

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 DE GUATEMALA
TESIS DE GRADO

JUAN MANUEL PACHECO CALDERÓN
CARNET 11422-12

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, MAYO 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 DE GUATEMALA
TESIS DE GRADO

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

POR
JUAN MANUEL PACHECO CALDERÓN

PREVIO A CONFERÍRSELE

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

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, MAYO DE 2017
CAMPUS CENTRAL

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

RECTOR: P. MARCO TULIO MARTINEZ SALAZAR, S. J.
VICERRECTORA ACADÉMICA: DRA. MARTA LUCRECIA MÉNDEZ GONZÁLEZ DE PENEDO
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y PROYECCIÓN: ING. JOSÉ JUVENTINO GÁLVEZ RUANO
VICERRECTOR DE INTEGRACIÓN UNIVERSITARIA: P. JULIO ENRIQUE MOREIRA CHAVARRÍA, 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. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. ALVIN ROLANDO OVALLE LYNCH

MGTR. JOSÉ MANUEL BENAVENTE MEJÍA

MGTR. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

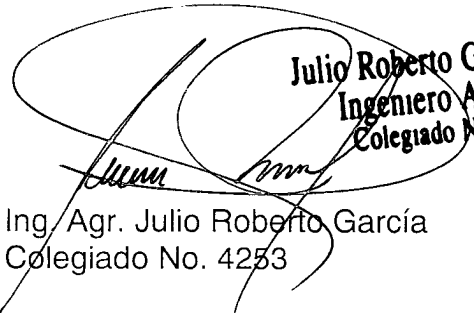
Guatemala, 04 de abril de 2017.

Honorable Consejo de
La Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Presente.

Distinguidos Miembros del Consejo:

Por este medio hago constar que he procedido a revisar el Informe Final de Tesis del estudiante **Juan Manuel Pacheco Calderón**, que se identifica con carné **1142212**, titulado: "**Prospección de *Trichoderma* y *Fusarium* en el departamento de Guatemala**", el cual considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad para ser aprobado, por lo que solicito sea revisado por la terna que designe el Honorable Consejo de la Facultad, previo a su autorización de impresión.

Atentamente,



Julio Roberto Garcia Morán
Ingeniero Agrónomo
Colegiado No. 4253

Ing. Agr. Julio Roberto García
Colegiado No. 4253



Universidad
Rafael Landívar
Tradición Jesuita en Guatemala

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
No. 06709-2017

Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante JUAN MANUEL PACHECO CALDERÓN, Carnet 11422-12 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA, del Campus Central, que consta en el Acta No. 0658-2017 de fecha 26 de abril de 2017, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

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

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 19 días del mes de mayo del año 2017.



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

AGRADECIMIENTOS

A:

M.A. Julio Roberto García Moran por su valioso tiempo y asesoría de la presente tesis.

M.A. Luis Moisés Peñate Munguía por la orientación y conocimiento brindado para la realización de esta tesis.

La Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, por prestarme las instalaciones de laboratorio y por los insumos brindados para la realización del proyecto.

DEDICATORIA

A:

Dios: por brindarme la inteligencia, salud y fuerza para concluir esta etapa de mi vida.

Mis padres: por darme un buen ejemplo siempre de trabajo duro y confianza en Dios, y ser mi más grande inspiración.

Mis hermanos: por su amor, amistad y apoyo incondicional.

Mis tíos: por ser como otros padres para mí.

Mis abuelos: por su paciencia y amor desinteresado.

Mis amigos: por acompañarme durante todo este proceso.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 2.1 PROSPECCION DE HONGOS NATIVOS DE GUATEMALA | 3 |
| 2.2 EVOLUCION DIVERGENTE | 3 |
| 2.3 DEPARTAMENTO DE GUATEMALA..... | 3 |
| 2.3.1 Fisiografía..... | 4 |
| 2.3.2 Clima | 6 |
| 2.3.3 Suelos..... | 7 |
| 2.3.4 Agricultura | 8 |
| 2.3.5 Susceptibilidad de principales cultivos del departamento de Guatemala a <i>Fusarium</i> | 9 |
| 2.3.6 Desarrollo de la enfermedad..... | 10 |
| 2.3.7 Manejo de la enfermedad | 12 |
| 2.4 PROTOCOLO DE MONTREAL..... | 13 |
| 2.5 CONTROL BIOLÓGICO..... | 14 |
| 2.6 <i>Trichoderma</i> | 15 |
| 2.6.1 Mecanismos de antagonismo | 15 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO | 18 |
| 4. OBJETIVOS..... | 20 |
| 4.1 Objetivo general | 20 |
| 4.2 Objetivos específicos | 20 |
| 5. METODOLOGIA | 21 |
| 5.1 Ambiente | 21 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2 | Unidades de análisis | 21 |
| 5.3 | Tipo de investigación..... | 22 |
| 5.4 | Instrumento | 22 |
| 5.5 | Procedimiento | 22 |
| 5.5.1 | Fase de campo | 22 |
| 5.5.2 | Fase de laboratorio..... | 24 |
| a) | Aislamiento de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> | 24 |
| b) | Purificación | 26 |
| c) | Caracterización morfológica..... | 27 |
| d) | Elaboración del cepario..... | 27 |
| 5.6 | Análisis de la información..... | 27 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSION..... | 28 |
| 6.1 | Aislamientos obtenidos de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> | 28 |
| 6.2 | Purificación y separación de los aislamientos por tipo de colonia..... | 30 |
| 6.3 | Caracterización morfológica y descripción del sitio de muestreo de las cepas aisladas. | 31 |
| 7. | CONCLUSIONES | 40 |
| 8. | RECOMENDACIONES | 41 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 42 |
| 10. | ANEXO..... | 45 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: División fisiográfica departamento de Guatemala (Simmons et al, 1959). | 5 |
| Figura 2: Mapa de los suelos del departamento de Guatemala mostrando los tipos de suelos (Simmons et al, 1959). | 8 |
| Figura 3: Ciclo patológico de la marchitez del tomate ocasionada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i> (Agrios, 2011). | 11 |
| Figura 4: Aislamiento de hongo de tejido vegetal (Agrios, 2011) | 26 |
| Figura 5: Colonias de <i>Fusarium</i> aisladas del cultivo de tomate en Amatitlán. | 30 |
| Figura 6: Colonia de <i>Trichoderma</i> aislada del cultivo de tomate en Amatitlán. | 31 |
| Figura 7: Comparación de crecimiento micelial de cepas encontradas. | 38 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1: Precipitación pluvial acumulada mensual y anual (datos en milímetros) (INSIVUMEH, 2015)..... | 6 |
| Cuadro 2: Datos mensuales y anuales de temperatura promedio en grados Celsius (oC) (INSIVUMEH, 2015) | 6 |
| Cuadro 3: Susceptibilidad de cultivos a <i>Fusarium</i> | 9 |
| Cuadro 4: Cepas de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> aisladas en sitios de interés del departamento de Guatemala..... | 28 |
| Cuadro 5: Ficha técnica <i>Fusarium</i> cepa 1 | 31 |
| Cuadro 6: Ficha técnica <i>Fusarium</i> cepa 2 | 34 |
| Cuadro 7: Ficha técnica <i>Trichoderma</i> cepa 1 | 36 |
| Cuadro 8: Medidas estadísticas resumen de crecimiento micelial de cepas encontradas | 38 |
| Cuadro 9: Área bajo la curva del desarrollo micelial de cada cepa aislada..... | 39 |
| Cuadro 10: Prueba T para cepas encontradas | 45 |

PROSPECCIÓN DE *Trichoderma* Y *Fusarium* EN EL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA, GUATEMALA

RESUMEN

En Guatemala no se ha dado importancia a la prospección de especies de microorganismos que puedan existir de forma natural, ni su potencial como patógenos o como agentes de control biológico. *Fusarium* es uno de los hongos más importantes a nivel mundial, esta enfermedad afecta y ocasiona pérdidas considerables en diferentes especies. Para su control la principal herramienta utilizada es el uso de agroquímicos. La tendencia mundial es de reducir el uso de plaguicidas de alta toxicidad y utilizar alternativas con menor impacto ambiental, como el control biológico. Siendo Guatemala un país de gran diversidad de ecosistemas y climas es lógico pensar que en Guatemala existan cepas tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma* que se han adaptado al ser expuestos a distintos ambientes, como lo dicta la teoría de la evolución divergente. Cada cepa de *Trichoderma* tiene potencial de convertirse en una herramienta importante en el control biológico de *Fusarium*. Se aislaron dos cepas de *Fusarium* y una de *Trichoderma* asociadas al cultivo de tomate provenientes del municipio de Amatitlán, departamento de Guatemala y se caracterizaron morfológicamente. Se observó que el crecimiento micelial de *Trichoderma* en medio de cultivo sintético, es significativamente mayor al de *Fusarium*.

PROSPECTION OF *Trichoderma* AND *Fusarium* IN THE DEPARTMENT OF GUATEMALA, GUATEMALA

SUMMARY

In Guatemala, importance has not been given to the prospection of species of microorganisms that may exist naturally, or their potential as pathogens or as biological control agents. *Fusarium* is one of the most important fungi worldwide, this disease affects and causes considerable losses in different species. For its control the main tool used is the use of agrochemicals. The global trend is to reduce the use of pesticides of high toxicity and to use alternatives with less environmental impact, such as biological control. As Guatemala is a country with a great diversity of ecosystems and climates, it is logical to think that in Guatemala there are strains of both *Fusarium* and *Trichoderma* that have adapted when exposed to different environments, as dictated by the theory of divergent evolution. Each *Trichoderma* strain has the potential to become an important tool in the biological control of *Fusarium*. Two strains of *Fusarium* and one of *Trichoderma* associated to the tomato crop were isolated from the municipality of Amatitlán, department of Guatemala and were characterized morphologically. It was observed that the mycelial growth of *Trichoderma* in synthetic culture medium, is significantly higher than that of *Fusarium*.

1. INTRODUCCIÓN

Una prospección es una exploración de un terreno para descubrir la existencia de algún organismo o recurso. El objeto de la tesis planteada es abonar en la prospección de cepas de ambos hongos cosmopolita y contribuir al abordaje teórico de discusiones como la evolución divergente, aplicada en el manejo integrado de plagas, además de contribuir en la generación de un cepario de especies nativas de Guatemala de *Fusarium* y *Trichoderma*. Este cepario podría contener una especie de *Trichoderma* con capacidades enzimáticas para control de diversos hongos.

El manejo integrado de plagas en la actualidad depende principalmente del uso de agroquímicos para el control de patógenos, particularmente del suelo, entre los cuales *Fusarium* es uno de los más importantes, esta enfermedad afecta y ocasiona pérdidas considerables en especies ornamentales, ya sea flores de corte o plantas, hortalizas, como pimientos, tomates, cucurbitáceas como el pepino, melón y sandía, cultivos industriales como algodón, tabaco, agave, frutales como plátano, cítricos, deciduos y otros de importancia económica para Guatemala como el café y caña de azúcar.

El principal método de control utilizado es la desinfección de suelos. Uno de los principales químicos empleados para este propósito en la actualidad es el bromuro de metilo que, sin embargo, está restringido a nivel mundial y los países signatarios del protocolo de Montreal deberán extinguir su utilización en breve, esto y el hecho de su efecto poco prolongado en el tiempo, como el caso del melón en donde se puede llegar a utilizar de dos a tres veces al año. Esto permite ponderar lo que se conoce como riesgo fitosanitario, pues gran cantidad de cultivos que ocupan vastas áreas del país y componen la mayoría del ingreso por comercio agrícola son susceptibles al citado patógeno, además tenemos una baja capacidad de diagnóstico y respuesta institucional para abordar éste tipo de problemáticas (Marroquín, 2012).

Se han llevado a cabo un gran número de investigaciones en los últimos años en torno a la posibilidad de controlar biológicamente la marchitez de los tomates y de muchos otros cultivos ocasionada por *Fusarium*. Los resultados han sido alentadores al inocular previamente las plantas con *F. oxysporum*, que son inocuas para cada cultivo,

utilizando hongos antagónicos como *Trichoderma*. Aun cuando sean prometedores estos tratamientos, hasta ahora ninguno de esos métodos se utiliza para controlar eficientemente los marchitamientos vasculares por *Fusarium* (Agrios, 2011).

Por otra parte, *Trichoderma*, de acuerdo a diversos autores es y será un microorganismo cada vez más importante para el control de patógenos del suelo, entre ellos *Fusarium*, sus diversas especies y formas específicas.

Hay suficiente evidencia que soporta que *Trichoderma* ejerce antibiosis, hiper parasitismo y competencia sobre éstos (Ezziyani, Pérez, Ahmed, Requena y Candela, 2004).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PROSPECCION DE HONGOS NATIVOS DE GUATEMALA

Una prospección es una exploración de un terreno para descubrir la existencia de algún organismo o recurso. Siendo Guatemala un país de gran diversidad de ecosistemas y climas es lógico pensar que en Guatemala existan cepas tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma* que se han adaptado al ser expuestos a distintos ambientes, como lo dicta la teoría de la evolución divergente.

En Guatemala no se ha dado importancia a la prospección de especies de microorganismos que puedan existir de forma natural, ni su potencial como patógenos o como agentes de control biológico.

2.2 EVOLUCION DIVERGENTE

La evolución divergente está dada por los cambios evolutivos que experimentará cada uno de los grupos separados, por deriva génica, mutaciones y selección natural. Las diferencias genéticas que dan lugar a la divergencia evolutiva se deben a que los ambientes en los que se desenvuelve por separado cada uno de los grupos aislados, son diferentes. Cada grupo se adaptará así a su ambiente, de manera que se producirá una divergencia de formas, que acabará originando especies o bien razas, según la intensidad del fenómeno. Como indican Dettman, Sirjusingh, Kohn y Anderson (2007) en cuanto a la adaptación de la levadura. Este concepto aplica de igual forma para los distintos hongos que interactúan con las plantas, tanto patógenos como los que tienen potencial como controladores biológicos.

2.3 DEPARTAMENTO DE GUATEMALA

El departamento de Guatemala consta de 17 municipios, estos son:

- Guatemala.
- Santa Catarina Pinula.
- San José Pinula.
- San José del Golfo.
- Palencia.

- Chinautla.
- San Pedro Ayampuc.
- Mixco.
- San Pedro Sacatepéquez.
- San Juan Sacatepéquez.
- San Raymundo.
- Chuarrancho.
- Fraijanes.
- Amatitlán.
- Villa Nueva.
- Villa Canales.
- San Miguel Petapa.

2.3.1 Fisiografía

El departamento de Guatemala está localizado sobre la vertiente continental en la parte sur de la república. Sus límites son: al norte, el departamento de baja Verapaz; al este, los departamentos de El Progreso, Jalapa y Santa Rosa; y al sur, el departamento de Escuintla. La ciudad de Guatemala, la cabecera del departamento y a la vez capital de la república, queda aproximadamente a 265.5 kilómetros en línea recta al sureste de Puerto Barrios y a 91.5 kilómetros en línea recta al norte del Puerto de San José. Este departamento es de forma irregular y comprende 212,600 hectáreas de terreno, o el 1.95 por ciento del área total de la república. Casi todo se encuentra a elevaciones mayores de los 1,200 metros sobre el nivel del mar, pero la parte más baja, que es donde el río Motagua deja el departamento, queda a alrededor de 600 metros y la parte más alta en el volcán de agua, tiene más de 3,600 metros de altitud (Simmons, Tárano y Pinto, 1959).

Aproximadamente dos terceras partes del área desaguan en el mar caribe a traves del río Motagua, pero la parte sur desagua en el océano pacifico por el río Michatoya. Casi toda el área esa completamente seccionada y está caracterizada por pendientes escarpadas y por barrancos profundos y estrechos (Simmons *et al*, 1959).

En el departamento están representadas dos divisiones fisiográficas que son la Altiplanicie Central (I) y el Declive del Pacífico (II). La primera comprende más del 90 por ciento del área del mismo y solo la parte sur se extiende hacia el Declive del Pacífico. Hay una pequeña área en la parte este que podría incluirse en la división fisiográfica de las montañas volcánicas, esto se debe a que se encuentran algunos suelos representativos de las elevaciones más bajas de dicha división (Simmons *et al*, 1959).

La división fisiográfica de la Altiplanicie Central es una planicie fuertemente ondulada, formada mayormente por ceniza volcánica (Simmons *et al*, 1959).



Figura 1: División fisiográfica departamento de Guatemala (Simmons *et al*, 1959).

2.3.2 Clima

El clima del departamento de Guatemala, particularmente en lo que se refiere a lluvia, no es muy variable de uno a otro lugar. La lluvia y la temperatura varían algo con la elevación, pero estas variaciones son relativamente leves. El promedio de precipitación pluvial es de aproximadamente de 1.25 metros anuales en casi toda el área, pero es algo más elevado a mayores altitudes y más bajo en la parte noreste (Simmons *et al*, 1959).

Cuadro 1: Precipitación pluvial acumulada mensual y anual (datos en milímetros) (INSIVUMEH, 2015).

| Año | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY | JUN | JUL | AGO | SEP | OCT | NOV | DIC | ANUAL |
|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|
| 2002 | 0.0 | 6.6 | 0.0 | 12.7 | 76.4 | 208.4 | 163.7 | 109.3 | 242.9 | 108.6 | 83.6 | 0.2 | 1012.4 |
| 2003 | 0.9 | 14.4 | 20.3 | 36.8 | 159.9 | 303.1 | 186.8 | 109.4 | 374.2 | 42.1 | 18.6 | 2.0 | 1268.5 |
| 2004 | 0.2 | 0.5 | 23.9 | 5.2 | 24.3 | 314.5 | 197.2 | 97.6 | 228.2 | 165.9 | 2.9 | 0.2 | 1060.6 |
| 2005 | 2.0 | 0.0 | 6.7 | 2.6 | 141.9 | 211.8 | 415.1 | 278.3 | 180.2 | 128.7 | 23.0 | 2.5 | 1392.8 |
| 2006 | 11.3 | 0.4 | 6.3 | 32.6 | 153.5 | 449.8 | 192.6 | 94.3 | 211.7 | 216.9 | 39.2 | 9.1 | 1417.7 |
| 2007 | 1.4 | 0.0 | 0.9 | 31.2 | 84.8 | 206.7 | 549.6 | 333.0 | 287.0 | 114.4 | 2.1 | 1.5 | 1612.6 |
| 2008 | 3.3 | 11.9 | 3.4 | 22.4 | 169.6 | 460.3 | 410.6 | 187.3 | 354.8 | 67.4 | 0.0 | 0.0 | 1691.0 |
| 2009 | 0.0 | 4.0 | 0.0 | 17.3 | 161.0 | 189.6 | 94.4 | 141.5 | 90.2 | 81.2 | 130.5 | 29.5 | 939.2 |
| 2010 | 0.0 | 1.3 | 0.0 | 108.2 | 427.4 | 376.9 | 317.4 | 470.8 | 342.9 | 26.8 | 6.4 | 0.0 | 2078.1 |
| 2011 | 0.0 | 7.2 | 13.4 | 15.0 | 102.0 | 223.0 | 238.6 | 414.0 | 247.0 | 385.0 | 14.2 | 1.5 | 1660.9 |
| 2012 | 3.2 | 5.3 | 5.1 | 40.9 | 135.8 | 165.5 | 121.1 | 397.5 | 128.9 | 71.9 | 3.2 | 1.1 | 1079.5 |

Las temperaturas son moderadas y agradables. Las variaciones estacionales son leves y menores las variaciones promedio diarias. La parte más fría se encuentra en el este del departamento (Simmons *et al*, 1959).

Cuadro 2: Datos mensuales y anuales de temperatura promedio en grados Celsius (oC) (INSIVUMEH, 2015)

| Año | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY | JUN | JUL | AGO | SEP | OCT | NOV | DIC | ANUAL |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 2002 | 17.3 | 18.6 | 18.6 | 19.8 | 20.3 | 20.1 | 21.0 | 19.6 | 18.9 | 18.5 | 17.1 | 17.9 | 19.0 |
| 2003 | 16.8 | 17.8 | 24.8 | 20.6 | 20.7 | 19.1 | 20.3 | 20.0 | 19.7 | 20.2 | 19.2 | 17.5 | 19.7 |
| 2004 | 18.5 | 18.6 | 20.1 | 20.6 | 19.7 | 20.3 | 19.7 | 20.2 | 19.3 | 19.8 | 18.7 | 18.2 | 19.5 |
| 2005 | 17.7 | 19.3 | 20.9 | 20.9 | 23.0 | 22.2 | 21.8 | 21.1 | 21.2 | 19.7 | 18.2 | 18.4 | 20.4 |
| 2006 | 18.0 | 20.8 | 19.3 | 21.6 | 20.5 | 20.1 | 20.3 | 20.7 | 20.2 | 20.4 | 18.1 | 19.2 | 19.9 |
| 2007 | 19.4 | 19.2 | 19.1 | 20.5 | 21.1 | 20.5 | 20.8 | 20.2 | 20.1 | 18.9 | 18.7 | 19.2 | 19.8 |
| 2008 | 17.6 | 18.6 | 18.6 | 21.2 | 20.1 | 20.2 | 19.8 | 25.6 | 19.6 | 19.5 | 18.6 | 17.9 | 19.8 |
| 2009 | 19.0 | 19.0 | 19.0 | 21.5 | 21.5 | 20.8 | 21.2 | 21.0 | 20.7 | 20.5 | 18.9 | 19.4 | 20.2 |

| Año | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY | JUN | JUL | AGO | SEP | OCT | NOV | DIC | ANUAL |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 2011 | 19.0 | 19.6 | 19.5 | 20.9 | 20.8 | 20.6 | 20.5 | 20.4 | 19.9 | 19.3 | 19.5 | 18.5 | 19.9 |
| 2012 | 18.3 | 19.7 | 20.2 | 21.0 | 21.7 | 20.5 | 21.2 | 20.9 | 20.7 | 20.7 | 18.6 | 19.4 | 20.2 |

Los fenómenos atmosféricos extremos tales como los vientos fuertes, el granizo y las heladas son mínimos. Las tormentas locales de granizo ocurren ocasionalmente durante la época lluviosa y las heladas afectan solamente algunas áreas esporádicas ocasionalmente durante los meses de diciembre, enero y febrero (Simmons *et al*, 1959).

2.3.3 Suelos

Los suelos del departamento están divididos en tres clases amplias: I. Suelos de la altiplanicie central, II. Suelos del declive del pacifico y III. Clases misceláneas de terreno. El grupo I ha sido dividido en subgrupos según la profundidad del suelo, clase de material madre y la altitud en: A. Suelos profundos sobre materiales volcánicos, a gran altitud. B. Suelos profundos sobre materiales volcánicos, a mediana altitud. C. Suelos poco profundos sobre materiales volcánicos débilmente cementados. D. Suelos poco profundos sobre materiales volcánicos firmemente cementados. E. Suelos poco profundos sobre roca. Los suelos del grupo II han sido divididos en: A. Suelos profundos sobre materiales volcánicos de color oscuro. B. Suelos profundos sobre materiales volcánicos mixtos. C. Suelos poco profundos sobre materiales volcánicos de color oscuro (Simmons *et al*, 1959).

La sección de la altiplanicie central constituye más del 90 por ciento del área del departamento de Guatemala. Se caracteriza por pendientes escarpadas con pequeñas áreas de suelo casi planos o valles ondulados. Casi todos son poco profundos (Simmons *et al*, 1959).

2.3.5 Susceptibilidad de principales cultivos del departamento de Guatemala a *Fusarium*

Cuadro 3: Susceptibilidad de cultivos a *Fusarium*

| Cultivo | Nombre común | Daño causado | Patógeno (Forma específica) | Síntomas |
|----------------|------------------------|---------------------|--|--|
| Piña | Podredumbre de la piña | 30 – 90% de pérdida | <i>Fusarium guttiforme</i> (Nirenberg y O'Donnell, 1998) | Al podrirse los frutos sale una especie de goma (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, OIRSA, 2014). |
| Tomate | Marchitez del tomate | 10 – 60% de pérdida | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Lycopersici</i> (Almodóvar, 2005) | Epinastia foliar, raquitismo, amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de sus hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de sus hojas persistentes y, finalmente, su muerte (Agrios, 2011). |
| Chile pimiento | Marchitez del pimiento | 10 – 60% de pérdida | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Capsica</i> | Los síntomas se presentan primero en el follaje, el cual toma una coloración ligeramente amarilla y se marchitan las hojas superiores. |

| Cultivo | Nombre común | Daño causado | Patógeno (Forma específica) | Síntomas |
|---------|---|------------------------|--|--|
| Café | Tristeza del cafeto, clorosis típica, marchitez del café. | del 5 – 10% de pérdida | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. Coffeae (Campos, 1998) | Afecta más en almácigos. En planta adulta presenta flacidez en su sistema foliar, que luego se torna de color amarillo, dando la impresión de una deficiencia de magnesio, seguido por la caída de hojas (Campos, 1998). |

2.3.6 Desarrollo de la enfermedad

El patógeno es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectados que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en las regiones templadas frías. Se propaga a cortas distancias a través del agua y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias principalmente en los trasplantes infectados o en el suelo que va en ellos (Agrios, 2011).

La temperatura es uno de los factores ambientales que mayor influencia tienen en el desarrollo de la enfermedad y en la expresión de los síntomas, así como la nutrición de la planta (Baker, 1988). La temperatura óptima para el desarrollo del patógeno esta entre 25 y 30' C, con una temperatura mínima de 5°C y una temperatura máxima de 37°C; el punto termal de muerte en el suelo es de 57.5 a 60°C durante 30 minutos. La esporulación óptima ocurre entre 20 y 25°C, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El pH óptimo es de 7.7 y puede desarrollarse entre 2.2 y 9.0. (Fletcher y Martín, 1972). El hongo es aeróbico y sus poblaciones se reducen con la saturación del suelo (Garcés, Orozco, Bautista y Valencia, 2001).

El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilémicos, entra en ellos a través de las punteaduras. Se mantienen entonces exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, hacia el tallo y la corona de la planta. Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta en el torrente de savia. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidios en el siguiente vaso. (Agrios, 2011).

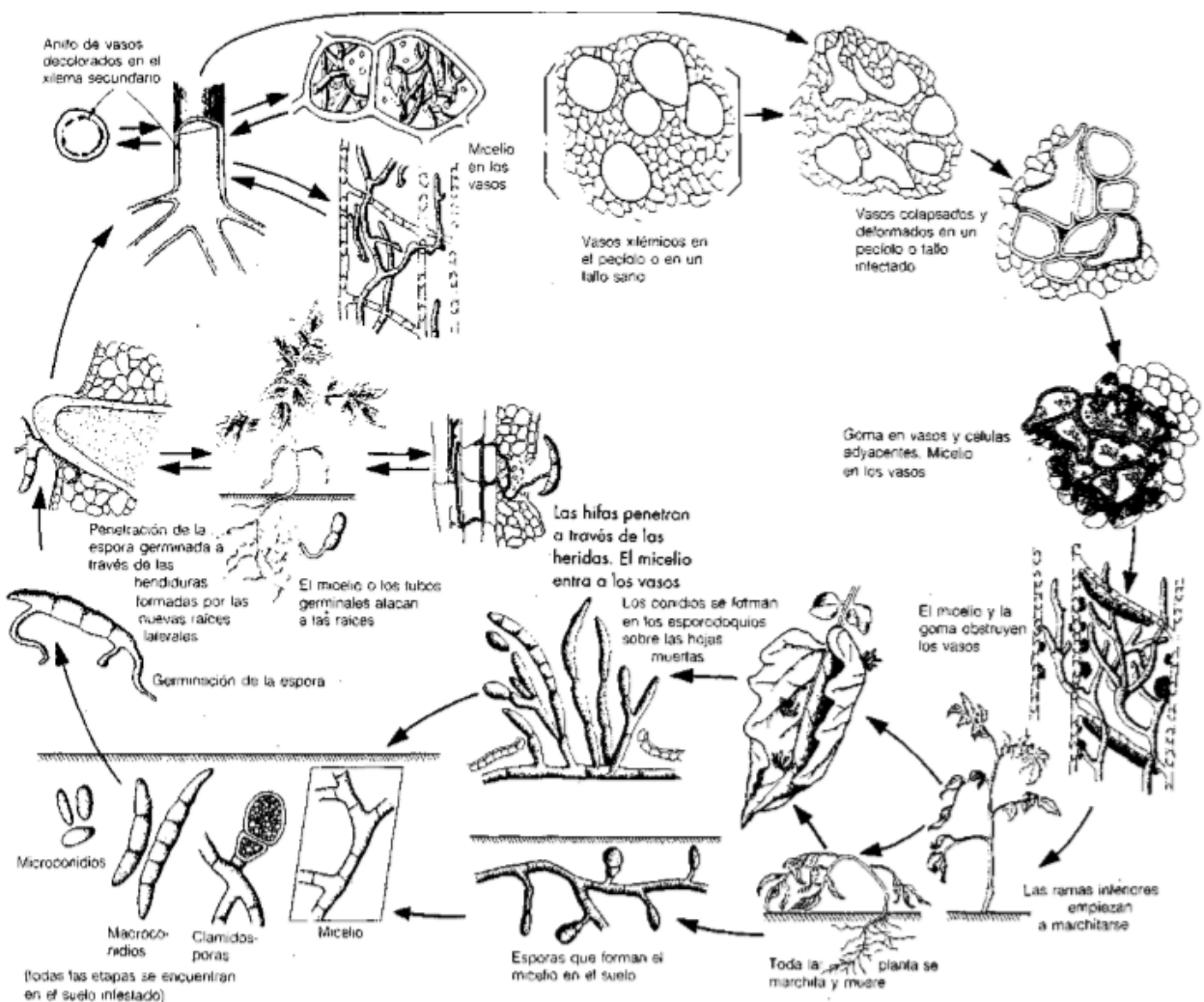


Figura 3: Ciclo patológico de la marchitez del tomate ocasionada por *Fusarium oxysporum f. lycopersici* (Agrios, 2011).

2.3.7 Manejo de la enfermedad

Luego que el hongo penetra al tejido vegetal, no existe control químico efectivo para esta enfermedad. El hongo puede penetrar fácilmente cuando se producen heridas ya sea por nematodos o por el laboreo. Por lo tanto, el suelo libre de nematodos, así como evitar la rotura de raíces al laborear el suelo contribuirá a mantener la sanidad del cultivo. Las plantas enfermas deben eliminarse lo más pronto posible a efectos de reducir el inóculo. Las rotaciones con cultivos no huéspedes como el caso de lechuga, acelga, entre otros son necesarias para el manejo adecuado de la enfermedad (Gonzales, 2006).

El control de las pudriciones que ocasiona *Fusarium* en raíces, tallos y cormos, se lleva a cabo, mediante la esterilización del suelo y el uso de órganos vegetativos sanos. Sin embargo, debido a que las esporas llevadas por el viento permiten que el hongo se establezca rápidamente en el suelo, puede ser necesario eliminar a dichas esporas en los invernaderos mediante fumigación, entonces es necesario tratar el suelo con fungicidas (Agris, 2011).

a. Desinfección de suelos

En los suelos agrícolas la desinfección del terreno va convirtiéndose en una práctica más de cultivo, dado que los resultados de su aplicación son, generalmente, satisfactorios. Los desinfectantes de suelo actúan todos por emisión de vapores y están dotados de propiedades polivalentes. La mayor parte tienen a la vez efecto fungicida, nematocida, herbicida e insecticida en mayor o menor grado (Sanz, 1973). Dentro de los más eficaces y ampliamente utilizados están los hidrocarburos halogenados.

- **Hidrocarburos halogenados:**

Los hidrocarburos halogenados incluyen al dicloropropeno-dicloropropano (D-D), al dibromuro de etileno (EDB), dibromocloropropano (DBCP) y bromuro de metilo (MB). Descubiertos en la década de 1940, se utilizaron ampliamente hasta la década de 1980. Sin embargo, recientemente debido a su gran toxicidad, a la contaminación de los productos vegetales y del agua del suelo y debido a que uno de ellos (DBCP) ha

causado esterilidad en las personas que manejan las plantas, el uso de la mayoría de ellos se ha prohibido por medio del Protocolo de Montreal. Se aplican al suelo inyectándolos por lo menos dos semanas antes de establecer el cultivo. Todos ellos matan a nematodos, insectos y, a dosis altas, la mayoría mata a los patógenos que habitan en el suelo, así como a las semillas de las malezas. El bromuro de metilo es un fumigante de amplio espectro, eficaz contra los patógenos que habitan en el suelo y que también se utiliza para el control, sobre la superficie del suelo, de las termitas de la madera seca y en la fumigación de los productos agrícolas. Los hidrocarburos halogenados actúan sobre los organismos, debido a que son liposolubles e interfieren con la función de las membranas y del sistema nervioso (Agrios, 2011).

2.4 PROTOCOLO DE MONTREAL

En Septiembre de 1987 en la ciudad de Montreal-Canadá, 24 países (actualmente 197), firmaron inicialmente el Protocolo de Montreal relativo a las Sustancias que Agotan la Capa de Ozono y entra en vigor en 1989 (documento de tan solo 8 páginas) sus repercusiones en la Comunidad Mundial fueron importantes porque se trataba de una iniciativa de la comunidad internacional de lanzar un llamado de alerta y necesidad urgente de integrar un frente común, bajo una lista inicial de 8 Sustancias Controladas: Cinco Refrigerantes CFC's y Tres Halones, estableciéndose límites de producción, límites de consumo y comercio con países que no son parte del Protocolo de Montreal. Guatemala aprueba el Protocolo de Montreal a través del Decreto 34-89 (MARN, 2016).

En un nuevo Memorando de Entendimiento firmado en el 2012 en la sede de la FAO en Roma, la CIPF y la Secretaría del Ozono del PNUMA se han comprometido a trabajar en estrecha colaboración para promover una mayor aplicación de las recomendaciones existentes relativas al bromuro de metilo (metilbromuro o MeBr, por sus siglas en inglés), así como para apoyar los esfuerzos para desarrollar tratamientos fitosanitarios alternativos para reemplazarlo, cuando ello sea posible (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, 2002).

Durante décadas, el bromuro de metilo ofrecía una potente herramienta en la lucha contra la propagación transfronteriza de plagas y enfermedades que podían suponer un perjuicio importante en la seguridad alimentaria, los medios de subsistencia de los agricultores y el comercio (FAO, 2002).

El MeBr es extremadamente perjudicial para la capa de ozono que protege la Tierra, y en 1991 se añadió a la lista de sustancias controladas en virtud del Protocolo de Montreal, un acuerdo internacional creado para eliminar gradualmente el uso de tecnologías dañinas para la capa de ozono. El Protocolo desaconseja el uso de bromuro de metilo para combatir plagas y enfermedades fuera del ámbito cuarentenario durante la producción, pero hace una excepción para su utilización como tratamiento cuarentenario fitosanitario, teniendo en cuenta su eficacia para prevenir plagas y enfermedades (FAO, 2002).

Cuando no existen o no son viables las alternativas al uso cuarentenario del bromuro de metilo, una recomendación de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) de la CIPF promueve las mejores prácticas de fumigación que pueden limitar las emisiones no deseadas del gas y pide abandonar el MeBr en todo lo posible a través del desarrollo de nuevos tratamientos alternativos. Para que esto ocurra, las autoridades de protección fitosanitaria necesitan información y acceso a tratamientos alternativos que sean asequibles, eficaces y adecuados a sus necesidades específicas (FAO, 2002).

El protocolo de Montreal es uno de los Convenios medioambientales de más éxito y que cuenta con la adhesión de la totalidad de países miembros de la Organización de Naciones Unidas. Habiendo logrado con el esfuerzo actual de 197 países signatarios, la eliminación del 98% de la producción y el consumo de Sustancias Agotadoras de la Capa de Ozono (SAO) de un grupo de interés de 96 sustancias; esto en países desarrollados y el 95 % en países en vías de desarrollo (MARN, 2016).

2.5 CONTROL BIOLÓGICO

Según Eilenberg *et al* (2001), citado por Jacas y Caballero (2007), el control biológico, lucha biológica o biocontrol, se consideran una de las técnicas preferibles a aplicar en el control de plagas, por sus innegables ventajas ambientales. Esta práctica consiste en el

uso de organismos vivos para disminuir la densidad de población o el impacto de un organismo patógeno y hacerlo menos abundante o menos perjudicial de lo que es.

Algunos hongos, entre ellos algunos oomycetes, chytrídiomycetes e hyphomycetes, y algunas bacterias *Pseudomonas* y actinomicetos, infectan a las esporas de resistencia de varios hongos. Entre los hongos micoparásitos más comunes destacan *Trichoderma* sp., principalmente *T. harzianum*, que se ha demostrado parásita el micelio de *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, inhibe el crecimiento de muchos otros hongos, como *Pythium*, *Fusarium* y *Fomes*, y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de esos patógenos. (Agris, 2011).

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa (Ezziyyani *et al*, 2004).

2.6 *Trichoderma*

Según Arango *et al* (1988) y Barnet & Hunter (1972), citados por Chavez (2006), los conidióforos de *Trichoderma* son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, no verticilados, los cuales pueden ser solitarios o en grupos. Las fialides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central, pero delgadas hacia el ápice; son hialinas y en angulo recto con respecto a los conidióforos. Las conidias son unicelulares subglobosas u oblongas, lisas o quinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fialides.

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Ezziyyani *et al*, 2004).

2.6.1 Mecanismos de antagonismo

a. Micoparasitismo

Según Chet y Elad (1983), citado por Ochoa (2002), el micoparasitismo es un proceso complejo que incluye diversos pasos sucesivos. La interacción inicial detectable muestra que las hifas del micoparásito crecen directamente hacia el hospedero. Este fenómeno se manifiesta, como un crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma*, para algunos estímulos en las hifas del hospedero o hacia un gradiente de excretas químicas por el hospedero.

Según Bélanger *et al* (1996), citado por Ochoa (2002), se ha observado que *T. harzianum* establece un contacto estrecho con el hospedero por enrollamiento de las hifas. El enrollamiento es generalmente muy denso y aparece envolviendo apretadamente las hifas del hongo patógeno. Después de un tiempo el antagonista se multiplica abundantemente y el enrollamiento persiste.

b. Competencia

Según Sivan y Chet (1989), citado por Ochoa (2002), la competencia por carbono y nitrógeno en la rizósfera, así como la competencia de rizósfera, se han sugerido para estar involucrados en el control biológico de *F. oxysporum* por *T. harzianum* cepa T-35, sin embargo, se hacen necesarios más estudios en este campo.

c. Antibiosis

Los metabolitos secundarios con actividad antifúngica que son secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos muy diversos en cuanto a su estructura y función. Estos metabolitos pueden inhibir a otros microorganismos aun sin que *Trichoderma* establezca contacto físico, es por esto que son considerados antibióticos.

Según Howell *et al* (2000), citado por Ochoa (2002), los antibióticos y otros metabolitos secundarios son productos naturales y pueden tener una multitud de funciones de supervivencia en la naturaleza, dentro de los metabolitos producidos por las especies de *Trichoderma* se encuentran, Pachibasin, la cual pertenece al grupo de los octacetidos; Trichodermin, la cual pertenece al grupo de Monoterpenos o Trichothecanos; Trichorzianinas, los cuales son los metabolitos antifungicos

mayormente solubles, las Thrichorzianinas localizadas sobre las esporas, pueden mantener su actividad fúngica por periodos prolongados (de 3 a 4 meses); Gliotoxin, la cual presenta una potente actividad antibiótica contra bacteria y hongos, entre otros.

Según Cooney *et al* (1997), citado por Ochoa (2002), el 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) es un policétido conocido por ser toxico a un gran número de patógenos de plantas; presenta un aroma característico a coco; ha mostrado ser promisorio tanto *in vitro* como *in vivo* en la mayoría de hongos patógenos, que afectan cultivos, como especies de *Armillaria*, *Botrytis* y *Phytophthora*; tiene ventaja de ser de baja toxicidad para los mamíferos; ha sido aprobado para uso en alimentos por la USFDA y está siendo evaluado actualmente como un fungicida natural. El 6PAP puede ser preparado sintéticamente en laboratorio o vía fermentación con especies de *Trichoderma*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

En el departamento de Guatemala se pueden distinguir cuatro cultivos como los más importantes de la región por su volumen de producción, estos son la piña, el chile pimiento, el tomate y el café (MAGA, 2014).

Todos estos cultivos pueden ser afectados por plagas y enfermedades entre ellas el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. En el chile pimiento y el tomate la fusariosis es una de las principales enfermedades que causan grandes pérdidas a los productores, ya que en estos cultivos se presentan síntomas de marchitez y muerte descendente en las plantas. En el cultivo de piña esta reportado como hospedero de *Fusarium*, sin embargo, no se reportan en Guatemala casos. En café la enfermedad no se presenta en plantas adultas, si no que el problema es más significativo a nivel de semillero.

El manejo de *Fusarium* durante mucho tiempo ha dependido del uso de agroquímicos de forma preventiva, ya que una vez la planta presenta síntomas es muy difícil curarla y esto causa el incremento en los costos de control. En algunos sistemas productivos también se utiliza la técnica de desinfección de suelos con productos químicos gasificantes, aunque no para el área muestreada. Para esta práctica uno de los principales químicos utilizado es el bromuro de metilo. Los desinfectantes de suelo son químicos altamente tóxicos para los seres vivos y altamente contaminante, ya que los gases que genera dañan permanentemente la capa de ozono. La tendencia mundial es de reducir el uso de plaguicidas de alta toxicidad y utilizar alternativas con menor impacto ambiental, como el control biológico.

Trichoderma es un hongo cosmopolita importante como controlador biológico según diversos autores, esto debido a sus distintos mecanismos de acción. Actualmente se reconocen tres principales: micoparasitismo, competencia y antibiosis (Ochoa, 2002).

Siendo Guatemala un país de gran diversidad de ecosistemas y climas es lógico pensar que en Guatemala existan cepas tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma* que se han adaptado al ser expuestos a distintos ambientes. Cada cepa de *Trichoderma* tiene potencial de convertirse en una herramienta importante en el control biológico de

Fusarium. Con esta investigación se generará información sobre la presencia de *Fusarium* y *Trichoderma* en el departamento de Guatemala.

Se pretende establecer bases para una investigación más amplia en cuanto a características moleculares de las cepas encontradas en Guatemala y su aplicación en control biológico y se contribuirá a la creación de un cepario de *Fusarium* y *Trichoderma* en Guatemala.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Realizar una prospección de cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* en el departamento de Guatemala para la conformación de un cepario.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Trichoderma* de suelo rizosférico obtenidas en el departamento de Guatemala.
- Aislar cepas de *Fusarium* de plantas sintomáticas obtenidas en el departamento de Guatemala.
- Caracterizar morfológicamente las cepas de *Fusarium* y *Trichoderma* encontradas en los sitios de interés.
- Medir la velocidad de crecimiento micelial como indicador de potencial de control biológico.

5. METODOLOGIA

5.1 Ambiente

El estudio se realizó en distintos municipios del departamento de Guatemala. Los cuales se seleccionaron con base a los principales cultivos que se producen en los distintos municipios del departamento de Guatemala, según SEGEPLAN, en el diagnóstico para planes de desarrollo departamentales.

Para el cultivo de la piña se muestreó el municipio de Villa Canales. Ya que es la única área en la cual se cultiva y de la cual se obtiene toda la producción antes mencionada, principalmente en la aldea El Jocotillo.

Para el cultivo de tomate se muestreó el municipio de Amatitlán, en el cual se cultiva un área de 116 hectáreas y se producen 2,976,409 kilogramos de tomate aproximadamente, lo cual corresponde a un 20% de la producción del departamento.

Para el cultivo del chile pimiento se muestreó el municipio de Palencia, ya que en este se menciona la producción de chile pimiento dentro de los cultivos importantes de la región.

Para el cultivo de café se muestreó el municipio de Fraijanes que es una de las seis regiones reconocidas por la asociación nacional del café (ANACAFE) por las características únicas de su café de altura, el cual es de alta calidad y la producción de esta región es significativa.

5.2 Unidades de análisis

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

Una vez concluido el aislamiento de los hongos, las unidades de análisis fueron las cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* hayan sido extraídas de las muestras, ya que estas se caracterizaron morfológicamente.

5.3 Tipo de investigación

Se realizó un estudio exploratorio con un enfoque mixto, cualitativo y cuantitativo, en la prospección de *Trichoderma* y *Fusarium* en el departamento de Guatemala.

5.4 Instrumento

Se utilizó una boleta de campo para la recolección de datos en la toma de muestras. La cual se muestra a continuación.

| Boleta de muestreo de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> | | | | | | | | |
|--|-------------|------------------|----------|--------------------------|---------|-----------|---------------------------|--------------------|
| Muestra No. ____ | | | | | | | | |
| Tomada por: _____ | | | | Fecha de muestreo: _____ | | | | |
| Ubicación de la muestra: _____ | | | | Cultivo: _____ | | | | |
| Datos del productor: _____ | | | | | | | | |
| Edad de la plantación | Temperatura | Humedad relativa | Longitud | Latitud | Altitud | Cobertura | Características del suelo | Sistema de cultivo |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Observaciones: | | | | | | | | |

5.5 Procedimiento

5.5.1 Fase de campo

a) Muestreo

Las muestras se colectaron al azar en los sitios de interés de cada cultivo. Éstos se definieron en función de los cultivos de mayor importancia económica por cada municipio, también luego de haber corroborado 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). Y para *Fusarium* planta sintomática.

Junto con la muestra se realizó un levantamiento de datos de las variables medioambientales del área. En cada sitio se tomaron 2 muestras, una de suelo y una de planta. Las muestras de suelo constaran de 5 sub muestras las cuales se mezclaron y homogenizaron para formar una muestra compuesta. La muestra se tomó de los primeros 20 cm de suelo eliminando la materia orgánica superficial.

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

El muestreo en el cultivo de café se llevó a cabo en una finca de 73 Hectáreas de terreno ubicada en el municipio de Fraijanes en las coordenadas N14°25'40.2" W90°26'31.1". Se tomaron 5 submuestras, una de una plantación de 1 año, dos de una plantación de 8 años, una de una plantación de 10 años y la última de una plantación de 12 años.

El muestro en el cultivo de piña se llevó a cabo en un área de más de 500 hectáreas de terreno ubicada en el municipio de Villa Canales, más específicamente la aldea El Jocotillo, en las coordenadas N14°21'58.2" W90°29'40". Se tomaron 5 submuestras, una de una plantación de 1 mes, dos de una plantación de 2 meses y dos de una plantación de 18 meses. La variedad cultivada es Cayena lisa.

El muestreo en el cultivo de chile pimiento se llevó a cabo en el municipio de Palencia, en las coordenadas N14°39'19.3" W90°22'8.5". Se tomaron 5 submuestras en dos parcelas diferentes.

El muestreo en el cultivo de tomate se llevó a cabo en un área de aproximadamente 20 hectáreas ubicada en el municipio de Amatitlán, en las coordenadas N14°26'25.4" W90°34'45".

5.5.2 Fase de laboratorio

a) Aislamiento de *Trichoderma* y *Fusarium*

El aislamiento se llevó a cabo en los laboratorios de la facultad de ciencias ambientales y agrícolas de la Universidad Rafael Landívar de Guatemala. El método de aislamiento fue el de dilución en placa para *Trichoderma* y para *Fusarium* aislamiento de tejido vegetal.

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, Luna, *et. al*, 1992).

Procedimiento utilizado para aislamiento de *Trichoderma*:

- 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 agua destilada estéril (dilución 10⁻³). De ahí se hace una dilución sucesiva para completar una dilución de 10⁻⁴ o las que se consideren 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 (Kubicek, C y Harman, G; 2002).

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

Procedimiento utilizado para aislamiento de *Fusarium*:

El método más común para aislar a los patógenos de las hojas infectadas y de otros órganos de la planta es el de seleccionar varios cortes pequeños de 5 a 10 mm² a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos. Esos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie, lo cual asegura que esas superficies se humedezcan y al cabo de 15 ó 30 segundos los cortes se toman 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. Posteriormente, los cortes se secan con trozos limpios de papel estéril o se pasan por tres cambios con agua estéril, y por último se colocan sobre el medio nutritivo (por lo común, de 3 a 5 por caja de Petri).

Los cortes esterilizados en su superficie durante menos tiempo generalmente contienen al patógeno y a varios contaminantes, mientras que los que se han esterilizado durante más tiempo no permiten el desarrollo de cualquier tipo de microorganismos debido a que han sido destruidos por el esterilizante de superficie. Sin embargo, algunos de los cortes depositados en el esterilizante de superficie durante periodos intermedios permitirán que sólo el patógeno se desarrolle y forme colonias puras en el cultivo, ya que se ha permitido que el esterilizante actúe el tiempo suficiente para destruir a todos

los contaminantes de superficie, pero no el tiempo necesario para destruir al patógeno, el cual se ha propagado desde el tejido enfermo hasta el tejido sano. Posteriormente, las colonias del patógeno, se resiembran asépticamente para su posterior estudio (Agrios, 2011).

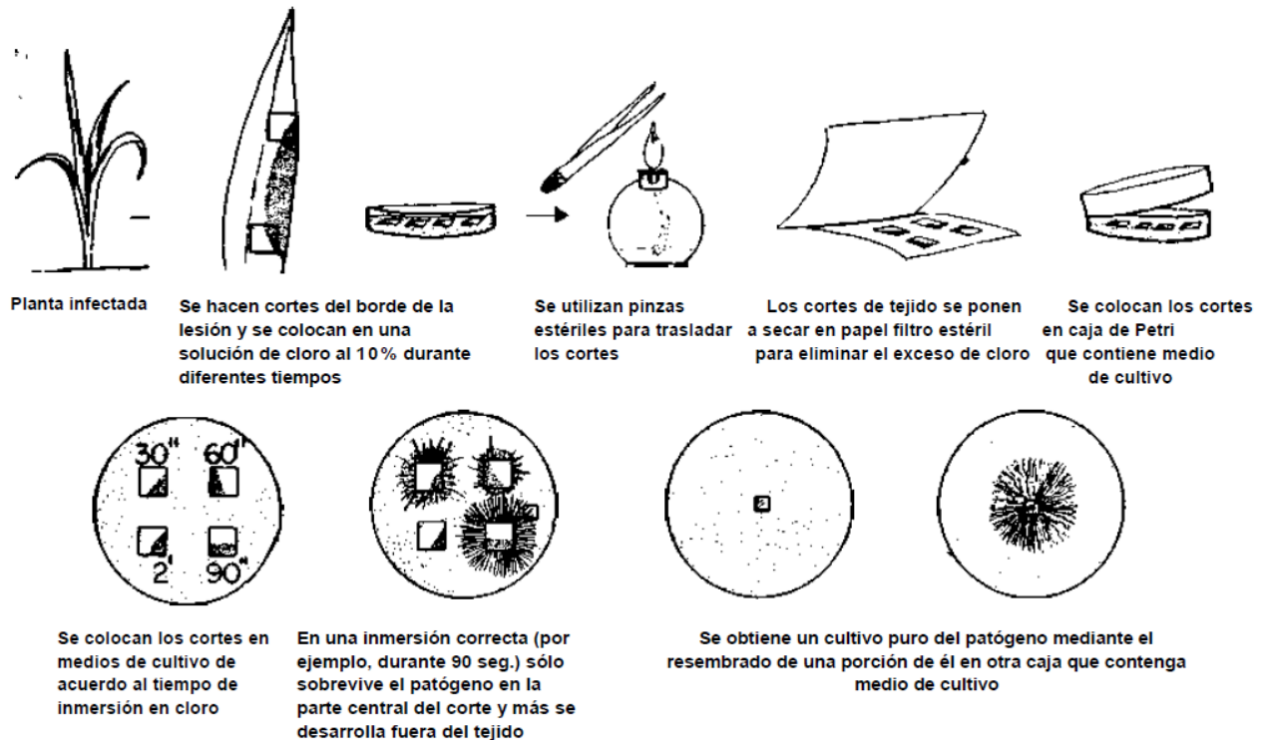


Figura 4: Aislamiento de hongo de tejido vegetal (Agrios, 2011)

b) Purificación

El procedimiento consistió en seleccionar colonias de hongos del cultivo convencional, estas deben de ser de la cepa que se desea purificar y no deben contener contaminantes de ningún tipo, como hongos, bacterias, ácaros, entre otros. Una vez seleccionada la colonia se toma una porción de la misma con una aguja de disección o se corta un trozo del medio de cultivo con un bisturí. La purificación se llevará a cabo en medio PDA. Esta operación exige el uso de instrumentos estériles, se debe flamear antes de cada uso para no contaminar el medio.

c) Caracterización morfológica

Consistió en una descripción detallada de los cultivos. Se describirán características macroscópicas como: color de la colonia, reversos de las colonias, textura de las colonias; también se describirán las estructuras microscópicas de los hongos encontrados incluyendo: hifas, conidióforos, microconidias, macroconidias, entre otras. Se medirá el crecimiento micelial de los hongos y se contabilizarán las colonias formadas.

d) Elaboración del cepario

Los aislamientos se conservarán de dos formas, la primera forma es en viales con medio PDA. Se conservaron en una incubadora que mantiene el hongo a temperatura ambiente y en obscuridad. La segunda forma es almacenamiento en viales con agua estéril refrigerados a 4°C. La función principal es preservar los cultivos de cepas específicas de hongos para su posterior utilización.

5.6 Análisis de la información

Se corroboró, por medio de montajes de las estructuras de los hongos, que los hongos aislados corresponden a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*. Se realizó una ficha de identificación para cada cepa para su almacenamiento en el cepario. Esta ficha cuenta con información de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas y la gráfica de crecimiento micelial. Toda la información se documentó con fotografías.

En la caracterización de las cepas obtenidas, se midió el crecimiento micelial tomando el radio de crecimiento con ayuda de una regla graduada. Se midió cada 24 horas en milímetros hasta que el organismo llenará la caja Petri. Posteriormente se procedió a realizar una curva de crecimiento graficándolo en el tiempo.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Aislamientos obtenidos de *Fusarium* y *Trichoderma*

Se obtuvieron aislamientos de *Fusarium* y *Trichoderma* de áreas de muestreo realizadas en el departamento de Guatemala, las cuales se resumen en el cuadro 3.

Cuadro 4: Cepas de *Fusarium* y *Trichoderma* aisladas en sitios de interés del departamento de Guatemala

| No. De muestra | Cultivo | Punto de muestreo (localidad) | Fecha | <i>Fusarium</i> | <i>Trichoderma</i> |
|----------------|----------------|-------------------------------|------------|-----------------|--------------------|
| 1 | Café | Fraijanes | 09/07/2016 | - | - |
| 2 | Piña | Villa Canales | 09/07/2016 | - | - |
| 3 | Tomate | Amatitlán | 09/07/2016 | 2 | 1 |
| 4 | Chile pimiento | Palencia | 9/08/2016 | - | - |

Como lo indica el cuadro el cultivo de tomate correspondiente al municipio de Amatitlán fue el único cultivo del cual se aisló tanto *Fusarium*, en tejido sintomático, como *Trichoderma* de suelo rizosférico.

El área donde se realizó el muestreo del cultivo de tomate se observaron siembras de maíz, frijol y café, los cultivos están plantados en áreas pequeñas que arrendan muchos pequeños agricultores, por lo cual no es una producción tecnificada. Esta área de cultivo está dentro de una cuenca por lo cual los productores no necesitan riego, el agricultor responsable del área muestreada indicó que solamente dependen de la humedad del suelo y la lluvia. Al ser un área de pequeños agricultores con recursos limitados, estos normalmente no aplican fungicidas, a menos que la incidencia de la enfermedad sea muy alta. Por este motivo se deduce que esta área tiene suelos con

mayores cantidades de microorganismos activos dentro de los cuales se encuentra *Trichoderma*.

Dentro de los cultivos muestreados el cultivo de tomate es ampliamente conocido por ser susceptible a *Fusarium* (Gonzales, 2006) por lo cual no es extraño que sea el cultivo en el cual se aisló. Los síntomas vistos en planta fueron: marchitez, clorosis en las hojas inferiores, necrosis en los haces vasculares y nódulos de raíz (la presencia de nematos está altamente relacionada con infecciones de *Fusarium*).

En los cultivos de café, piña y chile pimiento de los municipios de Fraijanes, Villa Canales y Palencia, respectivamente, no se aisló *Trichoderma* de los suelos ni *Fusarium* de tejido vegetal sintomático.

En el cultivo de café la topografía del terreno era muy quebrada y el suelo era poco profundo. Dependiendo del área muestreada se pudieron observar capas de suelo agrícola de entre 10 a 30 cm. El suelo no contenía mucha materia orgánica, esta puede ser la razón por la cual no se pudo aislar *Trichoderma* de estos suelos, ya que según Benítez (2004), algunas especies de *Trichoderma* es común aislarlas de suelos ácidos y con alto contenido de materia orgánica. La cobertura era de cuje, aguacate, banano, coboyacho, encino blanco, caspirol, gravilea, entre otros. Las plantaciones muestreadas fueron de 8, 10 y 12 años, de la variedad Catuaí, y una de 1 año de variedad Costa Rica.

En el cultivo de piña la variedad cultivada es Cayena Lisa. Se tomaron muestras de tejido en plantas con clorosis y necrosis en la base del tallo, que son los síntomas más comunes de *Fusarium* en este cultivo. El agrónomo a cargo del área indico que, según análisis realizados en el laboratorio de la Universidad San Carlos de Guatemala, el agente causal era *Phytophthora*, esta es la principal enfermedad que ataca el cultivo en esta región según el técnico, sobre todo en el periodo de siembra y establecimiento del cultivo.

El área muestreada en el cultivo de chile pimiento era de topografía quebrada. La capa de suelo agrícola era poco profunda de 15 a 20 cm. En el área se observaron siembras

de tomate y chile jalapeño. No se observaron plantas con sintomatología que correspondiera a *Fusarium*.

6.2 Purificación y separación de los aislamientos por tipo de colonia

En *Fusarium* se separaron dos cepas diferentes según el tipo de colonia. Una colonia presentaba una coloración roja y la otra era completamente blanca. Se corroboró por medio de montajes de estructuras que ambas colonias corresponden a *Fusarium*. (Ver cuadro 4 y 5). Las estructuras características para la identificación de *Fusarium* fueron las macroconidias, las cuales son hialinas y en forma de bastón. En una cepa se observaron macroconidias septadas y en la otra no septadas.

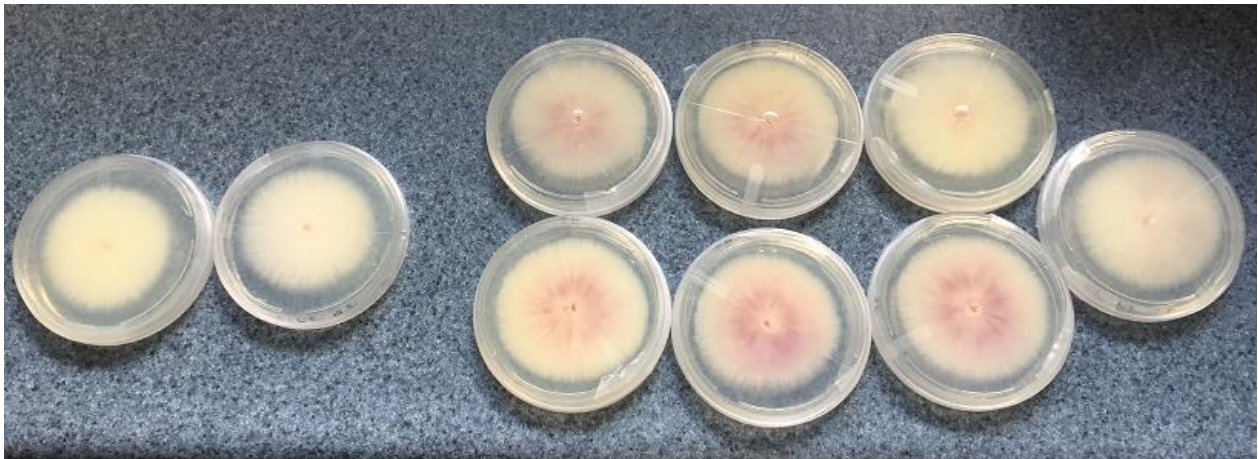


Figura 5: Colonias de *Fusarium* aisladas del cultivo de tomate en Amatitlán.

En *Trichoderma* solamente se encontró un tipo de colonia por lo que se consideró una sola cepa. Se corroboró por medio de montajes que la cepa encontrada corresponde a *Trichoderma*. (cuadro 6) Las estructuras características para la identificación de *Trichoderma* fueron las fiálides en forma de botella con una espora de color verde en la punta.

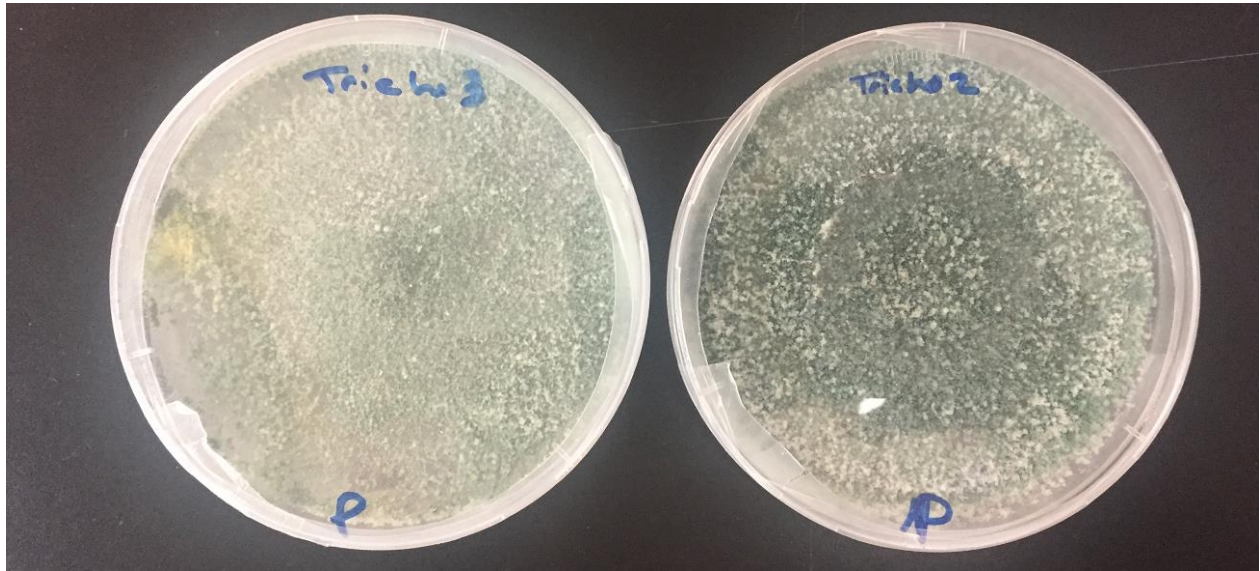
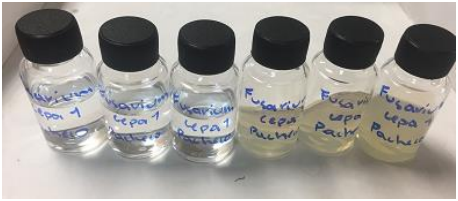


Figura 6: Colonia de *Trichoderma* aislada del cultivo de tomate en Amatitlán.

6.3 Caracterización morfológica y descripción del sitio de muestreo de las cepas aisladas.

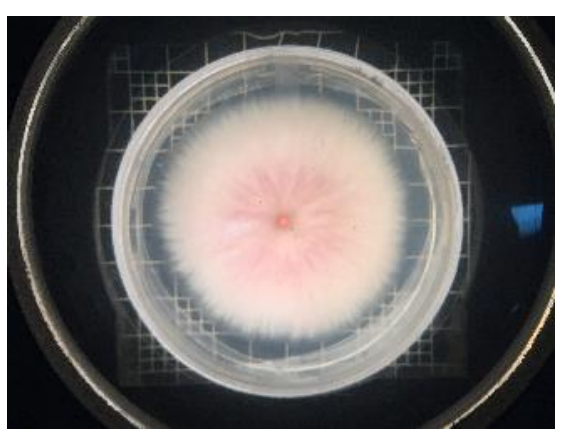
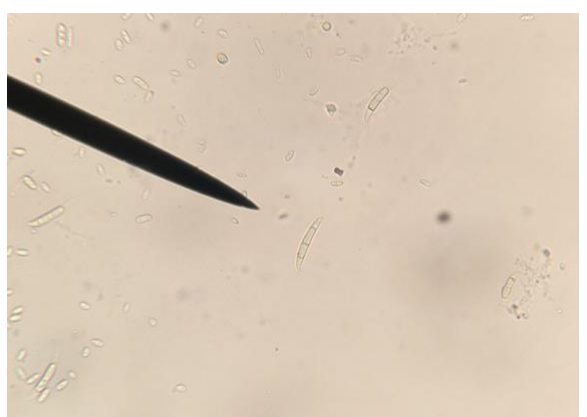
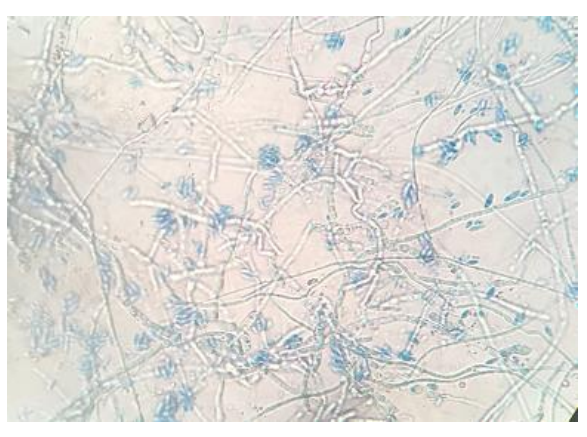
Los siguientes cuadros contienen información relevante acerca de los hongos aislados. Esta información se presenta en forma de ficha técnica para que se archive en el cepario junto con las muestras. Estas fichas técnicas contienen la clasificación taxonómica, información del sitio de muestreo, información general de manejo del cultivo, caracterización morfológica micro y macroscópica, entre otros.

Cuadro 5: Ficha técnica *Fusarium* cepa 1

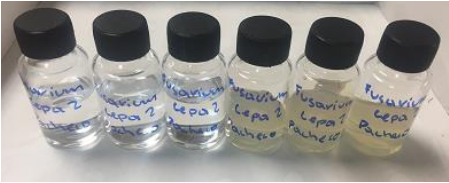
| | | | |
|-----------------------------------|--|---------------------------|--|
| Microorganismo | <i>Fusarium</i> | | |
| Código | cepa 1 | | |
| Cultivo donde se aisló | Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) | | |
| Clasificación taxonómica | Reino: Fungi Filo: Ascomicota Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Nectriaceae Género: <i>Fusarium</i> (ITIS, 2016) | | |
| Origen | Amatitlán, Guatemala | Coordenadas | N14°26'25.4" W90°26'31" |
| Altitud | 1335 msnm | Cobertura | Ninguna |
| Características del suelo | Arenoso | Sistema de cultivo | Intensivo ¹ a campo abierto |
| Almacenamiento | Viales con agua estéril a 4°C Viales con PDA | |  |
| Condiciones de crecimiento | Placas invertidas, a temperatura ambiente y sin luz. | | |
| Crecimiento micelial | Lleno la caja (80 mm) en 8 días. | | |

¹ Sistema de producción intensivo: cultivo de ciclo corto con producciones todo el año.

Características morfológicas

| | | |
|----------------------|--|---|
| Macroscópicas | Colonia blanca, redonda, cubierto por micelio algodónoso, produjo pigmentación roja. |  |
| Microscópicas | Microconidias abundantes, pequeñas, unicelulares, hialinas y agrupadas en forma de racimos. Macroconidias grandes, multicelulares, septadas, hialinas y en forma de banano. Micelio hialino. |   |

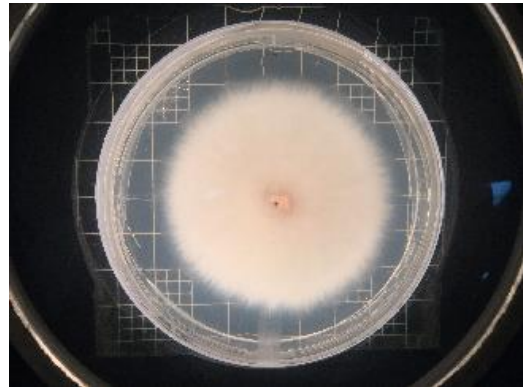
Cuadro 6: Ficha técnica *Fusarium* cepa 2

| | | | |
|-----------------------------------|--|---------------------------|--|
| Microorganismo | <i>Fusarium</i> | | |
| Código | cepa 2 | | |
| Cultivo | Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) | | |
| Clasificación taxonómica | Reino: Fungi Filo: Ascomicota Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Nectriaceae Género: <i>Fusarium</i> (ITIS, 2016) | | |
| Origen | Amatitlán, Guatemala | Coordenadas | N14°26'25.4" W90°26'31" |
| Altitud | 1335 msnm | Cobertura | Ninguna |
| Características del suelo | Arenoso | Sistema de cultivo | Intensivo a campo abierto |
| Almacenamiento | Viales con agua estéril a 4°C Viales con PDA | |  |
| Condiciones de crecimiento | Placas invertidas, a temperatura ambiente y sin luz. | | |
| Crecimiento micelial | Lleno la caja (80 mm) en 8 días. | | |

Características morfológicas

Macroscópicas

Colonia blanca, redonda, cubierto por micelio algodonoso y no produjo pigmento.

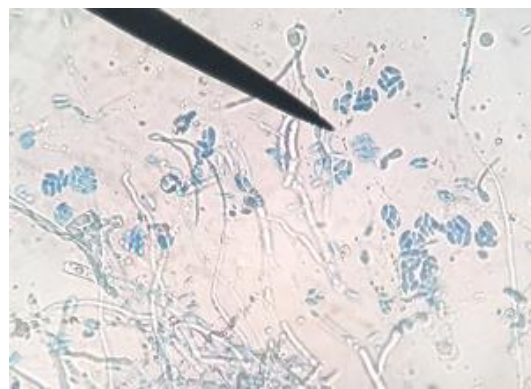


Microscópicas

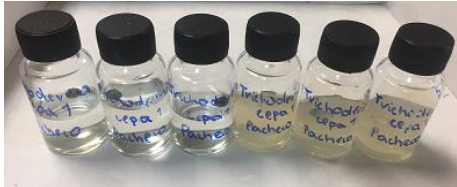
Microconidias abundantes pequeñas, unicelulares, hialinas y agrupadas en forma de racimos.

Macroconidias grandes, no septadas, hialinas y en forma de banano.

Micelio hialino.



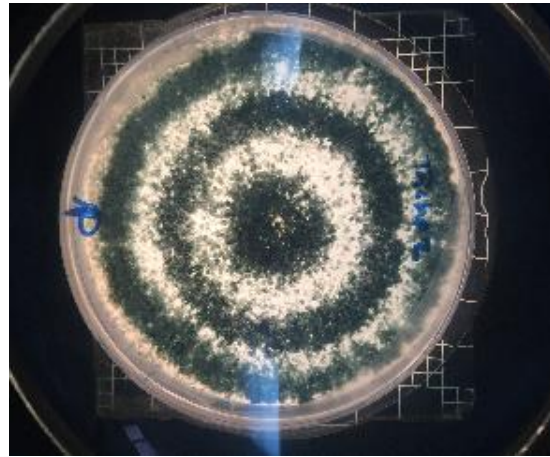
Cuadro 7: Ficha técnica *Trichoderma* cepa 1

| | | | |
|-----------------------------------|--|---------------------------|--|
| Microorganismo | <i>Trichoderma</i> | | |
| Código | cepa 1 | | |
| Cultivo | Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) | | |
| Clasificación taxonómica | Reino: Fungi Filo: Ascomicota Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> (ITIS, 2016) | | |
| Origen | Amatitlán, Guatemala | Coordenadas | N14°26'25.4" W90°26'31" |
| Altitud | 1335 msnm | Cobertura | Ninguna |
| Características del suelo | Arenoso | Sistema de cultivo | Intensivo a campo abierto |
| Almacenamiento | Viales con agua estéril a 4°C Viales con PDA | |  |
| Condiciones de crecimiento | Placas invertidas, a temperatura ambiente y sin luz. | | |
| Crecimiento micelial | Lleno la caja (80 mm) en 4 días. | | |

Características morfológicas

Macroscópicas

Colonia de crecimiento rápido, circular, blanca al comienzo y más adelante forma micelio lanoso y anillos concéntricos verdes.



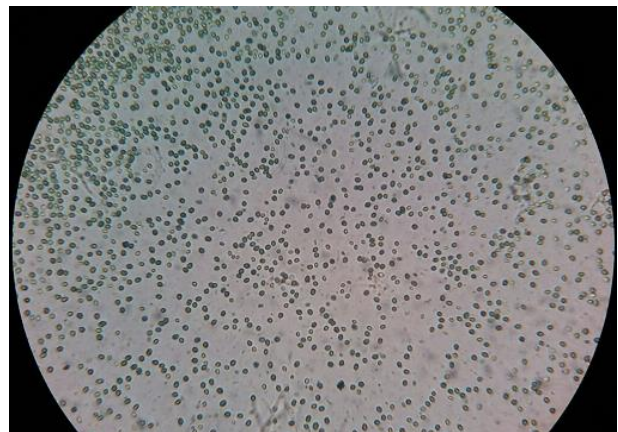
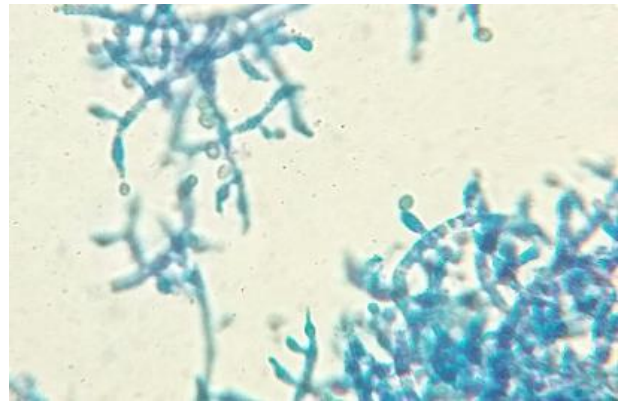
Microscópicas

Conidióforo hialino y ramificado.

Fiálides hialinas y con forma de botella.

Conidias redondas y de color verde.

Micelio hialino.



Juntamente con la caracterización morfológica se llevó a cabo una medición de crecimiento micelial de las cepas aisladas. Las condiciones ambientales fueron las mismas para todas las cepas, cajas Petri de 80 mm con medio PDA a temperatura ambiente y sin luz. Los resultados se resumen en el cuadro 7 y figura 15.

Cuadro 8: Medidas estadísticas resumen de crecimiento micelial de cepas encontradas

| Organismo | Cepa | Variable | n | Media | D.E. | E.E. | CV | Min | Max | P(5) | P(95) |
|--------------------|------|------------|----|-------|-------|------|-------|-----|-----|------|-------|
| <i>Fusarium</i> | 1 | Radio (mm) | 45 | 18.6 | 13.87 | 2.07 | 74.56 | 0 | 40 | 0 | 40 |
| <i>Fusarium</i> | 2 | Radio (mm) | 45 | 19.71 | 13.76 | 2.05 | 69.83 | 0 | 40 | 0 | 40 |
| <i>Trichoderma</i> | 1 | Radio (mm) | 25 | 21.04 | 15.57 | 3.11 | 74.02 | 0 | 40 | 0 | 40 |

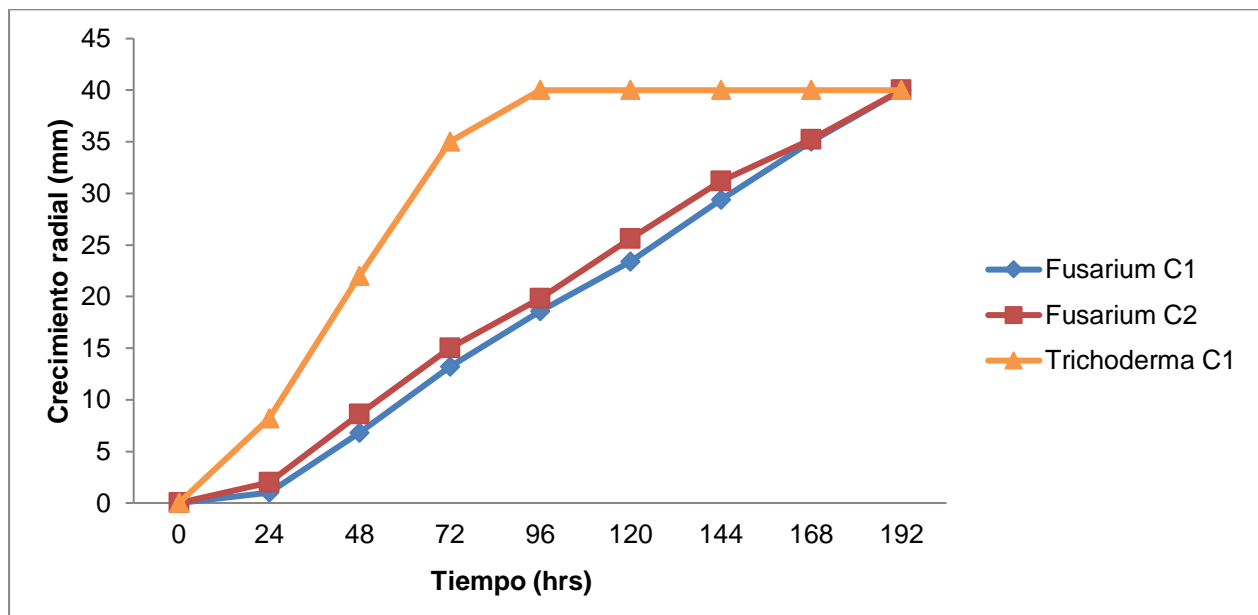


Figura 7: Comparación de crecimiento micelial de cepas encontradas.

En la figura 11 se muestra el crecimiento de cada cepa encontrada. El comportamiento de *Fusarium* es completamente lineal, mientras que el comportamiento de *Trichoderma* es ligeramente sigmoideal, mostrando el mayor crecimiento el día 2 y 3. También se puede observar que ambas cepas de *Fusarium* alcanzaron el radio máximo en 192 horas, mientras que la cepa de *Trichoderma* alcanzó este radio en 96 horas. Estadísticamente hubo significancia en los crecimientos de cada cepa (ver cuadro 9 en anexos).

El potencial mostrado por esta cepa de *Trichoderma* para su uso como controlador biológico es muy alto, ya que según Chet y Elad (1983), uno de los mecanismos de control de *Trichoderma* es la competencia por nutrientes y espacio, donde claramente *Trichoderma* tiene ventaja sobre *Fusarium*. Así mismo el proceso de micoparasitismo (otro de los mecanismos de control) ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas. La primera de ellas es un crecimiento quimiotrófico hacia el hospedero, estimulado por moléculas procedentes del mismo. Es en esta primera etapa en que la cepa aislada de *Trichoderma* muestra un alto potencial, ya que el crecimiento de *Trichoderma*, bajo las mismas condiciones de crecimiento que las cepas de *Fusarium*, fue muy superior. Esto no necesariamente indica que esta cepa ejerza un control efectivo sobre los patógenos. Lo que se pretende es sentar las bases para una investigación más profunda acerca de esta cepa específica y su potencial como controlador biológico.

Cuadro 9: Área bajo la curva del desarrollo micelial de cada cepa aislada

| Organismo | Método | Área bajo la curva |
|---------------------------|---------------|---------------------------|
| <i>Fusarium</i> cepa 1 | Trapezio | 28.286 |
| <i>Fusarium</i> cepa 2 | Trapezio | 32.429 |
| <i>Trichoderma</i> cepa 1 | Trapezio | 75.143 |

El área bajo la curva es una medida integradora permite confirmar y cuantificar la diferencia entre el crecimiento de cada cepa. El cálculo se realizó solo para las primeras 96 horas de crecimiento ya que en este tiempo la cepa de *Trichoderma* alcanzó el máximo crecimiento permitido en la caja Petri, aunque para *Fusarium* faltaran otras 96 horas. Esto para tener un punto de comparación para los dos hongos. Podemos observar áreas similares para ambas cepas de *Fusarium*, pero en cuanto a *Trichoderma* el área es mucho mayor. Esto muestra que *Trichoderma* tiene un crecimiento y velocidad de crecimiento aproximado 2.5 veces mayor a *Fusarium*.

7. CONCLUSIONES

Se aislaron dos cepas de *Fusarium* y una de *Trichoderma* asociadas al cultivo de tomate provenientes del municipio de Amatitlán, departamento de Guatemala.

Se aisló una cepa de *Trichoderma* asociada al cultivo de tomate proveniente del municipio de Amatitlán, departamento de Guatemala.

Se caracterizaron morfológicamente cada cepa corroborando los géneros de hongo.

Se observó que la velocidad de crecimiento micelial de *Trichoderma* en medio de cultivo sintético, bajo las mismas condiciones de crecimiento, es significativamente mayor al de *Fusarium*.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar la caracterización de la cepa aislada de *Trichoderma* evaluando indicadores de patogenicidad hacia *Fusarium* spp.

Se sugiere realizar la identificación de especies y sub especies de las cepas aisladas utilizando métodos de laboratorio que incluyan el análisis del ADN.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2011). Fitopatología. Quinta Edición. Limusa, México. 838p.
- Almodóvar, W. (2005). Clínica del día: Enfermedades de las solanáceas. (En línea). Consultado 10 de febrero del 2016. Disponible en: http://academic.uprm.edu/walmodovar/HTMLObj-259/Enfermedades_Solen_ceas.pdf
- Baker, R. (1988). Environmental conditions favoring symptom expression. Primer curso internacional sobre patógenos vasculares del clavel. Asocolflores. Noviembre 8-11 de 1988.
- Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M. y Codón, A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Department of Genetics, University of Sevilla. 7 (04). 249-260.
- Campos, O. (1999). Observaciones preliminares sobre las causas que provocan la marchitez y muerte del cafeto. (En línea). Consultado 10 de febrero del 2016. Disponible en: https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Causas_marchitez_cafeto
- Castellanos, G.; Jara, C.; Mosquera, G. (2011). Guía práctica 4: *Fusarium oxysporum* (en línea). CIAT. Colombia. No. 375. Consultado 16 de febrero del 2016. Disponible en: http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/04/guia_practica4.pdf#page=1
- Chávez, P. (2006). Producción de *Trichoderma* spp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis Ing. Microbiológica. Pontificia Universidad Javeriana. 113p.
- Dettman, J.; Sirjusingh, C.; Kohn, L.; Anderson, J. (2007). Incipient speciation by divergent adaptation and antagonistic epistasis in yeast. *Nature*. 447(7144): 585-588.

- FAO. (2012). Nueva alianza para reducir las emisiones de bromuro de metilo (en línea). Consultado 4 de febrero del 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/164471/icode/>
- Fernández, L.; Rojas, N.; Roldán, T.; Ramirez, M.; Zegarra, H.; Hernández, R.; Reyes, R.; Hernandez, D.; Arce, J. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo, México. 182p.
- Fletcher, J. T; Martin, J. A. (1972). Spread and control of Fusarium wilt in carnation. *Plant Pathology*, 25: 81-84.
- Garcés E; Orozco, M; Bautista, G; Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*. Vol. 6. No.1.
- Gonzales, P. (2006). Enfermedades del tomate (en línea). Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República de Uruguay. Consultado 2 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html
- Harman, G.; Kubicek, C. (2002). *Trichoderma* and *Gliocladium* Basic biology, taxonomy and genetics Volume 1. Taylor & Francis, Estados Unidos, 278p.
- Jacas, J.; Caballero, P. (2010). El control biológico de plagas y enfermedades. Avilla (ed). Universidad Pública de Navarra. 223p.
- Leslie, J.; Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Primera Edición. Blackwell Publishing, Estados Unidos, 388p.
- Luna, H. (2012). Densidad poblacional de los hongos micorrizicos arbusculares en suelos agrícolas aplicados con composta. Tesis Doc. Tlaxcala, México. IPN. 113p.
- MARN. (2016). Protocolo de Montreal (en línea). Consultado 4 de febrero del 2016. Disponible en: http://www.marn.gob.gt/s/viena-montreal/paginas/Protocolo_de_Montreal

- Marroquín, O. (2012). Docencia e investigación en plagas y enfermedades radicales en el cultivo de melón (*Cucumis melo*) en el Instituto Tecnológico de Nor-oriente, -ITECNOR-, Zacapa, Guatemala. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad San Carlos de Guatemala. 87p.
- Ochoa, M. (2002). Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Hypomicetes: Hyphales), sobre *Mycosphaerella fijiensis* (Loculoascomycetes: Dothideales). Tesis Msc. Biotecnología. Universidad de Colima. 86p.
- OIRSA. (2014). Fusariosis de la piña (*Fusarium guttiforme*). (En línea). Consultado 10 de febrero del 2016. Disponible en: <http://www.oirsa.org/portal/sanidad-vegetal/fusariosis-de-la-pinha.html>
- Ramirez, G.; Luna, M.; Mejía, Ch.; Velázquez, M.; Tsuzuki, R.; Vierna, G. Muggenburg, I. (1992). Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de Microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM.
- Sanz, M; Dueñas, R. (1973). Desinfección de suelos. Publicaciones de extensión agraria. Consultado 2 de febrero de 2016. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1973_04-05.pdf
- Simmons, C.; Tarano, J.; Pinto, J. (1959). Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Edición en español. José de Pineda Ibarra. Guatemala. 997p.

10. ANEXO

Cuadro 10: Prueba T para cepas encontradas

Prueba T para muestras Independientes

| t (dias) | Clasific | Variable | Grupo 1 | Grupo 2 | n(1) | n(2) | Media(1) | Media(2) | Media(1)-Media(2) | LI(95) | LS(95) | pHomVar | T | p-valor | prueba |
|----------|-----------|------------|---------------|------------------|------|------|----------|----------|-------------------|--------|--------|---------|---------|---------|-----------|
| 120 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Fusarium C2} | 5 | 5 | 23.40 | 25.60 | -2.20 | -3.28 | -1.12 | 0.3651 | -4.69 | 0.0016 | Bilateral |
| 120 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 23.40 | 40.00 | -16.60 | -17.71 | -15.49 | <0.0001 | -41.50 | <0.0001 | Bilateral |
| 120 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 25.60 | 40.00 | -14.40 | -15.08 | -13.72 | <0.0001 | -58.79 | <0.0001 | Bilateral |
| 144 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Fusarium C2} | 5 | 5 | 29.40 | 31.20 | -1.80 | -2.53 | -1.07 | 0.7040 | -5.69 | 0.0005 | Bilateral |
| 144 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 29.40 | 40.00 | -10.60 | -11.28 | -9.92 | <0.0001 | -43.27 | <0.0001 | Bilateral |
| 144 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 31.20 | 40.00 | -8.80 | -9.36 | -8.24 | <0.0001 | -44.00 | <0.0001 | Bilateral |
| 168 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Fusarium C2} | 5 | 5 | 35.00 | 35.20 | -0.20 | -1.06 | 0.66 | 0.3965 | -0.53 | 0.6075 | Bilateral |
| 168 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 35.00 | 40.00 | -5.00 | -5.88 | -4.12 | <0.0001 | -15.81 | 0.0001 | Bilateral |
| 168 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 35.20 | 40.00 | -4.80 | -5.36 | -4.24 | <0.0001 | -24.00 | <0.0001 | Bilateral |
| 24 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 1.00 | 8.20 | -7.20 | -8.24 | -6.16 | <0.0001 | -19.24 | <0.0001 | Bilateral |
| 24 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 2.00 | 8.20 | -6.20 | -7.24 | -5.16 | <0.0001 | -16.57 | 0.0001 | Bilateral |
| 48 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Fusarium C2} | 5 | 5 | 6.80 | 8.60 | -1.80 | -2.53 | -1.07 | 0.7040 | -5.69 | 0.0005 | Bilateral |
| 48 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 6.80 | 22.00 | -15.20 | -16.06 | -14.34 | 0.3965 | -40.62 | <0.0001 | Bilateral |
| 48 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 8.60 | 22.00 | -13.40 | -14.32 | -12.48 | 0.6328 | -33.50 | <0.0001 | Bilateral |
| 72 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Fusarium C2} | 5 | 5 | 13.20 | 15.00 | -1.80 | -2.36 | -1.24 | <0.0001 | -9.00 | 0.0008 | Bilateral |
| 72 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 13.20 | 35.00 | -21.80 | -22.66 | -20.94 | 0.3965 | -58.26 | <0.0001 | Bilateral |
| 72 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 15.00 | 35.00 | -20.00 | -20.88 | -19.12 | <0.0001 | -63.25 | <0.0001 | Bilateral |
| 96 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Fusarium C2} | 5 | 5 | 18.60 | 19.80 | -1.20 | -1.93 | -0.47 | 0.7040 | -3.79 | 0.0053 | Bilateral |
| 96 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C1} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 18.60 | 40.00 | -21.40 | -22.08 | -20.72 | <0.0001 | -87.37 | <0.0001 | Bilateral |
| 96 | Organismo | Radio (mm) | {Fusarium C2} | {Trichoderma C1} | 5 | 5 | 19.80 | 40.00 | -20.20 | -20.76 | -19.64 | <0.0001 | -101.00 | <0.0001 | Bilateral |

Guatemala, 28 de febrero de 2,017

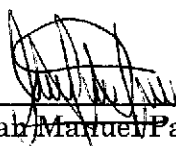
Señores:
Comisión de Tesis
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Ciudad de Guatemala.

Estimados señores:

Por este medio hago constar de la entrega de 18 viales que contienen 3 cepas de hongos al laboratorio de la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas. Esto como resultado del trabajo de tesis **PROSPECCIÓN DE *Trichoderma* Y *Fusarium* EN EL DEPARTAMENTO DE GUATEMALA, GUATEMALA**. 2 de estas cepas corresponden al género *Fusarium* y una al género *Trichoderma*. Cada juego de viales, que contiene una cepa de hongo, consta de tres viales con agua estéril y tres de PDA.

Sin otro particular, los saludo.

Atentamente,



Juan Manuel Pacheco Calderón

Recibido por:



Pamela Camarero

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDIAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRICOLAS
LABORATORIOS