

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA
AGRÍCOLA

PROSPECCIÓN DE *Trichoderma* y *Fusarium* EN EL DEPARTAMENTO DEL

PROGRESO

TESIS DE GRADO

HERNÁN HERNÁNDEZ CÁCERES

CARNET 13426-12

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, ABRIL DE 2017

CAMPUS CENTRAL

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA
AGRÍCOLA

PROSPECCIÓN DE *Trichoderma* y *Fusarium* EN EL DEPARTAMENTO DEL

PROGRESO
TESIS DE GRADO

TRABAJO PRESENTADO AL CONSEJO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

POR
HERNÁN HERNÁNDEZ CÁCERES

PREVIO A CONFERÍRSELE
EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, ABRIL DE 2017

CAMPUS CENTRAL

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.

VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉDEZ GONZÁLEZ
DE PENEÓ

VICERRECTOR
DE INVESTIGACIÓN Y
PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO

VICERRECTOR DE
INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO MOREIRA CHAVARRIA, S. J.

VICERRECTOR
ADMINISTRATIVO: LIC. ARIEL RIVERA IRÍAS

SECRETARIA GENERAL: LIC. FABIOLA DE LA LUZ PADILLA
BELTRANENA DE LORENZANA

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS

DECANO: DR. ADOLFO OTTONIEL MONTERROSO RIVAS

VICEDECANA: LIC. ANNA CRISTINA BAILEY HERNÁNDEZ

SECRETARIO: MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

DIRECTOR DE CARRERA: MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN

NOMBRE DEL ASESOR DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. ALVIN ROLANDO OVALLE LYNCH

MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN

MGTR. VICTOR MANUEL VENTURA PERDOMO

Guatemala, 2 de mayo de 2017.

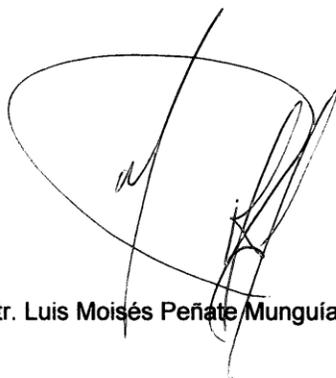
Honorables Miembros del Consejo
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Universidad Rafael Landívar
Guatemala

Estimados Miembros:

Por éste medio me permito extenderles un cordial saludo y sinceros deseos de éxito en su laudable labor educativa. Hago de su conocimiento que he asesorado la tesis titulada **“PROSPECCIÓN DE TRICHODERMA Y FUSARIUM EN EL DEPARTAMENTO DE EL PROGRESO”** llevada a cabo por el estudiante Hernán Hernández Cáceres carné No. 1342612.

A mi criterio dicho trabajo reúne las condiciones que ésta Facultad exige y atentamente solicito su consideración para ser aprobado.

Atentamente,



Mgtr. Luis Moisés Peñate Munguía

Ing. Luis Moisés Peñate Munguía M.A.
Especialista en Protección Vegetal
Colegiado 5495 CIAG



Universidad
Rafael Landívar
Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
No. 06688-2017

Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante HERNÁN HERNÁNDEZ CÁCERES, Carnet 13426-12 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA, del Campus Central, que consta en el Acta No. 0637-2017 de fecha 4 de abril de 2017, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

PROSPECCIÓN DE *Trichoderma* Y *Fusarium* EN EL DEPARTAMENTO DE EL PROGRESO

Previo a conferírsele el título de INGENIERO AGRÓNOMO CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA en el grado académico de LICENCIADO.

Dado en la ciudad de Guatemala de la Asunción, a los 28 días del mes de abril del año 2017.



MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA, SECRETARIO
CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
Universidad Rafael Landívar

Agradecimientos

A:

Ing. Luis Moisés Peñate Munguía, por el apoyo y la orientación para realizar el presente trabajo de investigación.

Ing. Julio García por apoyar con sus conocimientos y experiencia la realización del presente trabajo de investigación.

Lic. Anna Cristina Bailey Hernández por su apoyo en mis estudios.

La Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, por apoyar y por los recursos brindados para la realización del proyecto.

Dedicatoria

A:

Dios: Por darme salud, paciencia y sabiduría para terminar esta etapa de mi vida.

Mis padres: Hernán Hernández Díaz y Helida Cáceres Godínez por su ayuda, su esfuerzo y sacrificio, y ser mi motivación.

Mis hermana: Martha Alicia Hernández Cáceres , por su paciencia, cariño y apoyo incondicional.

Mi esposa: Por acompañarme y apoyarme a lo largo de toda la carrera.

Mis hijas e hijos: Por motivarme, apoyarme y darme su cariño durante mi carrera universitaria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 SITIOS DE INTERÉS AGRÍCOLA DE EL PROGRESO	3
2.1.1 ASPECTOS GEOGRÁFICOS	5
2.2 SUELOS	5
2.3 CULTIVOS	6
2.4 SUSCEPTIBILIDAD DE LOS CULTIVOS PRESENTES A <i>FUSARIUM</i>	7
2.5 SÍNTESIS DEL PROTOCOLO DE MONTREAL.....	9
2.6 SÍNTESIS DE LA TEORÍA DE LA EVOLUCIÓN DIVERGENTE.....	10
2.7 LA RIZÓSFERA	10
2.8 Trichoderma	11
2.9 Fusarium	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	19
4. OBJETIVOS.....	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1 Ambiente	22
5.2 Unidades de análisis	22
5.3 Tipo de Investigación	22
5.4 Instrumento	22
5.5 Procedimiento	23

5.6	Fase de campo	23
5.7	Fase de laboratorio	24
5.8	Análisis de la información.....	28
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	31
b.	Aislamientos.....	32
a.	Trichoderma.....	33
b.	Fusarium.....	33
7.	CONCLUSIONES	38
8.	RECOMENDACIONES	39
9.	BIBLIOGRAFÍA	40
10.	ANEXO.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Raíces de frijol infestadas por <i>Fusarium</i> . Fuente: Bello, 2011.	7
Figura 2: Planta de frijol afectada por <i>Fusarium</i> . Fuente: Bello, 2011.....	8
Figura 3: Planta de tomate afectada por <i>Fusarium</i>	8
Figura 4: Mazorca de maíz afectada por <i>Fusarium</i> . Fuente: (Apablaza Hidalgo, 2002)...	9
Figura 5: Planta de pepino afectada por <i>Fusarium</i> . Fuente: (Skaracis, Vakaloinakis, & Wang, 2008).....	9
Figura 6: Descripción de una curva e interpretación gráfica del método para el cálculo del área bajo ésta.....	29
Figura 7: Ejemplo del cálculo del área bajo la curva a través del método de Simpson. .	30
Figura 8: Crecimiento de <i>Trichoderma in vitro</i>	35
Figura 9: Crecimiento de <i>Fusarium in vitro</i>	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Resumen de estadísticas de los principales cultivos de importancia comercial de El Progreso.	7
Cuadro 2: Geo referenciación de los sitios de muestreo.	31
Cuadro 3: Descripción de los sitios de muestreo.	31
Cuadro 4: Colonias obtenidas en primer aislamiento por localidad y hongo.	32
Cuadro 5: Radio de crecimiento (cm) de <i>Trichoderma</i>	34
Cuadro 6: Radio de crecimiento (cm) de <i>Fusarium</i>	35
Cuadro 7: Área bajo la curva de radio de crecimiento (cm) para <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	37
Cuadro 8: Boleta de muestreo de suelo para las cepas de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> ..	46

PROSPECCIÓN DE TRICHODERMA Y FUSARIUM EN EL DEPARTAMENTO DE EL PROGRESO

RESUMEN

El objetivo del estudio fue realizar una prospección de *Trichoderma* y *Fusarium* en cultivos de importancia comercial del departamento de El Progreso para posteriormente caracterizar su crecimiento y otros aspectos *in vitro*, además de disponibilizarlas para un cepario. El proyecto de investigación se realizó en 3 municipios, San Antonio de La Paz , Morazán y Sanarate del departamento de El Progreso, donde se encuentran prioritariamente los cultivos de tomate, chile pimiento, maíz, frijol y pepino. Se obtuvieron muestras de suelo y planta para su pronta investigación práctica. Se realizaron medios selectivos y con antibióticos de acuerdo a diversos autores. Se obtuvieron únicamente *Trichoderma* y *Fusarium* en suelo y plantas de tomate en el municipio de San Antonio del departamento de El Progreso, de las cuales se presentan estadísticas de crecimiento, además se describen organolépticamente las colonias cultivadas *in vitro*. Dada la gran variabilidad territorial, diversos factores influyeron en no haber encontrado los hongos objeto de estudio en todas las localidades trazadas para la realización del mismo, como clima, manejo agronómico, estado de los suelos, cultivos, temperaturas altas y los diferentes agroquímicos que se usan ordinariamente en los lugares muestreados.

PROSPECTION OF *TRICHODERMA* AND *FUSARIUM* IN THE DEPARTMENT OF EL PROGRESO.

Summary

The objective of the study was to perform a prospection of *Trichoderma* and *Fusarium* in crops of commercial importance of the department of El Progreso to later characterize its growth and other aspects in vitro, in addition to making them available for a collection of microorganisms. The research project was carried out in three municipalities, San Antonio, Morazán and Sanarate in the department of El Progreso, where tomato, chili pepper, corn, bean and cucumber crops are mainly found. Soil and plant samples were obtained for prompt practical investigation. Selective media and antibiotics were performed according to different authors. Only *Trichoderma* and *Fusarium* were obtained in soil and tomato plants in the municipality of San Antonio in the department of El Progreso, of which growth statistics are presented, in addition organoléptically are described the colonies cultivated in vitro. Due to the great territorial variability, several factors could have influenced not having found the fungi studied in other locations, such as climate, agronomic management, soil status, crops, high temperatures and the different agrochemicals that are commonly used in the sampled sites.

1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación se motiva y basa epistemológicamente en el estudio de la historia natural a través de la teoría de la evolución divergente y su principio de la radiación evolutiva, ésta postula que la variabilidad biológica será equiparable al número de nichos diferenciables en sus componentes constitutivos como el suelo, ambiente, disponibilidad de agua y diversidad de nutrientes, minerales y orgánicos (Vergara, 2009).

Siendo que Guatemala se caracteriza por tener diversidad de condiciones ambientales y biológicas, además, es considerado entre los 19 países más biodiversos del mundo, forma parte del grupo de países considerados megadiversos (Gobierno de Guatemala, S.F.).

Guatemala cuenta con un gran número de especies, todas de interés para la humanidad por formar parte del gran eco sistema que conformamos a nivel mundial, algunas de ellas, importantes para la producción de bienes y servicios agrícolas y ambientales, deben primero conocerse, luego estudiarse para poder conservarse (Maselli, 2013).

En la mayoría de municipios de Guatemala muchos cultivos han caído en crisis, por el ataque de *Fusarium* spp, en algunas regiones los suelos han quedado infestados con el hongo, por lo que ya no se pueden cultivar las especies vegetales que con anterioridad se plantaban, debido a que son susceptibles al patógeno anteriormente mencionado; sin embargo se sabe que el país cuenta con especies de *Trichoderma* nativas que pueden mitigar la problemática, aunque se han realizado diversos intentos y montado planes de manejo contra la enfermedad con agroquímicos, tienden a no ser eficientes en la actualidad y la única alternativa eficiente que es el bromuro de metilo como desinfectante de suelo está vedada legalmente, se sabe del constante desarrollo de otras moléculas para el control de éste patógeno, sin embargo, en el presente estudio nos enfocamos en desarrollar los primeros pasos para el uso de agentes de control biológico locales, su búsqueda.

Es bien sabido que *Trichoderma* actúa como antagonista de hongos fitopatógenos de raíz y follaje, es un estimulador del crecimiento de las raíces, ayuda a descomponer materia orgánica y puede funcionar como un bio remediador (Hjeljord L, Tronsmo A., 1998).

En la acción bio controladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (N. L. , 2001).

Trichoderma reúne características que lo perfilan como uno de los agentes de control biológico de mayor importancia en la actualidad y proyectado puesto que ejerce mecanismos como antagonismo, hiperparasitismo y antibiosis sobre diversas especies de hongos de importancia económica (Harman, 2006).

Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizosfera de las plantas. Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores.

El presente estudio pretende buscar y caracterizar cepas de dos géneros de hongos cosmopolitas, uno de ellos con el potencial de controlar biológicamente al otro y es básico para el análisis del potencial de las cepas encontradas de *Trichoderma* para el control de *Fusarium* pero en su discusión más amplia tiene que ver con el uso de agentes de control biológico, en particular, con aquellos cuyo nicho ecológico primario es el suelo y respondiendo a lo requerido en el protocolo de Montreal, del que Guatemala es signatario, buscando alternativas para el manejo de enfermedades del suelo en lugar de plaguicidas sintetizados artificialmente.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 SITIOS DE INTERÉS AGRÍCOLA DE EL PROGRESO

En función del objeto de la propuesta de Tesis, se considera relevante presentar hechos y estadísticas referentes al Departamento de El Progreso, para delimitar los sitios de interés para la obtención de muestras tanto de suelo como de planta para su diagnóstico y posible obtención de los hongos *Trichoderma* y *Fusarium*.

El departamento de El Progreso está localizado en el sureste de Guatemala a orillas del el Río Motagua, aproximadamente a la mitad de su curso.

Su forma es casi rectangular y está orientado de noreste a sureste. Está rodeado al sureste por el departamento de Guatemala; al oeste, por Baja Verapaz, al norte, por Alta Verapaz; al noreste, por Zacapa y al sureste por Jalapa.

La cabecera departamental, Guastatoya, queda aproximadamente a 56.08 kilómetros en línea recta al noreste de Guatemala y a 181.56 en línea recta al sureste de Puerto Barrios. Toda el área está en la división fisiográfica de la altiplanicie central está completamente seccionada y la topografía en general es muy escarpa. Las elevaciones varían desde menos de 300 metros, donde el rio Motagua deja el área, hasta más, de 1500 metros sobre el nivel del mar al sur de San Antonio La Paz, al norte del Progreso.

El río Motagua divide el departamento por la mitad y el drenaje es hacia el mar caribe a través de este rio (Charles S. Simmons, José Manuel Tárano T., José Humberto Pinto Z., 1959).

El departamento de El Progreso tiene ocho municipios los cuales son:

1. Guastatoya.
2. Morazán.
3. San Agustín Acasaguastlán.
4. San Cristóbal Acasaguastlán.
5. El Júcaro.
6. Sansare.
7. Sanarate.
8. San Antonio La Paz.

En el departamento de El Progreso se cuenta con cinco zonas de vida vegetal, basándose en la clasificación propuesta por Holdrige en 1978, las cuales se detallan a continuación:

- **me-S** Monte Espinoso Subtropical.
- **bs-S** Bosque Seco Subtropical.
- **bh-S (t)** Bosque Húmedo Subtropical Templado.
- **bmh - S (f)** Bosque Muy Húmedo Subtropical Frío.
- **bp-MB** Bosque Pluvial Montano Bajo Subtropical.

(Simmons, et al 1959)

2.1.1 ASPECTOS GEOGRÁFICOS

Longitud Tiene alrededor de 62 kilómetros de largo y 32 kilómetros de ancho y comprende 192200 hectáreas, o el 1.77 por ciento del área de la república. Es uno de los departamentos más pequeños, siendo el decimoctavo en tamaño (Simmons, et al 1959).

Pendientes el departamento del progreso se encuentra en una pendiente muy inclinada hacia el norte del país.

2.2 SUELOS

a. Suelos desarrollados en materiales volcánicos

Estos suelos están en la esquina suroeste del departamento donde el área fue cubierta por materiales volcánicos en la misma época que las otras partes de Guatemala central. La roca madre es granito y gneis. Además se encuentran a lo largo del Río Motagua donde se han formado grandes terrazas de materiales volcánicos durante los periodos volcánicos activos. Son suelos poco profundos, con vegetación rala y pendiente inclinada, excepto en las áreas del Motagua últimamente mencionadas (Simmons, et al 1959).

Suelos profundos sobre materiales de color claro, ocupan relieves fuertemente ondulados a inclinados y generalmente no son aptos para el cultivo (Simmons, et al 1959).

b. Suelos desarrollados sobre materiales sedimentados o metamórficos

En su mayoría ocupan pendientes inclinadas que no son adaptables al cultivo, pero algunas de ellos son lo más productivas de la región. En general son apropiados exclusivamente para pastos permanentes, cultivos ocasionales, o bosques; algunas áreas son buenas para café (Simmons, et al 1959).

Suelos profundos, están los suelos Civija y Marajuma. Se encuentran a mayor altitud, donde reciben más humedad que la mayoría de los suelos en El Progreso. En estos puede cultivarse el café con éxito a elevaciones menores de los 1,600 metros sobre el nivel del mar (Simmons, et al 1959).

Suelos poco profundos sobre esquisto y serpentina están los suelos Acasaguastlán, Chol, Chuarrancho y Sholanimá. Están en las pendientes muy inclinadas y no son aptos para los cultivos. Casi toda el área esta en bosques o en pastos y malezas. La especie principal es el pino, pero también hay roble entremezclados en el bosque (Simmons, et al 1959).

Suelos poco profundos sobre piedra caliza y esquisto arcilloso, están los suelos Sansare y Subinal. Ocupan pendientes inclinadas al sur del río Motagua y no son buenos para los cultivos limpios, pero como son fértiles y carecen de piedras grandes, gran parte del área se usa para la producción de maíz con labor manual. La erosión es seria en muchas partes (Simmons, et al 1959).

2.3 CULTIVOS

Se depuraron los cultivos con mayor producción en el departamento de El Progreso y económicamente más importantes según los datos obtenidos personalmente por el encargado del MAGA del departamento de EL Progreso (Herrera, 2016).

Cuadro 1 Resumen de estadísticas de los principales cultivos de importancia comercial de El Progreso.

Número de fincas censales, superficie cosechada y producción obtenida de cultivos anuales o temporales, según departamento y cultivo. Año agrícola 2002/2003 (Superficie en hectáreas y producción en kilogramos)				
Departamento y cultivo	Número de fincas	Superficie cosechada	Producción obtenida	Rendimiento
El Progreso				
Frijol Negro	6,084	5,363	6138600	8
Maiz Blanco	8,420	9,395	21,651,100	16.1
Tomate	277	209	10,840,800	362.57
Chile Pimiento	37	31	970,700	220.15
Tabaco (en rama)	45	171	904,900	37.09
Pepino	96	124	5,233,600	295.68

(MAGA, S.F.)

2.4 SUSCEPTIBILIDAD DE LOS CULTIVOS PRESENTES A *FUSARIUM*

Fusarium afecta directamente a los cultivos de interés en el departamento de El Progreso según lo estudiado en distintos estudios realizados en varios lugares y realizado por distintas instituciones científicas o agrícolas (CPC, 2016).

a. Frijol

Es afectada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* que causa la pudrición en las raíces de la planta y también es afectado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* que produce el marchitamiento y posteriormente la muerte de la planta (Bello, 2011).



Figura 1: Raíces de frijol infestadas por *Fusarium*. Fuente: Bello, 2011.



Figura 2: Planta de frijol afectada por *Fusarium*. Fuente: Bello, 2011.

b. Tomate y Chile Pimiento

Esta enfermedad es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* que produce un marchitamiento general de la planta o también llamada la "seca" de la planta, debido a la trombosis de los vasos. Ataca en todos los estados de crecimiento y en caso de producirse en semillero, acaba con la muerte de la plántula. Forma una estructura resistente de supervivencia en el tiempo y en el espacio, pudiendo así mantenerse en un terreno durante incluso más de 10 años (MSc, 2016).



Figura 3: Planta de tomate afectada por *Fusarium*.

c. Maíz

El principal agente patógeno causante de la podredumbre de la mazorca *Fusarium verticiloides*, se inicia con la formación de micelios blancos, que van descendiendo

desde la punta de la mazorca y dan una coloración rojiza a rosada a los granos infectados. Seguidamente se producen micotoxinas, particularmente las fumonisinas que tienen efectos tóxicos cuando son consumidos por humanos y animales. *Fusarium verticillioides* ataca en todos los estados de crecimiento de la planta de maíz (Levin, Ridao, & Castaño, 2003).



Figura 4: Mazorca de maíz afectada por *Fusarium*. Fuente: (Apablaza Hidalgo, 2002).

d. Pepino

Fusarium oxysporum sp. *cucumerinum* afecta al cultivo de pepino, los síntomas producidos por este hongo son estrías necróticas en los tallos, amarillamiento de las hojas basales, marchitez y muerte de las plantas. En un corte transversal de los tallos se aprecia una coloración parda de una parte o de todo el sistema vascular. Sobre la estrías se observa frecuentemente un moho rosa anaranjado. (Skaracis, Vakaloinakis, & Wang, 2008)



Figura 5: Planta de pepino afectada por *Fusarium*. Fuente: (Skaracis, Vakaloinakis, & Wang, 2008).

2.5 SÍNTESIS DEL PROTOCOLO DE MONTREAL

El Protocolo de Montreal establece los mecanismos para los procesos de eliminación de las sustancias que dañan la capa de ozono, con obligaciones diferenciadas y con la

creación del Fondo Multilateral, que ha facilitado la reconversión industrial en los países en vías de desarrollo a través de las diferentes agencias implementadoras (Stavro Tirado, Xiomara Ibeth, 2013).

Se está avanzado de manera gradual, pero aún quedan metas muy importantes por cumplir. Esta tarea implica el compromiso de todos de cambiar nuestros hábitos de consumo y colaborar en la preservación del entorno.

2.6 SÍNTESIS DE LA TEORÍA DE LA EVOLUCIÓN DIVERGENTE

También se le denomina radiación adaptiva. La evolución parte de una sola especie ancestral que al dispersar origina una variedad de formas que habitan medios algo diferente (Vergara, 2009).

La evolución es un proceso de adaptación que ocurre en todas las especies de seres vivos. El objetivo de la evolución es la supervivencia de la especie basándose en cambiar el organismo de forma que pueda aprovechar de forma más eficiente los recursos de que dispone en su ecosistema (Vergara, 2009).

La evolución divergente es técnicamente la mutación que pueden sufrir distintos seres vivos con el objetivo de mantenerse vivos en distintos cambios en sus ecosistemas y/o el tiempo.

2.7 LA RIZÓSFERA

Es importante definir la rizósfera para entender el hábitat de los microorganismos en el suelo. La rizósfera es el suelo que se encuentra próximo a una raíz viva y es una zona de intensa actividad microbial alrededor de esta (Agrios, 1998).

El número de organismos que habitan la rizósfera es mucho mayor que fuera de ella. Estos organismos compiten entre ellos por espacio, nutrientes y carbón. Se puede decir que la rizósfera es un campo de batalla entre microorganismos patógenos y no patógenos de la cual depende la supervivencia de las plantas. El efecto de organismos fitopatógenos sobre las plantas resulta de las reacciones bioquímicas entre las sustancias producidas por fitopatógenos que se encuentran en el suelo y los exudados de raíces. Algunos hongos fitopatógenos producen sustancias como: enzimas, toxinas,

reguladores de crecimiento y polisacáridos. Los polisacáridos principalmente son importantes en las enfermedades vasculares porque interfieren pasivamente con la translocación de agua en las plantas y pueden ser fungitóxicos (Agris, 1998).

2.8 Trichoderma

a. Descripción

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizósfera de la planta (Villegas, 2016).

El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Villegas, 2016).

El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos. *Trichoderma* se ubica taxonómicamente según (Villegas, 2016).

Reino: Fungi.

Filo: Ascomycota.

Clase: Sordariomycetes.

Orden Hypocreales:.

Familia: Hypocreaceae.

Género: *Trichoderma*.

(Center, 2017)

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa (Díaz, 1994)..

El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal (Díaz, 1994). .

Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas . Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Díaz, 1994).

b. Importancia como agente de control biológico

Se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que incitan o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Haram, Schickler H, Oppenheim A, & Chet , 1996).

c. Mecanismos de acción

- Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis

no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico.

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas "antibióticos" (Infante, Martínez , Gonzales, & Reyes, 2009).

- **Micoparasitismo**

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Díaz, 1994).

- **Competencia**

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (N. P. , 2004).

La presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas, forestales, en barbechos), se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie (N. P. , 2004).

Trichoderma está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Hjeljord L, Tronsmo A., 1998).

- **Antagonismo**

La capacidad como antagonista de *Trichoderma* es altamente variable.

Esta capacidad depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción; es decir pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno que de otro; por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada.

Esto evidenció, que es imprescindible la selección de aislamientos promisorios para el control de un agente plaga, que incluye el estudio de los mecanismos relacionados con dicho control.

Trichoderma ejerce su acción como antagonista y colonizador de las raíces, como son:

- Aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta.
- Solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos.
- Estimulación del crecimiento vegetal.
- Inducción de resistencia.

Estos actúan indirectamente sobre los patógenos, ya que su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta (B. Martínez, Danay Infante, Yusimy Reyes., 2016).

d. Herramientas para su identificación

El hongo *Trichoderma*, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (conidias). Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol.

Las colonias de *Trichoderma* presentan crecimiento rápido, que va formando una colonia delgada sobre la superficie del agar, debido a la conidiación que presenta a

través de su desarrollo. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan penachos blancos o algodonosos de micelio blanco conformando una red densa responsable del pigmento característico (Barnett & Hunter, 1999).

Las especies del género *Trichoderma* presentan conidióforos complejos y altamente ramificados en forma piramidal o cónica dando origen a esterigmas, con extremos ahusados. Al microscopio las fiálides se observan más estrechas en la base que la parte superior, permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de estas (Barnett & Hunter, 1999) .

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa.

Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas.

Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Diaz, 1994). Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Bissett, 1992).

TrichOKEY: Código de barras molecular.

La tricomoniasis OKEY 2 es un programa para la identificación molecular rápido de *Hypocrea* y *Trichoderma* en los niveles del género y especie en base a un oligonucleótido de ADN código de barras, una combinación de diagnóstico de varios oligonucleótidos (punzones) asignados específicamente dentro del espaciador transcrito interno 1 y 2 (ITS1 e 2) secuencias de grupo de genes de rRNA.

La versión actual contiene nuevos módulos integrados para aumentar la fiabilidad de los resultados, que son impulsados por la identificación simultánea de múltiples secuencias, herramienta de búsqueda de similitudes complementaria y tiene una interfaz gráfica avanzada. (John Bissett, Gams Walter, Walter Jaklitsch , y Gary J. Samuels. , 2015)

2.9 Fusarium

a. Descripción

- Anatomía y morfología

La taxonomía para este género es bastante compleja y ha sufrido diversos cambios desde las primeras descripciones hechas por Link en 1803. A pesar de los avances en la taxonomía molecular, y la aparición de metodologías como MALDI-TOF, la taxonomía clásica continúa vigente, aunque requiere de la experiencia del observador.

Al microscopio, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovals, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas; todas observables a la lupa (40x). Otro tipo de conidios son los mesoconidios, que son similares pero de menor tamaño que los macroconidios y nunca forman estructuras mucoides. Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo. (Piontelli, 2011)

En medio de cultivo el micelio es extensivo y parecido a algodón, a menudo con un tono rosado, morado o amarillo. Conidióforos variables, delgados y simples, cortos, con ramificaciones irregulares o con fialides simples o agrupadas en esporodoquio; conidias (fialosporas) hialinas, variables, principalmente de dos tipos, a menudo sostenidas en pequeñas cabezas parecidas a gotas; macroconidias multicelular, curvados o ligeramente doblados en las puntas, con forma de canoa; micronidia unicelular, ovoide o oblonga, simples o en cadenas; algunas conidias intermedias de 2 a 3 células, oblongos o ligeramente curvados; parasítico en plantas vasculares y saprofitico en material muerto (Barnett & Hunter, 1999).

Reino: Fungi.

Filo: Ascomycota.

Clase: Sordariomycetes.

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae .

Género: *Fusarium*.

(Center, 2017)

b. Importancia como patógeno agrícola

Su control a través del uso de agroquímicos es cada vez menos viable y la única alternativa efectiva para la manejo en el suelo es el uso de bromuro de metilo, sustancia que está cada vez más limitada por razones de carácter ambiental, aún el uso de métodos físicos como vapor y solarización tienen menos impacto en el control de *Fusarium* y parece que agravan su efecto al reducir la biodiversidad del suelo y al ser éste termo estable (Bello, 2011).

Uno de los grupo de hongos de mayor importancia en la agricultura, causan marchitamiento vascular; pudrición de raíz, corona, tallo, fruto, y semillas (Bello, 2011).

Factores que favorecen la enfermedad: suelos con pobre drenaje favorecen la sobrevivencia y distribución del inóculo, suelo compactado, períodos de estrés hídrico, falta de nitrógeno debilita las plantas y las predispone a la enfermedad y nitrógeno en forma de amonio (se acidifica el suelo) puede incrementar la incidencia (Bello, 2011).

c. Herramientas para su identificación

- Métodos para aislamiento y cultivo

Existen distintos medios que permiten su crecimiento; entre ellos, agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud, agar Clavel (CLA), agar de Spezieller Nährstoff-farmer (SNA) y agar avena. Los agares PDA y Sabouraud permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio, mientras que el agar CLA, permite observar el desarrollo de cadenas de microconidios y morfología en detalle de macroconidios (Leslie J F, Summerell B A. , 2006).

- Diagnóstico molecular

La PCR ofrece una sensibilidad y especificidad como herramienta para detectar, identificar y cuantificar las especies presentes en los tejidos vegetales.

El problema en el uso de estos ensayos es la dificultad de identificar especies correctamente en cultivos mixtos y la comprensión de la filogenia del género *Fusarium* sigue siendo limitada (Barnett & Hunter, 1999).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En Guatemala, particularmente en el departamento de El Progreso, existen diversos cultivos de importancia económica para distintos municipios aunque los de mayor ingreso económicos para el departamento son maíz, frijol, tomate, chile pimiento, tabaco y pepino (Herrera, 2016), que son muy susceptibles y afectados por el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. que para su control se utiliza como medida preventiva principalmente diversidad agroquímicos sintéticos.

La creciente preocupación por la salud, especialmente en los países desarrollados, ha estimulado la aparición de la agricultura orgánica o ecológica que busca cultivar sin emplear productos químicos (fertilizantes, pesticidas) o semillas transgénicas para obtener una producción de calidad apta para el consumo humano y que, al mismo tiempo, respete la fertilidad natural de la tierra y minimice el impacto medioambiental (Montoya, 2014).

La tendencia de la agricultura mundial es reducir el uso de plaguicidas sintetizados artificialmente y por el contrario incrementar el uso de otras metodologías como el control biológico.

La problemática ligada a la susceptibilidad de los cultivos primarios del departamento (maíz, frijol, tomate, chile pimiento, tabaco y pepino) y la carencia de amplitud de medios de control eficientes y sustentables más allá de aquellos orientados a la reducción de inóculo, utilización de planta sana, y podas de saneamiento y otros poco extendibles como cultivo sin suelo, hacen valorar la alternativa que el control biológico podría brindar, es sabido su relativo bajo costo y bajo impacto ambiental.

Al momento se tiene suficiente información documental para considerar que existe una alta probabilidad de la existencia de razas y especies de *Trichoderma* spp. que

podrían tener las características y atributos necesarios para contribuir al manejo biológico de *Fusarium* spp. mucho de lo realizado al momento consiste en la prospección de nichos vastos pero con bajo nivel de contrastes ambientales, de tal manera que el potencial de Guatemala como mosaico territorial supera teóricamente los ejercicios anteriores y supone una probabilidad de éxito superior en encontrar cepas promisorias para el control de *Fusarium*.

El alcance de esta investigación es básico pues pretende buscar, aislar, purificar, caracterizar para generar información sobre la presencia de *Trichoderma* y *Fusarium* en el departamento de El Progreso en el marco de una investigación más amplia y la conformación de un cepario cosa con la que no se cuenta en las principales Universidades del país.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Explorar la existencia de *Trichoderma* y *Fusarium* en cultivos de importancia comercial del departamento de El Progreso para posteriormente realizar un cepario.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar a nivel de laboratorio cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* encontradas como consecuencia de la prospección en suelo y plantas en el departamento del Progreso.
- Caracterizar morfológicamente las cepas encontradas de *Trichoderma* y *Fusarium* en las localidades del Progreso

5. METODOLOGÍA

5.1 Ambiente

El proyecto de investigación se realizó en 3 municipios, San Antonio, Morazán y Sanarate del departamento de El Progreso donde se encuentran las plantaciones de los cultivos de mayor importancia de ingresos económicos según la información obtenida por el encargado del MAGA en el departamento de El Progreso (Herrera, 2016). Con la información obtenida de los distintos cultivos dentro del departamento se depuraron los de mayor importancia económica de los cuales se tomaron distintas muestras para la elaboración del proyecto de investigación.

5.2 Unidades de análisis

Las unidades de análisis correspondieron a las muestras de suelo para el caso de *Trichoderma* y plantas sintomáticas para el caso de *Fusarium* en los sitios de interés.

Cuando se terminó el aislamiento de los hongos, las unidades de análisis fueron las cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* ya que estas deben de caracterizarse morfológicamente.

5.3 Tipo de Investigación

El proyecto planteado que se realizó es un estudio exploratorio con un enfoque mixto (cualitativo y cuantitativo).

5.4 Instrumento

Boleta de campo: Se utilizó una boleta para recolección de información en la toma de muestra de suelo, la cual se muestra en el anexo.

Para laboratorio:

- Atomizador: recipiente generalmente de plástico que se utiliza para aplicar sustancias como agua, desinfectantes, etc. en las muestras.
- Cajas petri: instrumento de laboratorio que se utiliza para el cultivo de bacterias, hongos y otros microorganismos, son colocados dentro del mismo diferentes medios de cultivo (por ejemplo agar), en los cuales se desarrollan los cultivos.

- Cámara de flujo laminar: instrumento que proporciona un ambiente controlado para la realización de diferentes actividades de laboratorio, su principal característica es el control del paso de aire a través de un filtro, el cual limpia dicho aire, teniendo con esto un área libre de partículas de hasta 0.1 micras.
- Lupa: instrumento necesario para el análisis minucioso de muestras, con dicho instrumento es posible apreciar características de la muestra que no son posibles observar a simple vista.
- Microscopio: a diferencia de la lupa, el microscopio es un instrumento que cuenta con una serie de lentes de amplificación para observar las muestras, teniendo con esto mayor detalle de los aspectos que se desean observar.
- Pinzas: instrumento necesario para la manipulación de las muestras, con el objetivo de no contaminar las mismas o realizar un daño que pueda alterar los resultados de la investigación.

Para llevar a cabo el muestreo de suelo:

- Pala plana.
- Cubetas plásticas.
- Tijeras jardineras.
- Barreno.

5.5 Procedimiento

5.6 Fase de campo

a. Muestreo de suelo

Se definió una ruta dentro del departamento o municipios de El Progreso.

Las muestras fueron colectadas al azar en los sitios de interés de cada cultivo (maíz, frijol, tomate, chile pimiento y pepino). Éstos se han definido en función de los cultivos de mayor importancia económica del departamento de El progreso, después de haber confirmado su susceptibilidad al patógeno objeto de búsqueda.

La muestra constó de suelo rizosférico para *Trichoderma*, el cual se colectó por medio de una pala recta de la zona rizosférica de cada planta a una profundidad entre 15 a 20 cm, abarcando una periferia de 15 cm circundante al tallo de la planta, tomando aproximadamente 1 kg de muestra (Luna, 2012).

Para *Fusarium* se buscaron plantas sintomáticas en marchitez o en pudrición, con la muestra se realizó un levantamiento de datos de las variables medioambientales del área. En cada sitio se tomarán 2 muestras, las cuales constarán de 5 sub muestras las cuales se mezclaron y homogenizaron para formar una muestra compuesta. En cuanto al suelo, la muestra se tomó de los primeros 20 cm de suelo eliminando la materia orgánica superficial.

Las muestras se depositaron en bolsas plásticas esterilizadas para su transporte. Estas se conservaron a 4° C aproximadamente hasta su utilización.

Con base en los cultivos de importancia para el departamento de El Progreso, el muestreo se realizó en los tres municipios principales para la producción de los mismos. Los criterios para la tomas de muestras fueron los siguientes:

- Condiciones edafoclimáticas.
- Estado fisiológico de las plantas.
- Manejo del cultivo.
- Métodos de control contra *Fusarium*.

5.7 Fase de laboratorio

a. Aislamiento de *Trichoderma* y *Fusarium*

Se realizó el aislamiento de los hongos a través del método de dilución en placa en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas de la Universidad Rafael Landívar de Guatemala.

En el mismo lugar, se realizaron los cultivos para la purificación al tener éstos se realizó el análisis morfométrico, empleando un microscopio con una cámara digital especial

que a través de un software (LEICA), permite obtener las mediciones de las estructuras principales de éstos (conidios, conidióforos, otros).

El método de dilución en placa se fundamenta en que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación, como la formación de colonias en placas de agar. Este método consiste en la preparación de una serie de diluciones de una muestra de suelo en un diluyente apropiado, esparciendo una alícuota de una dilución sobre la superficie de un medio de cultivo sólido e incubando la placa de agar bajo condiciones ambientales apropiadas. La dilución debe permitir generar colonias separadas, cada colonia puede proceder de una sola célula o de una agrupación (unidad viable). Bajo este fundamento, estas placas pueden ser usadas no sólo para el conteo de poblaciones microbianas, sino también para el aislamiento de organismos. Un medio selectivo o no selectivo puede ser usado dependiendo de la naturaleza del microorganismo que se desea contar o aislar (Ramírez, y otros, 1992). El procedimiento de aislamiento se detalla a continuación:

Procedimiento para suelo:

1. En condiciones estériles (trabajar en campana de flujo laminar), adicionar 1 g del suelo a una botella de dilución o matraz con tapa de rosca con 99 ml de agua destilada. Dispersar el suelo y homogeneizar con agitación vigorosa en vórtex (de ser posible).
2. Tomar 1 ml y transferirlo a un tubo con 9 ml de solución salina estéril (dilución 10⁻³). De ahí se hacen diluciones sucesivas hasta completar diluciones decimales hasta 10⁻¹⁰ o las adecuadas, asegurándose de utilizar una punta o pipeta estéril diferente en cada paso. Agitar de forma constante con vórtex en cada paso.
3. Tomar 0.1 ml de la dilución seleccionada y colocarla en el centro de la superficie del medio de cultivo seleccionado para el crecimiento. Realizar esto por triplicado y con tres diluciones próximas para asegurar la cuenta.
4. Extender la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por la flama del mechero permitiendo su enfriamiento). Asegurar una distribución homogénea por

toda la superficie del medio. El medio a utilizar tanto para *Fusarium* como para *Trichoderma* será PDA (Harman, 2006).

5. Incubar las placas de forma invertida a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Procedimiento para tejido vegetal:

1. Se seleccionaron explantes pequeños de 5 a 10 mm² de los tallos de las plantas, se realizaron a partir del borde de la lesión infectada a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos. Esos cortes se colocaron en soluciones esterilizantes de superficie, intercalando inmersión en agua estéril, lo cual aseguró que esas superficies se humedecieran y al cabo de 15 ó 30 segundos los cortes se tomaron asépticamente uno por uno a intervalos regulares de tiempo (por ejemplo, cada 10 ó 15 segundos), a fin de que cada uno de ellos se esterilice (a nivel de su superficie) a diferentes tiempos, se utilizó para éste fin solución de alcohol al 95% e hipoclorito de sodio al 5%.
2. Posteriormente, los cortes se secaron en trozos limpios de papel estéril y finalmente se colocaron en cajas de Petri con medio nutritivo Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) + Estreptomycin 39:1 (gramos/L) (Leslie, J y Summerell, B, 2006).
3. Posteriormente, las colonias del patógeno, se sembraron para su purificación en subsecuentes ciclos de siembra en medio nutritivo (Agrios, 1996).

a. Caracterización morfológica

Se detalló una descripción detallada de los cultivos como color de la colonia, reversos de las colonias, textura de las colonias; también se pretende poder detallar las estructuras de los hongos encontrados incluyendo, hifas, conidióforos, microconidias, macroconidias, fiálides, tamaño, color y forma. Se determinó el desarrollo mediante las medidas del crecimiento micelial de los hongos y se contabilizaran las colonias formadas.

Consistió en caracterizar morfométricamente la estructura de los hongos encontrados: conidias, conidióforos, células de las hifas. La colonia de *Trichoderma* spp. se

reconocerá por su forma de crecimiento característico de parches o cojines verdes de conidios. Para cada muestra de suelo, se aislarán y contabilizarán las colonias que aparezcan durante los 5 y 7 días, después de la siembra. Las colonias de 10 días se observarán al microscopio compuesto, corroborando que presenten las características del género como es conidióforo hialino, muy ramificado, no verticilado; fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales (Barnett & Hunter, 1999).

El crecimiento del micelio se midió con un regla en centímetros de manera radial, desde el sitio de colocación del explante en el centro de la caja de Petri, hasta el borde del crecimiento.

b. Elaboración del cepario

Los aislamientos de las cepas de ambos hongos cultivados se esperan mantener efectivamente en medio PDA adentro de viales y también en viales con agua estéril, el medio PDA tiene como función principal preservar y conservar los cultivos de cepas específicas de hongos para su posterior utilización. También se realizó en agua estéril para su conservación.

Las cepas están identificadas con sus etiquetas detalladas cada una teniendo nombre, tipo de hongo y cultivo. Se conservarán en una incubadora en viales de 10cc, se almacenarán en los laboratorios de la FCAA de la Universidad Rafael Landívar, contribuyendo con esto al establecimiento del cepario de *Trichoderma* y *Fusarium* en Guatemala para poder de esta manera aportar información para un estudio más amplio y detallado posteriormente.

5.8 Análisis de la información

Para la investigación se realizaron cuadros comparativos para la caracterización de las localidades y muestras tomadas, incluyendo sus geo referencias, altitud y otras variables pertinentes.

Se realizaron cuadros de estadísticas descriptivas y gráficos del comportamiento del crecimiento micelial para ambos hongos y se determinó el área bajo la curva de progreso de éste crecimiento para inferir sobre su velocidad de crecimiento micelial, a través de dos métodos, el aritmético, basado en promedios en función de los intervalos y el de Simpson.

Se describen brevemente:

a) Método del trapecio:

Inicia la cita textual

“La regla del trapecio es uno de los métodos más utilizados para calcular aproximaciones numéricas de integrales definidas. Es la primera de las fórmulas cerradas de integración de Newton – Cotes, para el caso cuando el polinomio interpolante es de grado uno.

Para el polinomio interpolante de primer grado se tiene:

$$A = \int_a^b f(x) dx \cong \int_a^b f_1(x) dx,$$

Donde :

$$f_1(x) = f(a) + f(b) - f(a) \frac{b-x}{b-a}$$

Precisamente el área bajo la recta es una aproximación de la integral $\int_a^b f(x) dx$, es decir que $A = \int_a^b [f(a) + f(b) - f(a) \frac{b-x}{b-a}] dx$. Luego se tiene que la regla del trapecio viene dada por la fórmula:

$$A = \int_a^b f(x) dx \approx (b-a) \left[\frac{f(a) + f(b)}{2} \right]$$

El nombre regla del trapecio se debe a la interpretación geométrica que se hace de la fórmula. Cuando el polinomio interpolante es de grado uno, su gráfica representa una línea recta en el intervalo $[a, b]$ que es el área del trapecio que se forma, como se muestra en la figura.

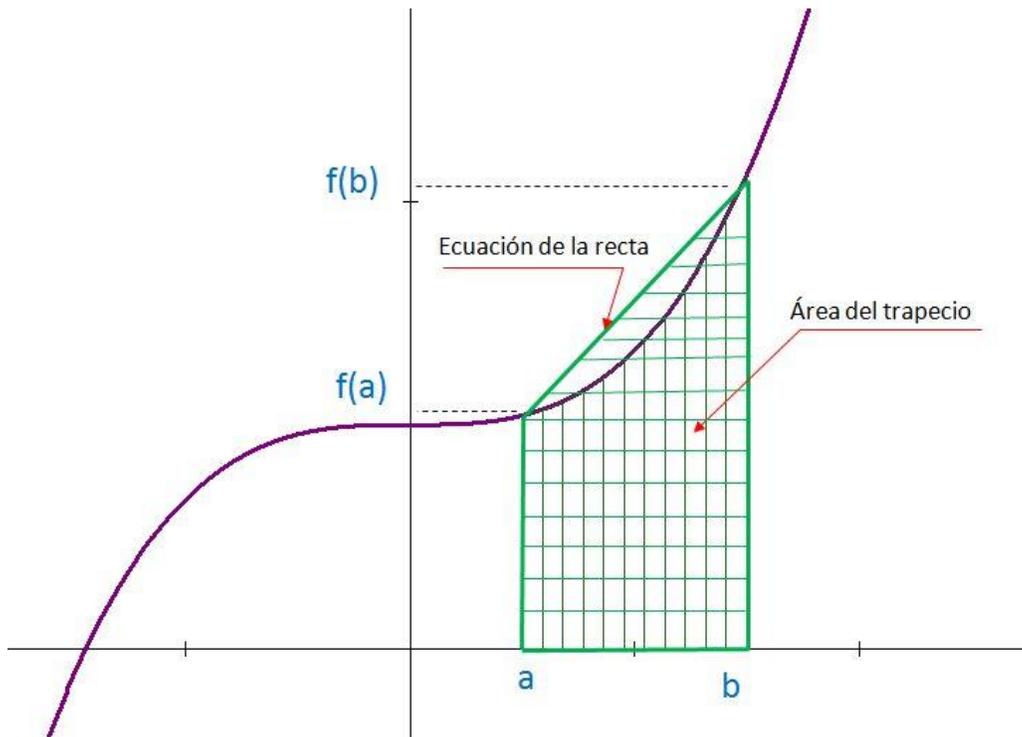


Figura 6: Descripción de una curva e interpretación gráfica del método para el cálculo del área bajo ésta.

Finaliza cita textual, (UNED, 2017).

b) Método de Simpson:

Inicia cita textual

El Método de Simpson sustituye a la curva por una serie de arcos contiguos, cada uno de estos arcos es un arco de parábola de eje vertical. Esto nos lleva a aproximar el área bajo la curva mediante la suma de las áreas bajo cada arco de parábola. El procedimiento es similar al de los Trapecios, con la siguiente condición:

- El número de subintervalos debe ser un número par.

Esta condición surge del hecho que para definir la ecuación de una parábola se necesitan tres puntos, a continuación se presenta un ejemplo, ilustrado.

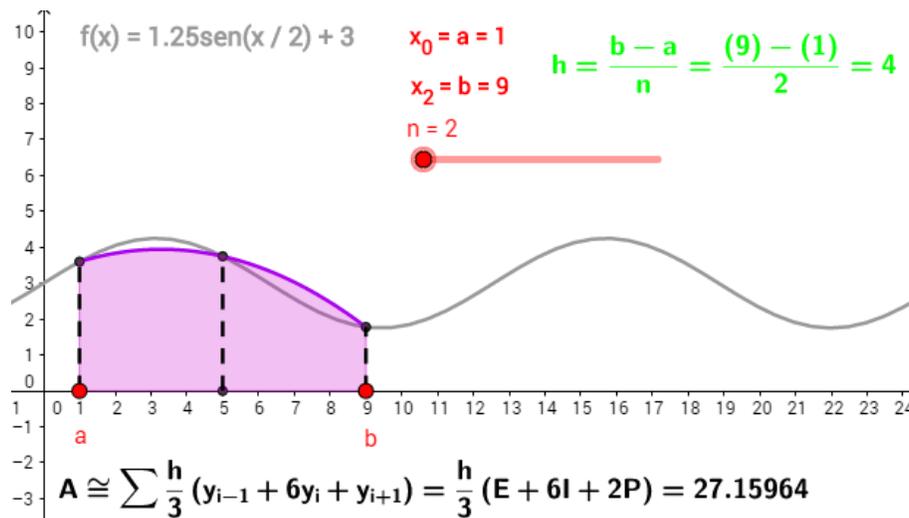


Figura 7: Ejemplo del cálculo del área bajo la curva a través del método de Simpson.

Finaliza cita textual, (GeoGebra, 2017)

Además de lo anterior, como parte del procedimiento cualitativo, se describieron organolépticamente las colonias de ambos hongos en crecimiento *in vitro*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de *Trichoderma* y *Fusarium*

a. Muestreo, descripción de los sitios

Las muestras fueron acompañadas de información para contextualizar su obtención, se resume a continuación:

Cuadro 2 Geo referenciación de los sitios de muestreo.

Localidad	Cultivo	Latitud	Longitud	Altitud (m)
Agua caliente	Café	N 14° 43' 38.5"	O 90° 18' 19.9"	122
Agua caliente	Maíz	N 14° 44' 53.9"	O 90° 19' 58.9"	846
Sanarate	Pepino	N 14° 47' 35"	O 90° 12' 22.3"	867
San Antonio*	Tomate	N 14° 43' 1.7"	O 90° 16' 38.4"	1120
San Antonio	Pimiento	N 14° 46' 4.3"	O 90° 17' 44.2"	1125
San Antonio	Frijol	N 14° 46' 4.3"	O 90° 17' 44.2"	1125

* Único sitio con aislamiento positivo.

Cuadro 3 Descripción de los sitios de muestreo.

Localidad	Cultivo	Edad de la plantación	Cobertura	Sistema de cultivo	Características del suelo
Agua caliente	Café	3 años	Café con bosque de pino	Extensivo abonado limpio	Poco profundo, perfil blanco
Agua caliente	Maíz	30 días	Maíz: diversas especies huerto familiar	Extensivo	Arenoso
Sanarate	Pepino	25 Días	Cultivo limpio	Intensivo	Arenoso, piedra
San Antonio*	Tomate	120 Días	Valle, árboles dispersos	Intensivo	Fértil
San Antonio	Pimiento	150 Días	Cultivo limpio	Intensivo	Arcilloso, piedra
San Antonio	Frijol	21 Días	Cultivo limpio	Extensivo	Piedra

* Único sitio con aislamiento positivo.

Puede notarse rápidamente que de los cultivos seleccionados el tomate es uno de los más susceptibles a *Fusarium*, lo que hace lógico su aislamiento en éste. Puede notarse a la vez que fue el único sitio en el que se reporta fertilidad observable (suelos oscuros, presencia de detritus superficial), condición que favorece la diversidad y presencia de *Trichoderma*. Otro factor de selección probable podría ser la altitud, en el marco del

muestreo, corresponde a la zona más alta muestreada. Sitios bajos en la región reportan períodos prolongados de sequía y de calor.

b. Aislamientos

Cepas de *Fusarium* y *Trichoderma* aisladas en sitios de interés del departamento de Guatemala.

Cuadro 4 Colonias obtenidas en primer aislamiento por localidad y hongo.

No. De muestra	Cultivo	Punto de muestreo (localidad)	Fecha	Colonias obtenidas en primer aislamiento	
				<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>
1	Café	Agua Caliente	16/07/2016	-	-
2	Maíz	Agua Caliente	16/07/2016	-	-
3	Tomate	San Antonio	16/07/2016	1	3
4	Chile pimiento	San Antonio	16/07/2016	-	-
5	Frijol	San Antonio	16/07/2016	-	-
6	Pepino	Sanarate	16/07/2016	-	-

Habiendo obtenido las muestras de suelo y planta en los cultivos deseados y los lugares especificados se procedió a realizar el procedimiento para la obtención de las cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* habiendo hecho el procedimiento en laboratorio en el se encontró únicamente para el cultivo de tomate obtenido en el municipio de San Antonio del departamento de El Progreso. Para el resto de cultivos muestreados únicamente se encontró bacteria. Hay varios factores que pudieron intervenir con la búsqueda de estos hongos cosmopolitas en el suelo y planta los cuales pueden ser el uso de agroquímicos, clima, humedad, temperatura y el manejo que el agricultor.

En todos los casos los aislamientos se trabajaron en triplicado y se requirió del fraccionamiento de 1/100 para poder recuperar ambos hongos. Se realizaron cultivos de igual manera en triplicado en recipientes especiales para su conservación, fueron entregados en el Laboratorio de la FCAA, Campus Central.

6.2. Caracterización de las procedencias encontradas

a. *Trichoderma*

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* fueron al inicio de color blanco, que se fue tornando a verde oscuro, con esporulación densa. El micelio en su mayoría y visto en microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se observan que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal.

Se observaron estructuras del tipo de conidias hialinas unicelulares, ovoide en conidióforo hialino largo no verticilados, mediante lo que se pudo observar en el laboratorio de la facultad de agronomía mediante el microscopio.

Las colonias se separaron por su coloración, aunque todas fueron de color verde solo el tono fué lo que cambio, unas tenían el color verde más fuerte y definido mientras otras fueron de un color verde más apagado o pálido.

b. *Fusarium*

Para *Fusarium* solamente se encontró un tipo de colonia por lo que se consideró una sola cepa. La colonia fue algodonosas de color blanco, con diversa pigmentación rosado. Microscópicamente en los laboratorios de la facultad de agronomía se logró observar que posee células conidiógenas tipo fiálides, cortas formadas en la hifa aérea. Poseen 2 tipos de conidia: macroconidias y microconidias.

Macroconidias: Con tres o más septos en su mayoría, abundantes.

Microconidias: Fueron abundantes.

c. Caracterización del crecimiento

A continuación se presenta un análisis de los datos obtenidos de crecimiento, como parte de la descripción de los microorganismos encontrados.

La variable presentada es radio de crecimiento en centímetros, en primer lugar para *Trichoderma*.

Cuadro 5 Radio de crecimiento (cm) de *Trichoderma*.

Día	n	Media	D.E.	E.E.	Min	Máx
1	15.00	0.17	0.06	0.02	0.10	0.30
2	15.00	0.28	0.06	0.01	0.20	0.40
3	15.00	0.54	0.06	0.02	0.40	0.60
4	15.00	1.19	0.18	0.05	0.90	0.50
5	15.00	1.44	0.15	0.04	1.30	1.70
6	15.00	2.95	0.47	0.09	2.20	3.70
7	15.00	3.51	0.27	0.07	3.10	3.70
8	15.00	3.65	0.09	0.02	3.50	3.70
9	15.00	3.70	0.00	0.00	3.70	3.70

Puede notarse que desde el sexto día se alcanzó el crecimiento máximo posible en el día 6, en general, los datos presentan un crecimiento considerablemente rápido. En términos absolutos se aprecia un efecto de saturación dado que el crecimiento se dio confinado en una caja de Petri. Se aportan más elementos para describir el comportamiento de los hongos encontrados a continuación.

Con el objeto de analizar la tendencia del crecimiento, se presenta la siguiente curva.

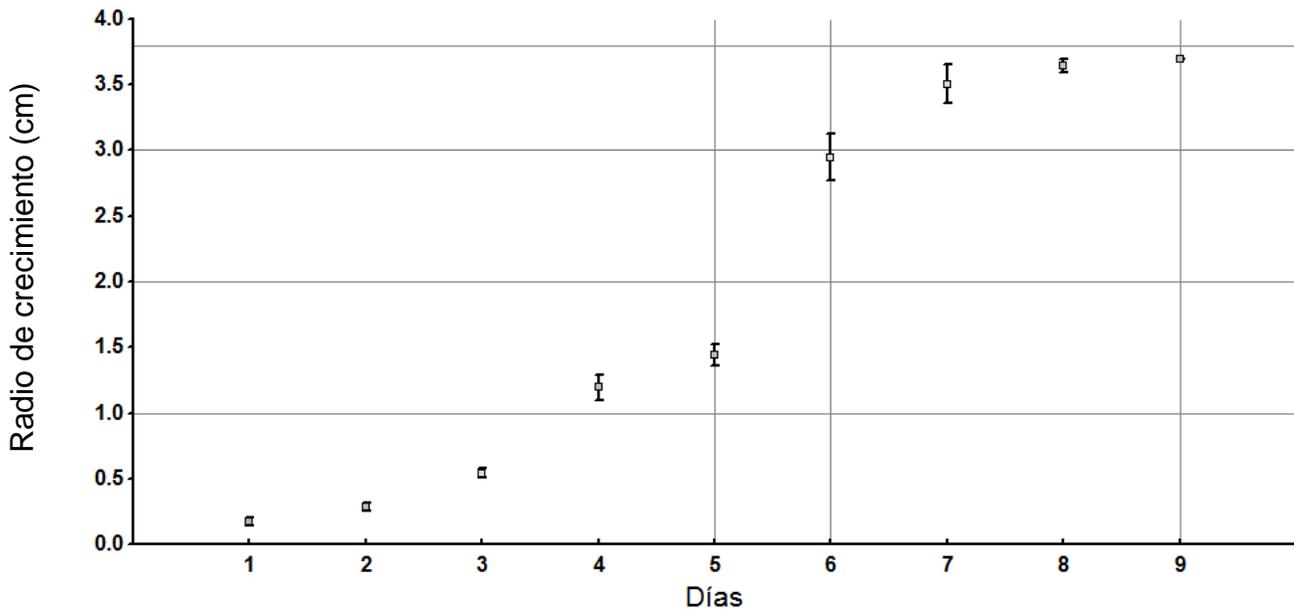


Figura 8: Crecimiento de *Trichoderma in vitro*.

Puede notarse un comportamiento sigmoide del crecimiento de *Trichoderma*, in vitro, nótese que el mayor salto de crecimiento se dá entre el día 5 y 6, luego, se da el efecto de saturación hasta prácticamente dejar de crecer (en radio) al día 8, cuando se cubre toda la superficie del medio de cultivo expuesto en la caja de Petri.

A continuación se presentan los datos de crecimiento de la procedencia de *Fusarium* encontrada en la prospección.

Cuadro 6 Radio de crecimiento (cm) de *Fusarium*.

Día	n	Media	D.E.	E.E.	Min	Máx
1	15	0.49	0.26	0.07	0.10	0.90
2	15	1.60	0.26	0.07	1.00	2.00
3	15	2.47	0.21	0.05	1.90	2.80
4	15	3.53	0.32	0.08	3.00	3.90
5	15	4.20	0.00	0.00	4.20	4.20

Puede inferirse de lo presentado un crecimiento relativamente rápido, además, constante del patógeno, el comportamiento del crecimiento en función del tiempo se presenta a continuación.

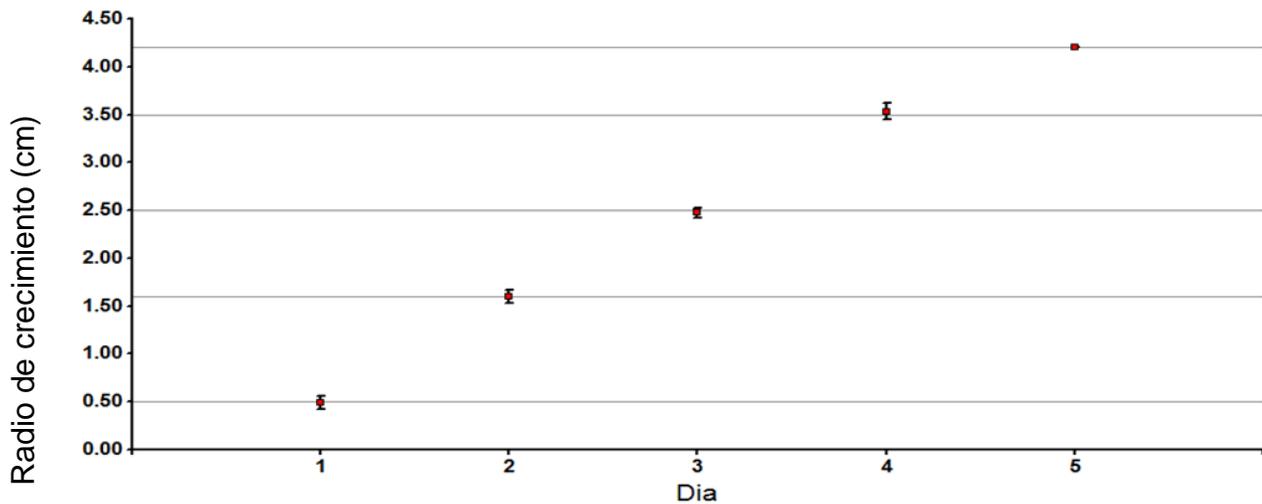


Figura 9: Crecimiento de *Fusarium in vitro*.

Nótese como desde el día 1 el crecimiento de *Fusarium* mantiene su crecimiento constante y rápido.

Integrando lo presentado en el análisis de crecimiento de ambos hongos, puede notarse que a *Trichoderma* le toma más tiempo que a *Fusarium* iniciar su crecimiento, para llegar a un radio de un centímetro, le toma alrededor de 4 días a *Trichoderma*, mientras que *Fusarium* lo alcanza sólo en dos días.

A pesar de proceder de ambientes idénticos, las diferencias biológicas de los organismos son notables, dada la intención de analizar el potencial de *Trichoderma* para el control de *Fusarium*, puede partirse de saber que tendrán tasas de crecimiento muy diferentes, y que lo más probable será que *Fusarium* tenga un comportamiento más agresivo.

Esto no limita en cuanto a la interpretación biológica el potencial que *Trichoderma* pueda tener puesto que pueden desarrollarse diversos abordajes para manejar éstas condicionantes naturales, puede incrementarse e inundarse los campos con el antagonista o realizar las aplicaciones con antelación para que tenga suficiente tiempo para colonizar el suelo, llenarlo de metabolitos inhibidores de *Fusarium* o en general, para desarrollar cualesquiera de sus mecanismos hiperparasitoides y antagonistas y

favorecer así su desempeño. A pesar de ser incipiente la información, cabe resaltarse que el comportamiento de los patógenos *in vitro* aunque difiera de lo presentado *in vivo*, pueden emplearse como un marco referencial.

Dado lo anterior, se presenta un análisis de las áreas bajo la curva para el tiempo de saturación de *Fusarium* (más corto) que permite comparación. Se estimaron los valores absolutos de acuerdo a dos metodologías como se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 7: Área bajo la curva de radio de crecimiento (cm) para *Trichoderma* y *Fusarium*.

Organismo/Método	Trapezio	Simpson
<i>Trichoderma</i>	5.2612	6.1816
<i>Fusarium</i>	4.3512	3.8355

Nótese que ambos métodos concurren para presentar valores más elevados para *Trichoderma*, aunque visualmente no se encuentran diferencias mayores y aparentemente las tasas de crecimiento se podrían apreciar como más intensas para *Fusarium*, éste indicador, integral, refleja un crecimiento más acelerado para *Trichoderma* en términos absolutos para los primeros 6 días de observación.

Lo anterior se considera deseable en la prospección de agentes de control biológico.

7. CONCLUSIONES

Se realizaron 3 aislamientos de *Trichoderma* y uno de *Fusarium* de muestras obtenidas en San Antonio, El Progreso, mismos que se dejaron a disposición de la FCAA, en el laboratorio.

Se encontró que los aislamientos obtenidos de *Trichoderma* pueden diferenciarse únicamente por la coloración de sus colonias, sus características morfológicas son típicas del género, de igual manera su esporulación, abundante.

En cuanto a *Fusarium*, se encontró que el aislamiento obtenido presentó abundante esporulación, las macroconidias con tres septos ó más y fiálides típicamente cortas.

8. RECOMENDACIONES

Determinar las especies de *Trichoderma* y *Fusarium* encontradas y entregadas al laboratorio de la FCAA a través de técnicas moleculares.

Analizar el potencial de la procedencia de *Trichoderma* encontrada en San Antonio, El Progreso como agente de control biológico, se sugiere hacer ensayos en series de tiempo, en sitios con alta incidencia de *Fusarium*, a nivel de campo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (1998). *Fitopatología 2ed.* Mexico: Noriega Editores.

Alicante, U. (s.f.). *Control biológico de plagas y enfermedades vegetales.* España: Universidad de Alicante.

Apablaza Hidalgo, G. (2002). *Patología de cultivos epidemiología y control holístico.*

Arbeláez Torres, G. (s.f.). *Algunos aspectos de los hongos del genero fusarium y de la especie fusarium oxysporum .* Recuperado el 12 de febrero de 2016, de Algunos aspectos de los hongos del genero fusarium y de la especie fusarium oxysporum: <http://www.bdigital.unal.edu.co/24385/1/21538-73639-1-PB.pdf>

B. Martínez, Danay Infante, Yusimy Reyes. (08 de Febrero de 2016). *SciELO Cuba.* Obtenido de SciELO Cuba: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001

Barnett, H., & Hunter, B. (1999). *Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition.* United States: APS Press.

Bello, M. (2011). Aspectos generales del hongo fusarium y existencia genetica a pudricion de raiz en frijol. *Vegetable and forage crop productions.*, 24.

BIOTECNOLOGÍA., I. A. (04 de Abril de 2017). *www.oriusbiotecnologia.com.* Obtenido de http://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible.

Bissett, J. 1. (1992). *Trichoderma atroviride.* Canadian Journal of Botany.

Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (. (7 de Marzo de 2016). *Guia practica 4: Fusarium oxysporum (en linea).* Obtenido de http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/04/guia_practica4.pdf#page=1

Center, N. B. (04 de Abril de 2017). *Catalogue of life*. Obtenido de <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/7fe211bfa76059f0df4e7ff2a69017bd>

Charles S. Simmons, José Manuel Tárano T., José Humberto Pinto Z. (1959). *Clasificación de reconocimiento de suelos de la república de Guatemala*. Guatemala: Jose de Pineda Ibarra.

Chavez Garcia, M. (2006). *Producción de Trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

De Leon, A. L. (1995). *Determinación de las razas de Fusarium oxysporum f. sp. pisi, agente causal de marchitez en arveja china (Pisum sativum) en los departamentos de sacatepequez y chimaltenango*. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.

De Vicente, A. (s.f.). *Universidad de Málaga*. Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de Universidad de Málaga: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros100/patogenos.htm>

Diaz. (1994). *Algunos aspectos biológicos de Trichoderma y su posible uso como biocontrol*. La Habana, Cuba.: Trabajo de diploma en opción al título de ingeniero agrónomo Universidad Agraria de la Habana.

Druan Ramírez, F. (s.f.). *Control biológico de plagas*. Colombia: Grupo latino Editores.

GeoGebra. (22 de 03 de 2017). <https://www.geogebra.org>. Obtenido de <https://www.geogebra.org/m/tWqP2wQs>

Gobierno de Guatemala. (S.F.). *Documento de posición de país, Cambio Climático*. Guatemala.

Haram, S., Schickler H, Oppenheim A, & Chet, I. (1996). *Differential expression of trichoderma harziaianum chitinases during mycoparasitism*. Phytopathol.

- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of trichoderma spp. *Phytopathology*, 190-194.
- Herrera, I. B. (10 de Enero de 2016). Cultivos de importancia en el departamento de El Progreso. (H. H. Cáceres, Entrevistador)
- Hjeljord L, Tronsmo A. (1998). *Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview. In: Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor & Francis.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 4-10.
- Infante, D., Martínez, B., Gonzales, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección vegetal.*, 24.
- John Bissett, Gams Walter, Walter Jaklitsch, y Gary J. Samuels. . (2015). *International subcommission on trichoderma taxonomy*. Comisión internacional para la taxonomía de hongos.
- Leslie J F, Summerell B A. . (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ed. 2006. Wiley-Blackwell.
- Levin, L., Ridao, A., & Castaño, F. (2003). *Fusariosis de la espiga en el maíz*. Mar del plata, Argentina.: INTA.
- Luna, H. (2012). *Densidad poblacional de los hongos micorrizicos arbusculares en suelos agrícolas aplicados con composta*. Tlaxcala, Mexico.: Tesis Doc. .
- MAGA. (S.F.). *Estadísticas agrícolas por departamento*. Guatemala.
- Martínez, B. I. (2013). trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de protección vegetal*, 20.

- Maselli, S. (2013). Recursos fitogenéticos: elementos clave para el desarrollo y la seguridad alimentaria. *Revista de la Universidad Del Valle De Guatemala*, 56-59.
- Mendéz , P. L., & Powel, N. T. (1985). *Histological and physiological influences of root-knot nematode infections on Fusarium wilt development in flue-cured tobacco*, Master's Thesis. North Carolina State University, Raleigh. N.: Department of Plant Pathology.
- Montoya, D. M. (07 de 05 de 2014). LA NECESIDAD DE UNA AGRICULTURA DIFERENTE. *Agricultura Organica*. Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Mora, J. R. (2001). *Control biológico de la pudricion radicular por Fusarium oxysporum en semilleros de café usando endomicorriza y Trichoderma harzianum* . Honduras: Zamorano.
- MSc, I. A. (18 de Abril de 2016). /www.pv.fagro.edu.uy. Obtenido de http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html
- N., L. (2001). *Prospeccion de hongos antagonistas en la provincia de cienfuegos efectividad y posibilidades de reproduccion de las cepas nativas de trichoderma spp*. La habana: Universidad Agraria de la Habana.
- N., P. (2004). *Manejo Ecológico de plagas*. La Habana. Cuba.: CEDAR.
- Perez Rivera, N. (2014). *Evaluacion de diferentes tratamientos quimicos y biologicos para el control preventivo de Fusarium spp. en el cultivo de arveja, diagnostico y servicios en las fincas y planta de empaque, sumpango, sacatepequez, Guatemala*. . Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.
- Piontelli, E. (2011). *Manual de Microhongos filamentosos comunes*.
- Ramirez, G., Luna, M., Mejía, C., Velázquez, M., Tsuzuki, R., & Vierna, G. M. (1992). *Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de Microbiología experimental*. Mexico: Facultad de Química, UNAM.

- Rosenblum, E. B. (2006). *Convergent Evolution and Divergent Selection: Lizards at the White Sands Ecotone*. California, USA: Museum of Vertebrate Zoology, University of California.
- Rubio, v. F. (s.f.). *Control Biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Madrid: Centro de ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC).
- Santema, B. (2015). *Control biológico de Fusarium spp. en Berenjena utilizando Trichoderma Harzianum y Bacillus subtilis; Ocòs, San Marcos*. Guatemala: Universidad Rafael Landivar.
- Satema, B. (2015). *Control biologico de Fusarium spp. en berenjena utilizando Trichoderma harzianum y Bacillus subtilis; Ocòs, San Marcos*. Guatemala: Universidad Rafael Landivar.
- Secretariat, O. (2015). *Protocolo de Montreal*. Recuperado el 16 de febrero de 2016, de Protocolo de Montreal: <http://ozone.unep.org/es/manual-del-protocolo-de-montreal-relativo-las-sustancias-que-agotan-la-cap-a-de-ozono/2>
- Skaracis, G. N., Vakaloinakis, D. J., & Wang, Z. (2008). *Characterization of fusarium oxysporum isolates obtained from cucumber in china*. California: VGG and RAPD Plants Dis.
- Stavro Tirado, Xiomara Ibeth. (2013). *Produccion mas limpia*. Colombia.
- Tapia, C., & Amaro, J. (31 de enero de 2014). *Retrato microbiológico*. Recuperado el 26 de enero de 2015, de Retrato microbiológico: www.sochinf.cl
- UNED. (22 de 03 de 2017). http://repositorio.uned.ac.cr/multimedias/metodos_numericos_ensenanza/modulo_4/descripcion.html. Obtenido de http://repositorio.uned.ac.cr/multimedias/metodos_numericos_ensenanza/modulo_4/descripcion.html
- Vergara, H. (2009). *Evolución*. Santa fe, Argentina.: El Cid Editor.

Villegas. (02 de Febrero de 2016). *www.oriusbiotecnologia.com*. Obtenido de <http://oriusbiotecnologia.com/site/index/.php?id=20,66,0,0,1>

