiento en la superficie del (10%) como en el volumen de producción (11%). Estas variaciones difieren de las registradas en la cosecha de invierno de 2016, en la cual las variables decrecieron 5% **(Lara Paredes, 2017)**.

Las principales problemáticas, del cultivo de cebolla en Ecuador son: la presencia de *Sclerotium cepivorum* Berk. en los suelos, seguido de la resistencia de la ineficacia de varios productos fungicidas químicos para su control, sin tomar en cuenta los elevados costos que implica el control de esta enfermedad **(Gemechu et al., 2020)**.

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que provocan daños estructurales de la pared celular, vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular de los hongos fitopatógenos que controlan **(Mukhopadhyay y Kumar, 2020)**.

La aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* se ha demostrado que disminuye entre 10 y 13% de incidencia del hongo en comparación a los tratamientos no aplicados (**Marques et al., 2018**).

1.2. Justificación

1.2.1. Cebolla a nivel mundial.

En Asia Central se encuentran los primeros datos del cultivo de cebolla y el ajo. Y en la edad media fueron utilizados en la medicina ya limentaciòn. Pertenece a la familia de las Liliáceas (ajo, puerro).

La cebolla crece bajo la tierra en forma de bulbo y consta de distintos colores como amarillo, rojo y es una planta pequeña, sus hojas son huecas por dentro y con un color verde intenso. Este producto cuenta con un largo tiempo de poscosecha el cual no necesita de costos elevados (**Siddiquee. 2017**).

Los volúmenes de producción de cebolla *Allium cepa*. a nivel mundial ocupa el segundo lugar entre las hortalizas, se estima los rendimientos en producción en 83 millones de toneladas. El 27 % de producción consta en países asiáticos por Estados Unidos tiene un 4% . El 49% está compuesto por distintos países del orbe.

En Latinoamérica la producción consta únicamente con el 9%, en la literatura se confirma que existe una gran demanda de cebolla en Latinoamérica ya que se registran importaciones de este producto. Estos países en conjunto importan cerca de 407 mil toneladas. Un 6% **Faostat.2013**.

1.2.2. Producción Nacional

La dieta Ecuatoriana consta de un consumo diario de cebolla en todas las familias. Sin embargo los costos de producción y a su vez la falta de tecnificación del cultivo permite que exista una gran importación del país vecino Perú.

(Magap, 2008) el cultivo de cebolla se distribuye en alrededor de 5.852 hectáreas (ha) y se encuentran distribuidos en las provincias de Chimborazo, Tungurahua, Cañar, Loja y resto del país. la producción anual en consideración es de 49.808

1.2.3. Taxonomía

REINO	PLANTAS
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE:	Liliopsida
ORDEN:	Asparagales
FAMILIA:	Amaryllidaceae
SUBFAMILIA:	Allioideae
TRIBU:	Allioideae
GENERO:	<i>Allium</i>
ESPECIE:	<i>Allium cepa</i>

1.2.4. Generalidades de la cebolla

Crecimiento herbáceo: Da inicio en la germinación con la formación de un tallo corto y delgado, en el lugar que se insertan las raíces y da lugar el bulbo, y esto da lugar al crecimiento radicular.

Formación de bulbos: Se paraliza el sistema vegetativo translocando a la formación del bulbo el crecimiento con el sistema de reserva con las hojas anteriores, que a su vez se engrosan y dan lugar al bulbo. en este periodo de tiempo existe hidrólisis de los prótidos; y también se da la síntesis de glucosa y fructosa que se acumulan en el bulbo.

1.2.5. Requerimientos edafoclimáticos

Fertilización del cultivo: La cebolla demanda que el estiércol en el suelo esté muy maduro, aportado con la suficiente antelación, preferiblemente en el cultivo anterior.

Abonado de fondo: Se recomienda aportar:

80 unidades de fertilizante por hectárea de N

50 UF/Ha de P₂O₅

120 UF/Ha de K₂O.

Abonado de cobertura: se aplican en función de fertirriego con micros y macro elementos.

Marco de plantación: las siembras regulares se encuentran entre 30 - 40 plantas/m², con un espacio entre 20 a 40 cm entre plantas.

Es muy usual el uso de herbicidas para el control de malezas.

RIEGO: el riego debe ser de presencia regular pero no en exceso (**Burgos, Donoso, 2015**).

1.2.6. Principales plagas y enfermedades

1.2.6.1. Plagas

Escarabajo (*Lylyoderys merdigera*): los adultos son coleópteros de 7mm. De color rojo cinabrio, las larvas son de color amarillo.

Mosca de la cebolla (*Hylemia antigua*): larvas de 6-8 mm. Color gris-amarillento, en el tórax tienen líneas, sus alas son amarillentas. Las patas y las antenas son negras. Avivan a los 20-25 días. Ponen unos 150 huevos.

Trips (*Thrips tabaci*): su ataque en verano es muy severa. Aparecer trazas amarillentas por el ataque de larvas y adultos. Con los ataques severos se marchitan las plantas en especial en su desarrollo.

Polilla (*Acrolepia assectellaes*): es una mariposa de 15mm. las alas posteriores son grisáceas. Las larvas son pardas de cabeza amarilla, de 15 a 18 mm de largo (Torres, Jose.2014).

1.2.6.2. ENFERMEDADES DE LA CEBOLLA:

Mildiu (*Peronospora destructor o schleideni*): Son manchas violáceas alargadas que aparecen en las hojas nuevas, esta es una enfermedad de tiempo cálido húmedo que favorece al desarrollo de esta enfermedad. Los extremos de las plantas mueren totalmente.

ROYA (*Puccinia*): son pustulas pardo-rojizas que con el tiempo toman una coloración rojiza, en las cuales se desarrollan las uredosporas. Las hojas se secan prematuramente como consecuencia del ataque.

Podredumbre blanca (*Sclerotium cepivorum*)

es un hongo blanco algodonoso, que se ostenta en pequeños sclerocios en la superficie de los bulbos. Esta pudrición se desarrolla en la etapa final de la fenología del cultivo. Las hojas llegan a morir con un amarillamiento progresivo

1.2.3. Metodos de control de PODREDUMBRE BLANCA (*Sclerotium cepivorum*)

Para el control de esta enfermedad se utilizan distintos métodos como la rotación de cultivos, controles químicos y controles biológicos (Torres, Jose.2014).

1.2.3.1. Control químico:

El ingrediente activo Tebuconazole, proporciona ayuda en el control de este hongo, pero no es capaz de mantener o reducir densidades de inóculo mayores a 240 esclerocios vivos·kg⁻¹ de suelo. Comparando con estrategias como la solarización o uso de *T. harzianum* que si hicieron el trabajo de reducción de esclerocios. esto refiere a que la efectividad del fungicida es relativa a la cantidad de esclerocios encontrados en el suelo (Ojaghian, S. et al. 2019).

1.2.3.2. Control biológico:

Es de dominio y conocimiento que el *Trichoderma* tiene distintos mecanismos de acción. Entre estos son siete los mecanismos relacionados al control: el micoparasitismo, la antibiosis, la competencia, la degradación enzimática, la activación de respuestas de defensa. En condiciones naturales es muy complejo que se puedan activar, debido a las variables ambientales. (Rivera Wiliam. 2015).

En todas las parcelas y en cada mes evaluado, el tratamiento con *Trichoderma* siempre presentó conteos menores o similares de esclerocios que el tratamiento con fungicidas, lo que da una indicación de su efectividad es baja. Los resultados obtenidos en la evaluación de la mortalidad por parcela y por tratamiento se presentan en el cuadro 4. El análisis confirmó la efectividad de *Trichoderma* como tratamiento alternativo, al presentar un desempeño estadísticamente igual que el tratamiento químico utilizado.

Trichoderma es determinada como una alternativa viable para ejecutar el control contra *Sclerotium cepivorum*, este control a demostrado una eficacia similar a los controles químicos más usados; en la mortalidad del cultivo se pudieron contar el número de esclerocios y a su vez se la importancia se ratificó que tiene la cuantificación del inóculo inicial sobre el desarrollo de la enfermedad (**Rivera Wiliam. 2015**).

1.2.4. Trichoderma

1.2.4.1. Taxonomía

REINO	FUNGI
DIVISIÓN	Ascomycota
SUBDIVISIÓN	Pezizomycotina
CLASE	Sordaryomicetes
ORDEN	Hipocreales
FAMILIA	Hipocreaceae
GENERO	<i>Trichoderma</i>
	fuelle Burgos, Donoso,m 2015

1.2.4.2. Mecanismo de acción

Competencia: por la competencia de nutrientes y espacio es la principal y más normal de este género. Se desarrolla pronto para poder colonizar las rizosferas y tiene la capacidad de movilizar por el suelo y tomar los nutrientes.

Producción de metabolitos (Antibiosis): este género de hongos con capaces de emitir compuestos volátiles como no volátiles. Que toman un papel importante en la inhibición de enzimas volátiles.

Micoparasitismo es un proceso de antagonismo contra el patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica (**granados, Milagro. 2015**)

1.2.5. Control de *Trichoderma* spp ante *Sclerotinia sepivorum*.

El uso alternativo de microorganismos como *Trichoderma* spp. para reducir el impacto negativo de los plaguicidas en los cultivos en la agricultura y sobre el ambiente y obtener sostenibilidad, y pensando en la salud de los trabajadores interviniendo en menor contacto con plaguicidas. En el caso de *S. cepivorum*, para combatir este hongo debemos conocer los tiempos que puede alcanzar su máximo umbral de daño en producción de los propágulos, con el fin de enfocar las estrategias de control (**Dilcia Ulacio, 2011**).

1.3. Objetivos

1.3.3. Objetivo general

- Aislar y caracterizar cepas nativas de *Trichoderma spp.* asociada al cultivo de cebolla con actividad antagónica frente al agente causal de la pudrición blanca de la cebolla en la provincia de Tungurahua.

1.3.4. Objetivos específicos

- 1- Aislar cepas nativas de *Trichoderma* asociadas al cultivo de cebolla.
- 2- Aislar el agente causal de la pudrición blanca de la cebolla.
- 3- Caracterizar la actividad biocontroladora de las cepas de *Trichoderma spp.* asociada al cultivo de cebolla.

1.4. Hipótesis

Mediante el aislamiento y la caracterización de cepas nativas de *Trichoderma spp.* asociadas al cultivo de cebolla, se podrían encontrar aislados con actividad antagónica frente al agente causal de la pudrición blanca de la cebolla en la provincia de Tungurahua.

CAPITULO II

2. METODOLOGÌA

2.2. Materiales

- Microscopio.
- Marcadores permanentes.
- Bolsas ziploc.
- Cajas petri de 90 mm de diámetro.
- PDA (Difco®).
- Agar Rosa de Vengala.
- Agar- agar.
- Incubadora.
- Agua destilada.
- Refrigerador.
- Balanza analítica.
- pH-metro.
- Cabina de flujo laminar.

- Pinza.
- Bisturí.
- Mechero de Bunsen.
- Parafilm.
- Vaso de precipitado.
- Probeta.

2.2. Métodos

2.2.3. Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* asociadas al cultivo de cebolla.

Métodos de aislamiento de *Trichoderma* spp.

2.2.4. Inclusión de raíces a partir de plantas sanas

Se recolectaron muestras de raíces de especies de plantas sanas en condiciones de campo. Las muestras de raíces se colocaron en bolsas de plástico limpias con cierre hermético y se humedecieron con agua. Se lavaron durante 30 minutos en agua corriente. Posteriormente fueron desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio al 3% y se enjuagaron tres veces sucesivas en agua desionizada estéril. Las muestras de raíces se dejaron secar bajo cabina de flujo laminar durante 1 hora. Posteriormente con una pinza fina de acero inoxidable se incluyeron en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo Agar Rosa de Bengala. Las cajas de Petri se colocaron en una incubadora durante 7 días a 25 °C.

Las placas se incubaron bajo condiciones de laboratorio con luz ambiental durante 4-7 días. (Cummings, N *et al.*, 2016).

2.2.5. Método de fragmento de coco.

Se tomaron cocos maduros y se cortaron a la mitad. Cada mitad se sumergió en una solución con melaza al 2% y se dejó secar al aire libre. Las mitades fueron colocadas en condiciones de campo donde la parte interna estuvo en contacto con el suelo. Se dejaron durante 14 días y posteriormente fueron trasladadas a condiciones de laboratorio. Los cocos donde se observó crecimiento micelial de color verde fueron separados y el micelio fue transferido a cajas de Petri que contenían el medio de cultivo Agar Rosa de Bengala. Las cajas de Petri se colocaron en una incubadora durante 7 días a 25 °C.

2.2.4. Método de Trampas con sustrato arroz

Para la implementación del presente método de aislamiento se utilizaron tarrinas desechables plásticas y bandejas de aluminio que se llenaron con arroz cocido, estas se colocaron a 20 cm de profundidad de la superficie del suelo. Se colocaron 15 trampas en cada sitio de muestreo y a los 14 días se colectaron de campo y se trasladaron al laboratorio. En los sectores donde se observó crecimiento micelial de color verde fueron separados y el micelio fue transferido a cajas de Petri que contenían el medio de cultivo Agar Rosa de Bengala. Las cajas de Petri se colocaron en una incubadora durante 7 días a 25 °C.

2.2.5. Método de directo a partir de muestras de suelo

Se toma una muestra de aproximadamente 1Kg de suelo, proveniente de un cultivo de cebolla, luego se colocó en una funda Ziplox debidamente etiquetada y se llevó al laboratorio donde se dejó secar sobre papel periódico por 48 h. Posteriormente se disgregó con la ayuda de rodillo y se cernió en un tamiz de 2 mm. Para aislar *Trichoderma* spp. se utilizó el método de las diluciones seriadas tomando como punto de partida un gramo de suelo (**Tello. 2015**).

Para establecer las diluciones seriadas se procedió de la siguiente manera: se pesaron 10 gramos de suelo y se colocaron en un Erlenmeyer con 90 ml de agua destilada, se agitó la suspensión durante 20 min y se dejó reposar por 5 min. Se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-5} con la finalidad de obtener colonias características del género *Trichoderma*. Se sembró 1 ml de cada dilución en cajas de Petri que contenían el medio de cultivo PDA y se giraron circularmente durante 10 segundos y se dejaron incubar durante 7 días a 25 °C con fotoperiodo (12 horas luz+ 12 horas oscuridad).

La identificación de los aislados se realizó evaluando las características de las colonias y de los conidióforos y conidios mediante observaciones macroscópicas y microscópicas respectivamente acorde con los criterios sugeridos por (**Siddiquee. 2017**).

2.2.6. Preparación de los medios de cultivo

2.2.7. Para la preparación del medio de cultivo PDA.

- Se disolvieron 18,72g de PDA en 480 ml en agua destilada.
- Se esterilizaron en una autoclave durante 15 min a 121 °C a una presión de 1.5 Kg. cm⁻².
- Se dejó enfriar el medio y se dispensaron cajas de Petri estériles (9mm de diámetro), a razón de 20 ml por caja.
- Se dejó incubar por una noche a 28 °C para secar y probar la esterilidad del medio.

La composición del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para preparar un litro de medio de cultivo según el fabricante fue:

- Extracto de patata: 4,0 gr
- Dextrosa: 20,0 gr
- Agar-Agar: 15gr
- Agua: 1000 mL.

- pH = 5,6

2.2.7.1. Para la preparación del medio de cultivo Agar Rosa Bengala.

- Se disolvieron 32,2 g del medio en 1000 ml de agua desionizada estéril. Se esterilizaron en una autoclave durante 15 min a 121 °C a una presión de 1.5 Kg. cm⁻².
- Se dejó enfriar el medio y se dispensaron cajas de Petri estériles (9mm de diámetro), a razón de 20 ml por caja.
- Se dejó incubar por una noche a 28 °C para secar y probar la esterilidad del medio.

La composición del medio de cultivo Agar Rosa de Bengala para preparar un litro de medio de cultivo según el fabricante fue:

- Polipeptona micológica: 5,00 g
- Glucosa: 10,00 g
- Sulfato de magnesio: 0,50 g
- Fosfato potásico 1,00 g
- Rosa de Bengala 0,06 g
- Cloranfenicol 0,20 g

- Agar-agar 15,00 g
- pH final: $7,2 \pm 0,2$ (**Microkit. 2019**)

2.2.7.2. Aislamiento del agente causal de la pudrición banca de la cebolla

A partir de plantas enfermas en condiciones de campo que mostraban signos de micelio blanquecino y pudrición blanda de bulbos de cebolla, se colectaron muestras que fueron colocadas en bolsa Ziplox y transferidas a un termo de espuma flex. Las muestras de obtenida se trasladaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Las muestras en el laboratorio fueron lavadas durante 30 minutos en agua corriente. Posteriormente, fueron colocadas en recipientes previamente esterilizados con papel de filtro a modo de cámara húmeda durante 5 días a 25°C.

A partir de fragmentos de micelio de cada cámara húmeda se transfirieron a cajas de Petri que contenían el medio de cultivo PDA enmendado con 50 ppm de Sulfato de estreptomicina (Sigma).

Las colonias puras fueron transferidas a nuevas cajas de Petri para la evaluación de sus caracteres culturales.

2.2.8. Se tomaron muestras de las siguientes localidades:

- Quero
- Tisaleo
- Ambato (2 sitios).

2.2.9. asociada al cultivo de cebolla

2.2.9.1. Caracterización de actividad biocontroladora mediante cultivo dual

Para determinar el antagonismo *in vitro* se utilizó la técnica del cultivo dual en la cual se sembró un disco de micelio de 5 mm de diámetro de una zona de activo crecimiento a partir de una colonia crecida durante 7 días en medio de cultivo PDA. De mismo modo en el extremo opuesto se colocó de modo similar un disco de micelio de cada aislado de *Trichoderma* y se incubaron a 25°C en oscuridad constante. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial según la siguiente fórmula:

$$I(\%) = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde I = Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio.

R1 = Crecimiento radial del patógeno en PDA solo.

R2 = Crecimiento radial del patógeno en PDA en cultivo dual con el antagonista.

2.2.10. Análisis de las interacciones hifales en microcultivo

Para el desarrollo del presente ensayo se utilizaron portaobjetos estériles a los cuales se le vertió una capa del medio de cultivo PDA y se dejó enfriar. Posteriormente se inoculó por un extremo el aislado del antagonista y por el otro extremo el aislado del patógeno. Cuando los frentes de avances del crecimiento hifal se encontraron se procedió a observar bajo el microscopio clínico con aumento de 400X las interacciones entre las hifas del antagonista y las del patógeno.

2.2.11. Producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica

Para este ensayo se utilizaron dos cajas de Petri de 90 mm x 1.5 mm las cuales se les quitó la tapa superior a cada una y entre ella se colocó un papel de Celofan luego se juntaron y sellaron con Parafilm. Para cada cepa de *Trichoderma* se utilizaron 5 cajas de Petri. Como control se tomaron 5 cajas de Petri con el medio de cultivo PDA donde el patógeno creció solo. Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial similar a lo explicado anteriormente.

CAPITULO III

3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.2. Análisis y discusión de los resultados

Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* asociadas al cultivo de cebolla.

3.2.1. Inclusión de raíces a partir de plantas sanas

Con el método de inclusión de raíces en el medio de cultivo Agar Rosa Bengala no se pudo recuperar de las muestras analizadas cepas de *Trichoderma*. Los géneros de hongos que más prevalecieron con este método fueron *Fusarium* y *Penicillium* (figura). Nuestros resultados no coinciden con los informados por Abdelrahman *et al.*, (2016) quienes sí lograron obtener aislados de *Trichoderma longibrachiatum* a partir de fragmentos de raíces de cebolla y que mostraron actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa.

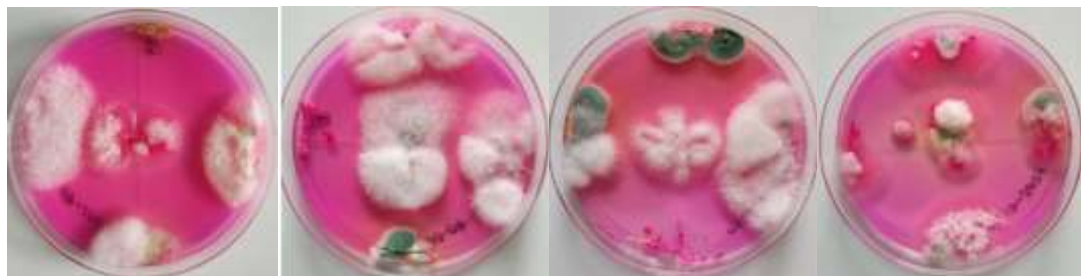


Figura 1. Colonias de hongos filamen

tosos de los géneros *Fusarium* y *Penicillium* crecidas a partir de fragmentos de raíces incluidas en el medio de cultivo Agar Rosa Bengala.

3.2.2. Cebo fragmento de coco

Al cabo de los 14 días se observaron numerosas colonias con crecimiento filamentososo, con coloraciones predominantes de color verde claro, verde oscuro, blanco y gris. Cuando se realizaron análisis bajo el microscopio prevaleció el género *Penicillium* pero no se logró obtener colonias del género *Trichoderma* (figura 1). En relación con la selectividad del coco para la captura de especies de *Penicillium* sp. nuestros resultados son similares a los obtenidos por **Cortés-Rivera et al., (2019)**.



Figura 2. Colonias de hongos filamentosos establecidas en el mesocarpo de cocos establecidos en condiciones de campo donde se ha cultivado cebollas.

3.2.3. Trampas con sustrato arroz

Mediante el uso de tarrinas con sustrato de arroz, melaza y harina de pescado se comenzó a observar la formación de colonias verdes, amarillas y blancas a partir de los 7-10 días. Con el presente método solo se obtuvo un aislado de *Trichoderma* pues la mayor parte de las tarrinas poseían colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* principalmente (figura 3). Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por **Cubillos et al., (2014)** quienes a partir de sustratos enriquecidos con arroz pudieron aislar exitosamente cepas de *Trichoderma*.



Figura 3. Presencia de colonias de hongos filamentosos en tarrinas a los 10 días de colocadas en campo. Aislado obtenido a partir de colonia de color verde oscuro.

3.2.4. Método directo a partir de muestras de suelo.

Mediante el método directo se pudieron obtener 3 aislados de *Trichoderma* (figura).



Figura 4. Colonias de aislados de *Trichoderma* crecidas en el medio de cultivo PDA durante 10 días a 25°C.

Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por **Cubillos *et al.*, (2014)** quienes a partir de sustratos enriquecidos con arroz pudieron aislar exitosamente cepas de *Trichoderma*. Asimismo, en algunas cajas de Petri aparecieron otros hongos del género *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (figura).

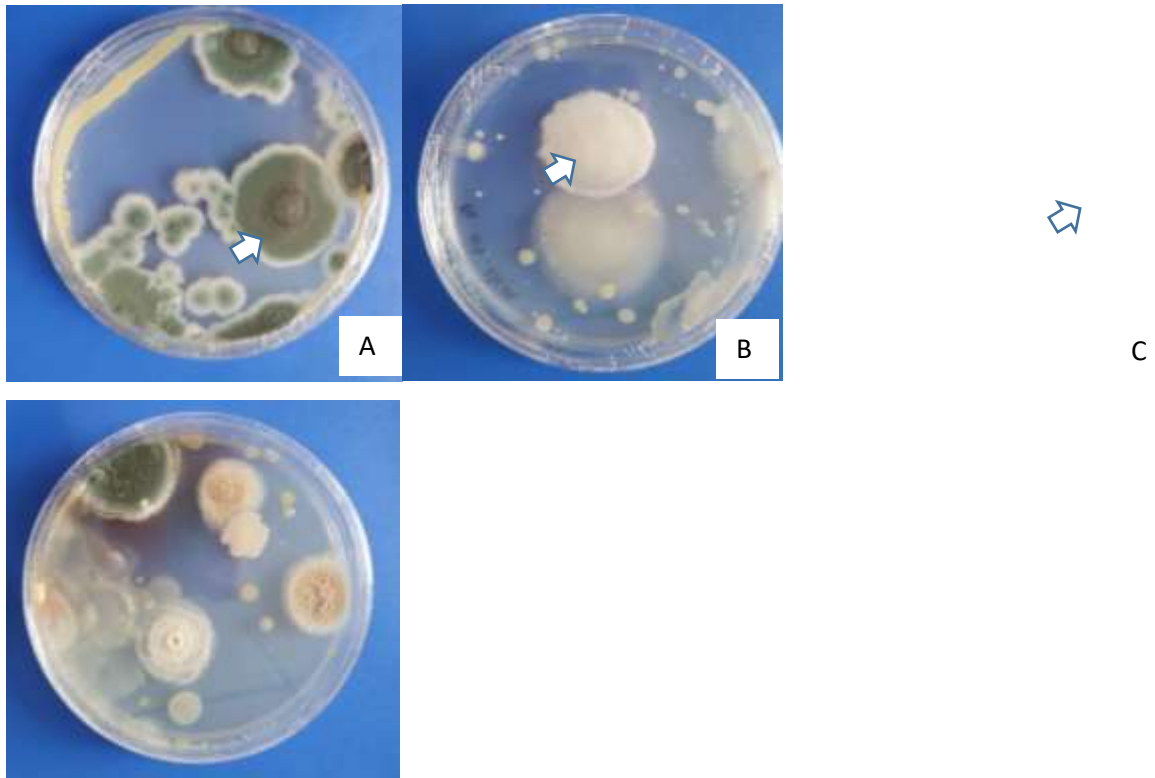


Figura 5. Otros géneros de hongos que aparecieron en cajas de Petri utilizando el método de aislamiento directo. Colonia de *Penicillium* (A), Colonia de *Fusarium* (B) y Colonias de *Aspergillus* (C).

3.2.5. Caracterización cultural de los aislados obtenidos de *Trichoderma*

A los 5 días de crecidos los aislados de *Trichoderma* mostraron las siguientes características: El aislado P10M2 en el reverso de las colonias se observó un color blanco (Código Pantone 11-0506) con anillos de color gris claro (cool gray 1) de forma circular con margen filamentosos, mientras que en el anverso de las colonias tuvo un color blanco (Código Pantone 11-0204), de textura algodonosa, con una forma circular, presenta una elevación convexa y con un borde filamentosos (tabla). Estas características de las colonias fueron similares a las descritas por Arenas *et al.*, (2009).


3.2.6. color blanco





El aislado P4M2 en su anverso mostró un (Código Pantone 11-0204), una textura algodonosa, en el centro presenta un color crema claro (434), con forma circular, elevación convexa y de margen filamentosos mientras que en reverso de las colonias se apreció un color blanco (Código Pantone 11-0203) con anillos gris claro (427), de forma circular y con margen filamentosos (tabla). Estas características de las colonias fueron similares a las descritas por **Arenas *et al.*, (2009)**.

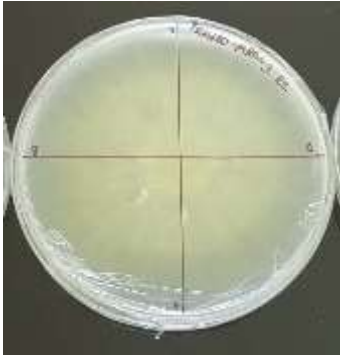


Las colonias de los aislados de *Trichoderma* mostraron color blanco al inicio y verde al final en el anverso con forma circular con bordes irregulares, textura algodonosa y reverso de color amarillo.

textura algodonosa, forma circular, con colonias elevadas y de margen filamentosos, mientras que en el reverso de las colonias prevaleció el color blanco (Código Pantone 11-0406), de forma circular y de bordes filamentosos (tabla). Estas características descritas fueron similares a las indicadas por **Aguilar *et al.*, (2012)**.

Tabla. 1 Descripción de cepas *Trichoderma* a los 5 días después de la siembra.

Aislados	Imagen	Descripción
P10M2		Blanco (Código Pantone 11-0506) con anillos de color gris claro (cool gray 1) de forma circular con margen filamentosos.

		Blanco (Código Pantone 11-0204), de textura algodonosa, con una forma circular, presenta una elevación convexa y con un borde filamentoso.
P4M2		Blanco (Código Pantone 11-0204), de textura algodonosa, en el centro presenta un color crema claro (434), con forma circular, elevación convexa y de margen filamentoso
		Blanco (Código Pantone 11-0203) con anillos gris claro (427), de forma circular y con margen filamentoso.
P5M1		Amarillo pálido (Código Pantone 4535), de textura algodonosa, con una forma circular, una elevación convexa y de margen filamentoso.


		Amarillo claro (Código Pantone 459), de forma circular y de margen filamentososo
P6M3		Blanco (Código Pantone 11-0501), de textura algodonosa, con una forma circular, una elevación convexa y de margen filamentososo.
		Blanco (Código Pantone 11-0406), de forma circular y de bordes filamentosos




Al cabo de los 10 días de sembrados los aislados desde el punto de vista culturales se apreciaron las siguientes características: el aislado P10M2 en su anverso mostró un color verde claro (Código Pantone 555) con anillos circulares verde (5767), colonias con forma circular y de borde entero mientras que el reverso mostró un color blanco (Código Pantone 11-0601) con anillos verdosos (566). Similarmente el aislado P4M2 en su anverso tuvo un color verde (Código Pantone 359), con colonias de forma circular, micelio elevado y de borde entero, mientras que en el reverso de las colonias se apreció un color verde (Código Pantone 359), colonias de forma circular, con micelio elevado y de borde entero




(tabla). Estas características culturales fueron similares a las descritas por **Acurio-Vásquez *et al.*, (2017)**.

De modo similar el aislado P5M1 a los 10 días el anverso de sus colonias mostró en el centro un color verde (Código Pantone 354) con el borde blanco (Código Pantone 11-0506) con forma circular y una elevación plana. El reverso de las colonias mostró un color amarillo (Código Pantone 396), con anillo de color amarillo claro (Código Pantone 393). Finalmente, el aislado P6M3 a los 10 días mostró colonias con un color verde (Código Pantone 355), con anillos verdosos (Código Pantone 366) y las colonias de forma circular y de borde entero. En el anverso de las colonias se observó un color blanco (Código Pantone 11-0601), anillos verdes (Código Pantone 351) (tabla). Estas características culturales fueron similares a las descritas por **Acurio-Vásquez *et al.*, (2017)**.

Tabla 2. Descripción de cepas- *Trichoderma* spp. a los 10 días después de la siembra.

IDEN	Imagen	Descripción
P10M2		Blanco (Código Pantone 11-0601) con anillos verdosos (566).

		<p>Verde claro (Código Pantone 555) con anillos circulares verde (5767). De forma circular y de borde entero.</p>
<p>P4M2</p>		<p>En el centro color amarillo (Código Pantone 393) con anillos circulares blanco (Código Pantone 11-0506) y anillos verdes (559).</p>
		<p>Verde (Código Pantone 359), de forma circular, elevación de cúpula y de borde entero.</p>

P5M1		<p>Amarillo (Código Pantone 396), con anillo de color amarillo claro (Código Pantone 393).</p>
		<p>En el centro verde (Código Pantone 354) con el borde blanco (Código Pantone 11-0506). De forma circular, con una elevación plana y de borde lobado.</p>
P6M3		<p>Blanco (Código Pantone 11-0601), con anillos verdes (Código Pantone 351).</p>



Caracterización morfológica de los aislados obtenidos de Trichoderma

En relación con los valores de las variables diámetro de las hifas, diámetro de conidios y longitud de fiálides fueron muy similares entre los cuatro aislados de *Trichoderma* (tabla 2).


Los conidióforos fueron ramificados. Las ramas principales de los conidióforos producen ramas laterales que pueden estar emparejadas o no, las ramas más largas distantes del extremo las fiálides surgieron directamente del eje principal cerca del extremo. Algunas ramas secundarias cerca del eje principal. Todas las ramas primarias y secundarias surgieron en un ángulo de 90 ° aproximadamente con respecto al eje principal. El conidióforo típico de *Trichoderma* forma ramas apareadas con un aspecto piramidal. Normalmente, los conidióforos terminaron en uno o unas pocas fiálides.




En relación con los conidios en los cuatro aislados de *Trichoderma* estos mostraron apariencia seca, forma de elipsoidal a esférica, de 3 a 5 x 2 a 4 μm de largo de modo general, aunque cada aislado mostraron dimensiones específicas. Los conidios sus paredes mostraron superficies lisas. Se observaron conidios fueron incoloros a verdes. Las fiálides en forma de botella, con aspectos de cilíndricas o casi subglobosas, sostenidas en espirales e insertadas en un ángulo de 90°.

Tabla 3. Caracterización morfológica de los aislados obtenidos de *Trichoderma*.

Aislados	Diámetro de las hifas (μm)	Diámetro de conidios (μm)	Longitud de fiálides (μm)
	□	□	□
P10M2	7,30	2,90	14,70
P4M2	7,60	3,17	15,68
P5M1	7,28	2,90	14,50
P6M3	7,00	3,46	13,28

Tabla 4. Vista bajo el microscopio de estructuras fúngicas- *Trichoderma* spp.

Aislados	Imágenes
P10M2	
P4M2	

	
P5M1	
P6M3	

Las características observadas en la morfología de hifas, fiálides y conidios fueron similares a las referidas por **Soheiliara et al., (2020)**.

3.2.7. Aislamiento del agente causal de la pudrición banca de la cebolla.

A partir de muestras de cebollas con signo de micelio blanco algodonoso se obtuvo un aislado fúngico, el cual mostró un lento crecimiento en sus primeros 5 días. Posteriormente incrementó su crecimiento micelial y logró ocupar toda la placa. El micelio fue de color blanco grisáceo superficial durante los primeros 5 días y a partir de los 14 días el micelio se hizo más tupido con una textura lanosa y color gris acompañado de numerosos esclerocios de pequeño tamaño en el medio de cultivo PDA.

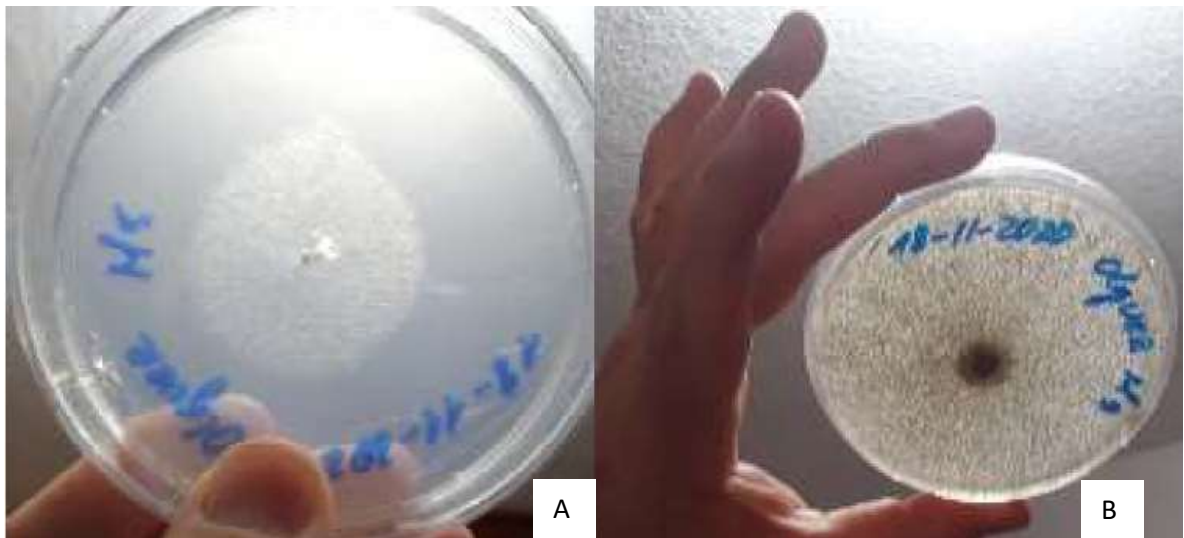


Figura 6. Colonias de *S. cepivora* blancas lanosas de 5 días de crecidas (A). Colonias de 21 días de crecidas en el medio de cultivo PDA con textura lanosa y color gris con la presencia de numerosos de pequeños esclerocios.

El aislamiento utilizado en el presente trabajo fue similar al procedimiento utilizado por **Earnshaw y Boland (1997)** siendo las características de las colonias similares a las descritas por estos autores.


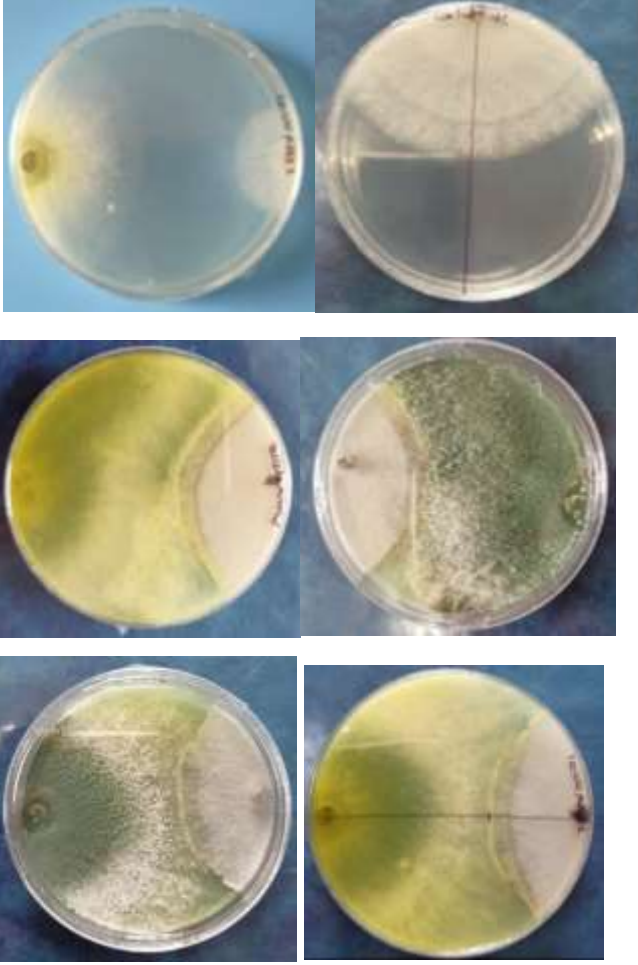
3.3. Verificación de hipótesis

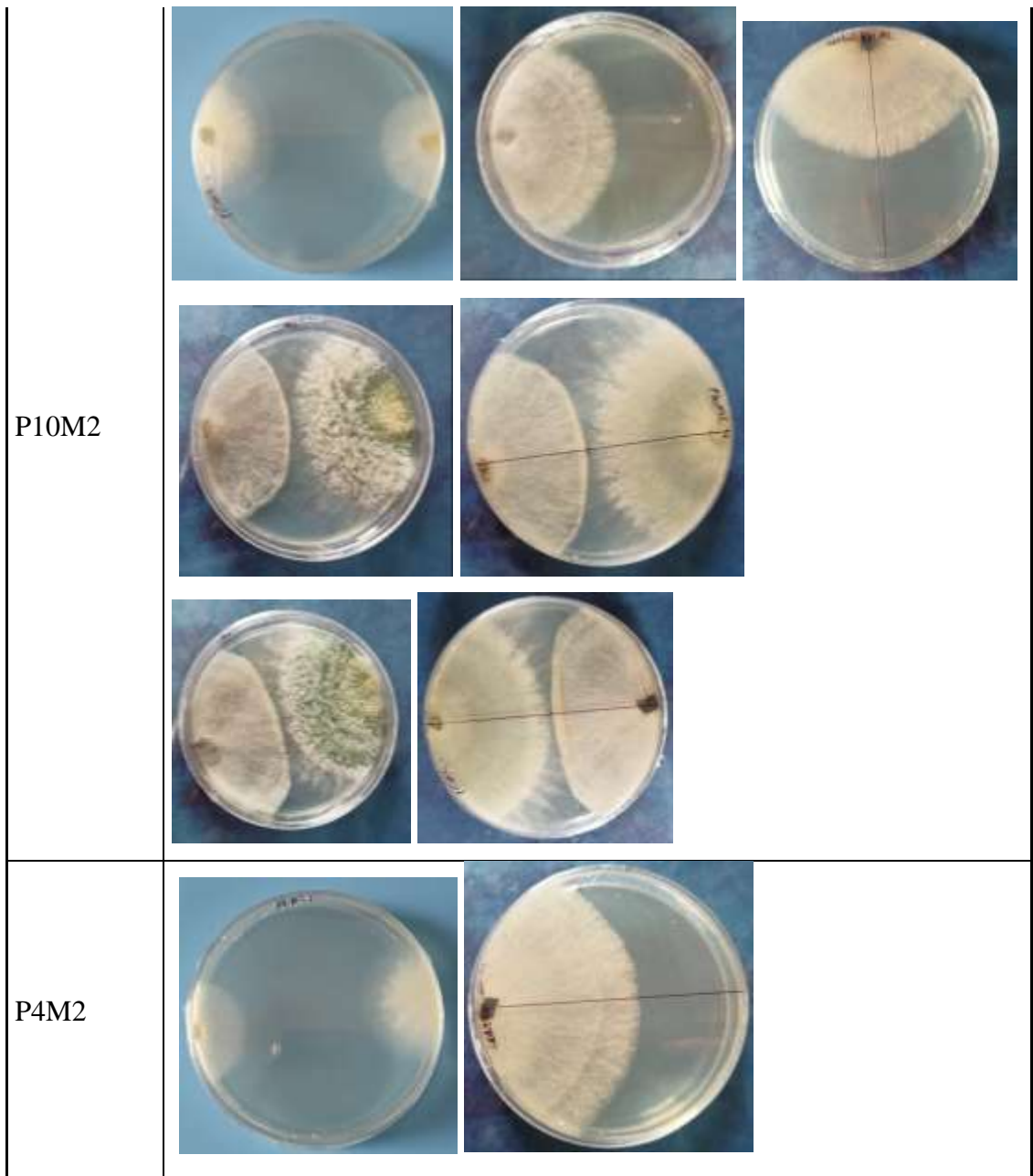
Caracterización de la actividad biocontroladora de las cepas de *Trichoderma spp.* asociada al cultivo de cebolla.

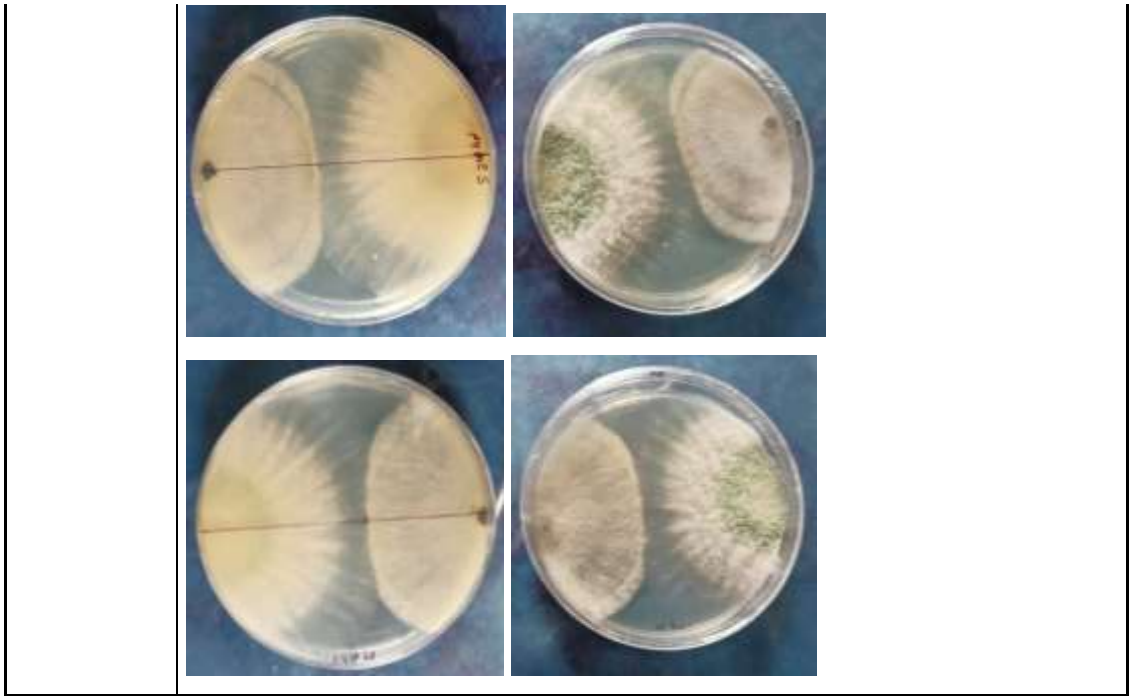
3.3.1. Caracterización de actividad biocontroladora mediante cultivo dual.

A los 7 días la cepa P5M1 no ejerció efecto inhibitor del crecimiento micelial de *S. cepivora*. Por otra parte, la cepa P6M3 a los 7 días fue que pudo confrontar su micelio con la colonia de *S. cepivora*, a partir de ese momento las hifas de este aislado no fueron capaces de seguir creciendo sobre la colonia del agente fitopatógeno. Las cepas P10M2 y P4M2 entraron en contacto con las colonias de *S. cepivora* a los 6 días. Asimismo, lograron una ligera inhibición del crecimiento micelial de la colonia, pero no fueron capaces de crecer sobre la colonia del agente fitopatógeno (tabla). Nuestros resultados difieren respecto a los obtenidos por Rivera-Mendez *et al.*, (2020) quienes fueron capaces de obtener aislados de *T. asperellum* con una excelente actividad antagónica in vitro en cultivo dual frente a *S. cepivora*.

Tabla 7. Imágenes del ensayo de confrontación dual de los cuatro aislados de *Trichoderma* vs *S. cepivora*.

iden	Imagen		
P5M1			
P6M3			


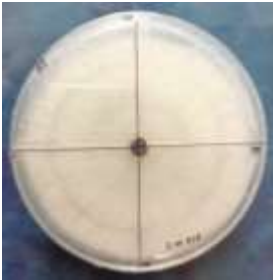
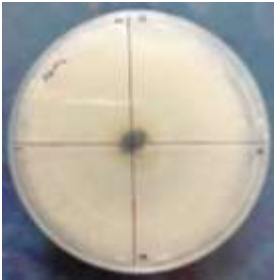


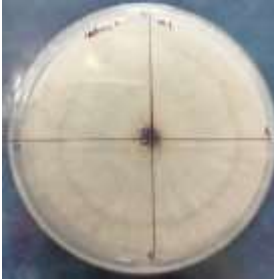


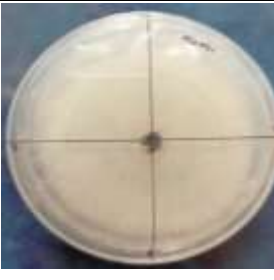


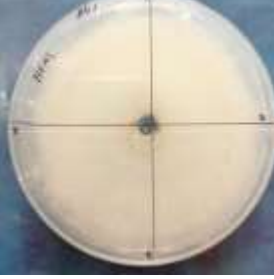




3.3.2. Producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica.

Ninguno de los cuatro aislados de *Trichoderma* fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial por lo cual se infiere que son cepas no productoras de compuestos volátiles (tabla). Acorde con nuestros resultados no se observó efecto inhibitor del crecimiento micelial de *S. cepivora* en ninguno de los 4 aislados obtenidos. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por **Ojaghian et al., (2019)** quienes obtuvieron cepas de *Trichoderma* sp. productoras de sustancias antifúngicas volátiles que inhibieron el crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.


Tabla 8. Imágenes del ensayo de producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica de los cuatro aislados de *Trichoderma* vs *S. cepivora*.




Tratamientos	Imagen		
P5M1			
P6M3			
P10M2			
P4M2			

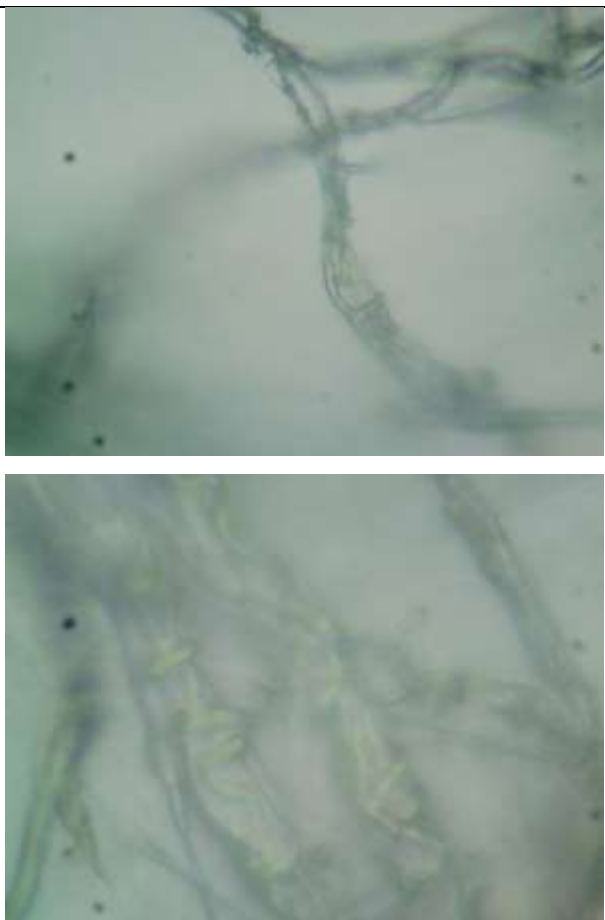
3.3.3. Análisis de las interacciones hifales en microcultivo

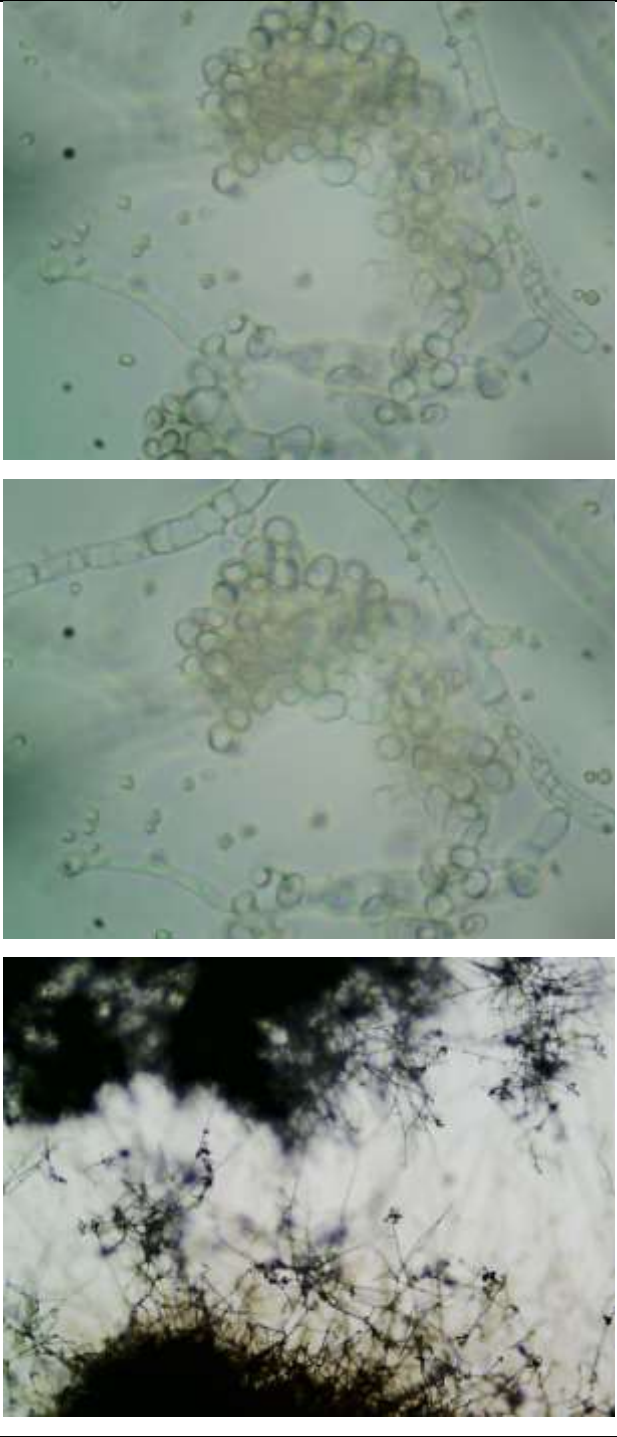
La cepa P10M2 mostró enrollamiento hifal, adhesión hifal y lisis hifal sobre *S. cepivora*. Por otra parte, la cepa P6M3 no logró establecer contacto hifal ni interacción con *S. cepivora*. La cepa P4M2 mostró enrollamiento, adhesión sobre *S. cepivora* mientras que la cepa P5M1 en algunos casos no estableció contacto hifal y en otros si, en estos últimos provocó modificaciones de las hifas con forma de barril e hinchamiento hifal de *S. cepivora* (tabla). El crecimiento adhesivo y de enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* sobre las hifas de *S. cepivora* fueron similares a los referidos por **Hirpara et al., (2017)**. De modo similar a nuestros resultados sobre la lisis hifal de *Sclerotium* causada por aislados de *Trichoderma* fue informado por **Kamelet et al., (2020)** sobre la especie *S. rolfsii* causante de la pudrición de raíces y la corona en el cultivo del tomate.

Tabla 9. Microfotografías de las interacciones hifales de aislados de *Trichoderma* vs *S. cepivora* utilizando la técnica del microcultivo

Cepas	Imágenes	Descripción
P10M2		Presenta enrollamiento

		
P5M1	 	<p>A simple vista parece que los dos micelios se topan pero al momento de observar en el microscopio las hifas no se entrelazan, es un tamaño mínimo que falta para que se toquen. En el lado donde <i>Trichoderma</i> spp. se encuentra <i>Sclerotinia</i> spp. no producen esclerocios y en la parte extrema lejos de <i>Sclerotinia</i> si se producen.</p>

P4M2		Presenta enrollamiento.
------	---	-------------------------

<p>P6M3</p>		<p>En algunos casos no se llegan a tocar.</p>
-------------	---	---

CAPITULO IV

4. Colusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

- Se logró aislar cuatro cepas nativas de *Trichoderma* asociadas al cultivo de cebolla con una débil actividad antagónica frente al agente causal de la pudrición blanca de la cebolla en la provincia de Tungurahua.
- Se aisló el agente causal de la pudrición banca de la cebolla utilizando el medio de cultivo PDA a partir de fragmentos de micelios de bulbos de cebolla infectados.
- Se observó una débil actividad biocontroladora de las cepas de *Trichoderma* mediante cultivo dual, sin la producción de compuestos con actividad antifúngica a pesar de observar algunos aislados que lograron enrollamiento hifal, adhesión hifal y lisis hifal sobre *S. cepivora*

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda utilizar el método de aislamiento directo a partir de muestras de suelo utilizando el medio de cultivo Agar Rosa de Bengala para seguir incrementando la colección de aislados de *Trichoderma* spp.
- Se recomienda realizar la identificación molecular de las cepas de *Trichoderma* obtenidas mediante PCR y secuenciación utilizando como base las regiones 1- Tef del Factor de elongación transcripcional, Calmodulina y B-tubulina.
- Evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de la cebolla de las cepas de *Trichoderma* obtenidas,

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS V

Abdelrahman, M., Abdel-Motaal, F., El-Sayed, M., Jogaiah, S., Shigyo, M., Ito, S. I., & Tran, L. S. P. (2016). Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* by target metabolite profiling. *Plant Science*, 246, 128-138.

Acurio Vásconez, R. D., & España Imbaquingo, C. K. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*lolium perenne*) y trébol blanco (*trifolium repens*). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 25(1), 53-61.

Aguilar, R. L., Morera, S. D. L. C. P., Coca, B. M., Gonzalez, R. L., & Sosa, D. B. N. (2012). Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* y su efecto antagonista frente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. *Centro Agrícola*, 39(2), 43-48.

Arenas, O. R., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernández, F. D., & Victoria, D. A. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.

Cortés-Rivera, H. J., Blancas-Benitez, F. J., del Carmen Romero-Islas, L., Gutiérrez-Martinez, P., & González-Estrada, R. R. (2019). In vitro evaluation of residues of coconut (*Cocos nucifera* L.) aqueous extracts, against the fungus *Penicillium italicum*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 613-617.

Cubillos, C. Á., Ramírez, M. G., & Toledo, R. L. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la

angostura de campoalegre (Huila). Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura, 1(1), 15-20.

Cummings, N. J., Ambrose, A., Braithwaite, M., Bissett, J., Roslan, H. A., Abdullah, J., ... Hill, R. A. (2016). Diversity of root-endophytic Trichoderma from Malaysian Borneo. Mycological Progress, 15(5). doi:10.1007/s11557-016-1192-x

Earnshaw, D., & Boland, G. J. (1997). Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. Plant pathology, 46(2), 229-238.

FAO. 2018. Dirección de Estadísticas: FAOSTAT, 2018. En sitio web: <http://faostat.fao.org>

Gemechu, M., Selvaraj, T., Jifara, T., Abera, A., & Ramaswamy, K. (2020). Evaluation of garlic varieties and fungicides for the management of white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum* Berk. in West Showa, Ethiopia. European Journal of Molecular & Clinical Medicine, 7(6), 1385-1402.

Granados, Milagro. 2015. PUDRICIÓN BLANCA DE LA CEBOLLA UNA ENFERMEDAD DIFÍCIL DE COMBATIR. En línea.
https://www.mag.go.cr/rev_agr/v29n02_143.pdf.

Hirpara, D. G., Gajera, H. P., Hirapara, J. G., & Golakiya, B. A. 2017. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant Trichoderma as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. Infection, Genetics and Evolution, 55, 75-92.

Kamel, S. M., Farag, F. M., Arafa, R. A., & Essa, T. A. 2020. Bio-control potentials of Trichoderma spp. against *Sclerotium rolfsii* the causative of root and crown rot in tomato, common bean and cabbage. Egyptian Journal of Phytopathology, 48(1), 122-136.

Lara Paredes, A. P. 2017. La comercialización de cebolla colorada y los ingresos de los productores que abastecen al mercado mayorista del cantón ambato (Master's thesis, Ambato: Universidad Tecnológica Indoamérica).

Marques, E., Martins, I., & Mello, S. C. M. D. 2018. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotropica*, 18.

Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. 2020. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-8.

Ocegueda-Reyes, Martha Delia, Casas-Solís, Josefina, Virgen-Calleros, Gil, González-Eguiarte, Diego Raymundo, López-Alcocer, Eduardo, & Olalde-Portugal, Victor. 2020. Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagónicas a *Sclerotium cepivorum*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(1), 146-159. Epub 27 de noviembre de 2020. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-2>

Ojaghian, S., Wang, L., Xie, G. L., & Zhang, J. Z. 2019. Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 136, 103999.

Rivera-Mendez, W., Obregon, M., Moran-Diez, M. E., Hermosa, R., & Monte, E. 2020. *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, 141, 104145.

Rivera William, 2015. Control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* utilizando *Trichoderma asperellum* en el cultivo del ajo en Costa Rica. en línea recuperado de https://www.redinnovagro.in/pdfs/Referencias_bibliograficas.pdf

Soheiliara, M., Sheikholeslami, M., & Zamanizadeh, H. R. (2020). Screening of native isolates of *Trichoderma* spp. for ability to control cucumber damping-off caused by *Phytophthora drechsleri*. *Journal of Crop Protection*, 9(2), 261-274.

Tello-Andrade, A. F., Jiménez-Moleón, M. C., & Sánchez-Galván, G. (2015). Management of sewage sludge by composting using fermented water hyacinth. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14781-14792.

Ulacio, Dilcia, Jiménez, María Auxiliadora, & Perdomo, Wilfredo. (2011). Estrategias de manejo integrado de *Sclerotium cepivorum* Berk., y la pudrición blanca del ajo en carache, estado trujillo, venezuela. *Bioagro*, 23(2), 105-114. Recuperado en 23 de julio de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612011000200005&lng=es&tlng=es.

Anexos VI

6. Anexo

- . Preparación de las trampas de arroz, melaza y harina de pescado



Identificación del terreno y colocación de trampas



Recolección de muestras.



Esterilización y preparación de los materiales para la siembra



Preparación y plaqueo del agar rosa de bengala



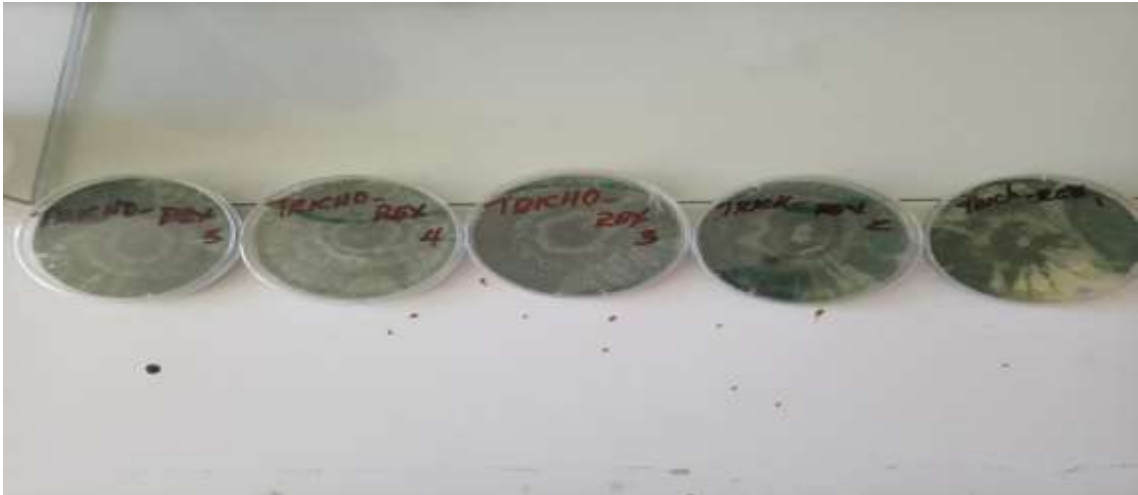
Siembra y etiquetado



Placas con Trichoderma contaminadas



Desarrollo del *trichoderma* purificado



Placa para caracterización en el microscopio



Aplicación de *Trichoderma* para el control de *Sclerotinia sepivorum*



Obtención de *Trichoderma* de raíces de cebolla sana

