

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 CHIMALTENANGO
TESIS DE GRADO

DAVID ESTUARDO VALDÉS SALÁN
CARNET 12477-12

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, JULIO 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 CHIMALTENANGO
TESIS DE GRADO

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

POR
DAVID ESTUARDO VALDÉS SALÁN

PREVIO A CONFERÍRSELE

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

GUATEMALA DE LA ASUNCIÓN, JULIO 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. LUIS MOISES PEÑATE MUNGUÍA

TERNA QUE PRACTICÓ LA EVALUACIÓN

MGTR. ALVIN ROLANDO OVALLE LYNCH
MGTR. JULIO ROBERTO GARCÍA MORÁN
ING. SERGIO ALEJANDRO MANSILLA JIMÉNEZ

Guatemala 07 de Julio de 2017

Consejo de Facultad
Ciencias Ambientales y Agrícolas
Presente

Estimados miembros del Consejo:

Por este medio hago constar que he asesorado el trabajo de graduación del estudiante DAVID ETUARDO VALDES SALAN, carné 12477-12, titulada: "Prospección de Trichoderma y Fusarium en el departamento de Chimaltenango, Guatemala.

La cual considero que cumple con los requisitos establecidos por facultad, previo a su autorización de impresión.

Atentamente,


MGTR. Luis Moises Peñate Munguía
Colegiado No. 5495
Cod. URL 22169



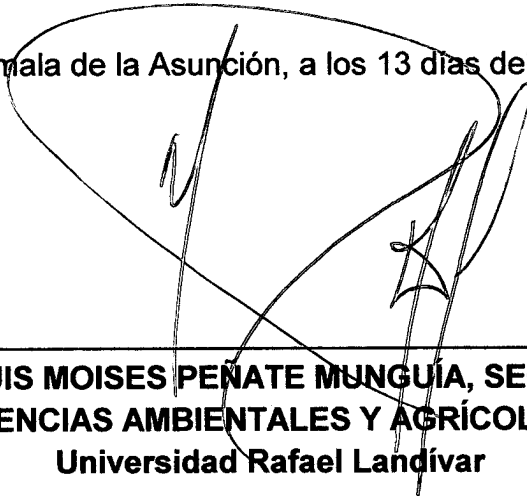
Orden de Impresión

De acuerdo a la aprobación de la Evaluación del Trabajo de Graduación en la variante Tesis de Grado del estudiante DAVID ESTUARDO VALDÉS SALÁN, Carnet 12477-12 en la carrera LICENCIATURA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS CON ÉNFASIS EN GERENCIA AGRÍCOLA, del Campus Central, que consta en el Acta No. 06114-2017 de fecha 12 de julio de 2017, se autoriza la impresión digital del trabajo titulado:

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

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 13 días del mes de julio del año 2017.



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

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios que me dio la vida, la sabiduría y la bendición de superarme.

La Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas por ser parte de mi formación.

Ing. Luis Peñate, por su asesoría, revisión y corrección de la presente investigación.

Ing. Julio García, por su asesoría, revisión y corrección de la presente investigación.

Cada uno de los productores de hortalizas en el departamento de Chimaltenango, que facilitaron la realización de la presente investigación.

DEDICATORIA

A:

Dios: Quién siempre me da su infinito amor, fortaleza para superar las diferentes etapas de la vida y me bendice con las personas que me rodean.

Mis padres: Jose Luis Valdés y Gladys Elvira Salán a quienes quiero mucho, por su tiempo, esfuerzo, consejos oportunos y por su ejemplo a seguir.

Mis hermanos: Manuel Valdés y Jose Valdes a quienes quiero mucho y ser esa motivación para seguir adelante.

Mi novia: Silvia Alejandra a quien amo mucho, por ser ese sustento y apoyo en todo momento.

Mi familia: Abuelos, tíos, primos, sobrinos y cuñados que de una u otra forma han contribuido en mi formación.

Mis amigos: Ricardo García y Erick Arango por ser esa compañía profesional que contribuyeron a mi formación.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Cultivos de importancia en Chimaltenango.....	2
2.2 Generalidades de <i>Fusarium</i>	2
2.3 Ciclo de la Enfermedad.....	3
2.3.1 Suelo.....	3
2.3.2 Síntomas del hongo en la planta.....	4
2.3.3 Epidemiología.....	4
2.4 Generalidades de <i>Trichoderma</i>	5
2.4.1 <i>Trichoderma</i> como un agente biológico.....	6
2.4.2 Mecanismos de antagonismo.....	7
2.4.2.1 Competencia.....	7
2.4.2.2 Micoparasitismo.....	8
2.4.2.3 Antibiosis.....	8
2.4.2.4 Producción de Enzimas.....	9
2.4.2.5 Inducción de resistencia.....	9
2.5 Control biológico de plagas y enfermedades.....	11
2.5.1 Descripción del método y técnicas.....	12
2.6 Evolución y coevolución de microorganismos.....	13
2.7 Extracto del protocolo de Montreal.....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3.1 Definición del problema y justificación del trabajo.....	15
4. OBJETIVOS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
5. METODOLOGÍA.....	18
5.1 Ambiente o lugar de trabajo.....	18
5.2 Sujetos y/o unidades de investigación.....	18
5.3 Tipo de investigación.....	18
5.4 Instrumento.....	19

5.5	Procedimiento	19
5.5.1.	Fase de campo	19
	a) Método de muestreo utilizado	19
	b) Transporte de muestras.....	20
	c) Almacenamiento de muestras.....	20
5.5.2.	Fase de Laboratorio.....	20
	a) Equipo de Laboratorio.....	20
	b) Aislamiento de hongos	21
	De suelo	21
	De tejido vegetal	21
	c) Purificación de cepas	22
	d) Caracterización morfológica	22
	e) Almacenamiento de cepas	22
5.6	Análisis de la información	23
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1	DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE EN FUNCIÓN DEL CULTIVO	24
	6.1.1 Cultivo de arveja (<i>pisum sativum</i>)	24
	6.1.2 Cultivo de tomate (<i>solanum lycopersicum</i>).....	24
	6.1.3 Cultivo de chile pimiento (<i>Capsicum anum</i>).....	25
6.2	Determinación de la presencia de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> en parcelas productoras del departamento de Chimaltenango.....	25
6.3	Aislamiento de los géneros <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	26
	6.3.1 Cultivo de Arveja (<i>pisum sativum</i>).....	26
	6.3.2 Cultivo de tomate (<i>Solanum Lycopersicum</i>).....	28
	6.3.3 Cultivo de chile pimiento (<i>capsicum annum</i>).....	30
	6.3.4 Cultivo de repollo (<i>Brassica oleracea</i>).	31
6.4	Purificación de los géneros <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	31
	6.4.1 Cultivo de arveja china.....	32
	6.4.2 Cultivo de tomate	32
	6.4.3 Cultivo de chile pimiento.....	34
6.5	Caracterización de las cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	34
	6.5.1 Caracterización de colonias	34
	6.5.2 Caracterización del crecimiento.....	37

6.6 Conservación de las cepas de los géneros <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	41
6.6.1 Conservación en agua estéril.....	41
6.6.2 Conservación en medio Agar Papa Dextrosa (PDA).....	41
7. CONCLUSIONES.....	43
8. RECOMENDACIONES	44
9. BIBLIOGRAFÍA.....	45
10. ANEXOS.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sintomatología de <i>Fusarium</i> sp. En pepinos.	5
Figura 2: Cepa del género <i>Fusarium</i> cultivo de arveja china, Patzicía	27
Figura 3: Cepa del género <i>Fusarium</i> cultivo de tomate, San Juan Comalapa.....	28
Figura 4: Cepa del género <i>Trichoderma</i> cultivo de tomate, San Juan Comalapa.....	29
Figura 5: Cepa género <i>Fusarium</i> cultivo chile pimiento, Santa Cruz Balanya.....	30
Figura 6: : Muestras del cultivo de Repollo.....	31
Figura 7: Purificaciones de cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i>	32
Figura 8: Purificación de cepa <i>Fusarium</i> en cultivo de arveja.....	32
Figura 9: Purificación cepa <i>Fusarium</i> en cultivo de tomate.	33
Figura 10: : Purificación cepa <i>Trichoderma</i> en cultivo de tomate.	33
Figura 11: Purificación cepa <i>Fusarium</i> en cultivo de chile pimiento.	34
Figura 12: Cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> caracterizadas.	35
Figura 13: Diagrama de dispersión, del crecimiento de las cepas de <i>Fusarium</i> . Diámetro (cm) por los días de crecimiento.....	38
Figura 14: Diagrama de dispersión del crecimiento de la cepa de <i>Trichoderma</i> . Diámetro (cm) por los días de crecimiento.....	39
Figura 15: Cepas de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> conservadas en medio PDA y Agua estéril.....	42
Figura 16: Plantación de arveja china en Patzicía.....	48
Figura 17: Muestras recolectadas del cultivo de arveja china.	48
Figura 18: Lavado y secado de esquejes.	49
Figura 19: Siembra de esquejes en cajas Petri.....	49

Figura 20: Segundo lote muestreado para el cultivo de Arveja china.....	50
Figura 21: Muestras del cultivo de tomate, necrosis en los haces vasculares.	50
Figura 22: Muestras de suelo.....	51
Figura 23: Preparación de medio de cultivo PDA.....	51
Figura 24: : Llenado de cajas Petri con medio de cultivo PDA.....	52
Figura 25: Esquejes sembrados en medio de cultivo PDA.....	52
Figura 26: Purificaciones de cepas del género Fusarium.....	53
Figura 27: cepas de los géneros Trichoderma y Fusarium, identificadas.....	53
Figura 28: Conservación de cepa del género Trichoderma en agua estéril y medio PDA. Localización: San Juan Comalapa.....	54
Figura 29: : Conservación de cepa del género Fusarium en agua estéril y medio PDA. Localización: San Juan Comalapa.	54
Figura 30: Conservación de cepa del género Fusarium en agua estéril y medio PDA. Localización: Santa Cruz Balanya.....	55
Figura 31: Conservación de cepa del género Fusarium en agua estéril y medio PDA. Localización: Patzicía.....	55
Figura 32: Entrega de cepario a los Laboratorios de la FCAA.....	56

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Especies del género Trichoderma empleadas en el control biológico de hongos y bacterias	10
Cuadro 2: determinación de la presencia de Trichoderma y Fusarium	25
Cuadro 3: número de purificaciones en muestras	31
Cuadro 4: Descripción macroscópica de Fusarium	35
Cuadro 5: Descripción microscópica de Fusarium	36
Cuadro 6: Descripción macroscópica de Trichoderma	36
Cuadro 7: Descripción microscópica de Trichoderma	37
Cuadro 8: Estadística descriptiva de las cepas de Fusarium	37
Cuadro 9: Estadística descriptiva para la cepa de Trichoderma.....	39
Cuadro 10: Área bajo la curva Fusarium y Trichoderma	40

PROSPECCIÓN DE *TRICHODERMA* Y *FUSARIUM* EN EL DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO, GUATEMALA.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la búsqueda e identificación de cepas de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* en cultivos de importancia comercial para el departamento de Chimaltenango para posteriormente caracterizar su crecimiento *in vitro*, además de generar un cepario que en un futuro sirva de base para investigaciones de futuros profesionales. La investigación se llevó a cabo en los municipios de Patzicía, San Juan Comalapa y Santa Cruz Balanyá, en los cuales se desarrollan los principales cultivos del departamento de Chimaltenango, los cuales son: Arveja China, Tomate, Chile pimiento y Repollo. Se obtuvieron muestras de suelo y material vegetal con sintomatología de los géneros en prospección. Posteriormente se realizaron medios selectivos con antibiótico donde se sembraron muestras para la multiplicación de los patógenos. Con el objetivo de garantizar la pureza de las muestras fueron realizadas las purificaciones necesarias hasta obtener únicamente el patógeno de interés. Se pudieron obtener tres cepas de *Fusarium* localizadas en los municipios de Patzicía, San Juan Comalapa y Santa Cruz Balanya, una cepa de *Trichoderma* en el municipio de San Juan Comalapa. Dada la variabilidad de diferentes factores como suelo, clima, manejo, se considera que pueden ser las causas de no obtener presencia de los géneros en todas las localidades. Para dichas cepas se presenta una estadística descriptiva en base al crecimiento en función del diámetro así como también una descripción organoléptica. Las cepas fueron conservadas en medio PDA y agua estéril que garantizan su pureza en un largo periodo de tiempo.

TRICHODERMA AND FUSARIUM PROSPECTION IN CHIMALTENANGO, GUATEMALA

SUMMARY

The main objective of this investigation was the research and identification of strains of the following fungus classification: *Trichoderma* and *Fusarium*, in crops of commercial importance for the department of Chimaltenango, to later characterize their growth in-vitro, besides creating a ceparium that in the future will serve as a base for investigations of agronomy professionals. The research was carried out in the municipalities of Patzicía, San Juan Comalapa and Santa Cruz Balanyá, in which the main crops of the department of Chimaltenango are developed, which are: Snow Peas, Tomato, Red Pepper and Cabbage. Samples of soil and plant material were obtained with symptomatology of the genera in prospecting. Subsequently, antibiotic selective media were used in which samples were seeded for the multiplication of the pathogens. In order to guarantee the purity of the samples, the necessary purifications were carried out until only the pathogen of interest was obtained. Three strains of *Fusarium* were found in the municipalities of Patzicía, San Juan Comalapa and Santa Cruz Balanyá, and a strain of *Trichoderma* in the municipality of San Juan Comalapa. Given the variability of different factors such as soil, climate and management, the presence of the genera wasn't found in all the localities. For these strains a descriptive statistic based on growth as a function of diameter is presented as well as an organoleptic description. The strains were conserved in PDA medium and sterile water, guaranteeing their purity in a long period of time.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y ataca a diversas plantas. Tienen la capacidad de vivir y desarrollarse en altas temperaturas (hasta 37 °C), por lo que son llamados, agentes oportunistas. En la actualidad se tiene conocimiento de más de 100 especies de agentes pertenecientes a este género, pero son fundamentalmente tres especies las que generan mayor problema en la agricultura, *F.solani*, *F.oxysporum* y *F.verticilloides*. (Tapia & Amaro, 2014)

Una solución para el manejo y control de estas especies, es la utilización de insumos químicos, pero la mayor parte de los productos que en el mercado están disponibles, son de altos costos, impidiendo con esto que los agricultores puedan acceder y poder disminuir los problemas causados por dichas especies; además de los efectos colaterales como la contaminación ambiental, riesgo de intoxicaciones, presencia de residuos químicos en la producción, entre otros.

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron considerados antibióticos (Martínez, 2013).

En base a lo expresado en el párrafo anterior, actualmente se desarrollan formulado de agentes de control biológico, es decir, organismos vivos que reducen la población de insectos plaga y patógenos que afectan a los cultivos o depredación. Existen hongos, bacterias y virus antagonistas de los agentes que provocan plagas y enfermedades. Estos organismos (los hongos en particular), despiertan el interés de las empresas y órganos de investigación por su papel en el control de plagas y enfermedades de cultivos sin dañar el medio y la salud (Alicante, s.f.).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cultivos de importancia en Chimaltenango

Según el agro en cifras del año 2014, para el departamento de Chimaltenango se pueden tomar como cultivos de importancia y de mayor producción en la región los siguientes:

- Arveja china; con un aporte a la producción nacional del 69%, teniendo el 65.2% de la superficie cosechada en el país.
- Brócoli; con un aporte a la producción nacional del 56%, teniendo el 56% de la superficie cosechada en el país.
- Repollo; con un aporte a la producción nacional del 51%, teniendo un 42.9% de la superficie cosechada en el país.
- Zanahoria; con un aporte a la producción nacional del 36%, teniendo un 30.46% de la superficie cosechada en el país.
- Aguacate; con un aporte a la producción nacional del 12%, teniendo un 6.8% de la superficie cosechada en el país.
- Café; con un aporte a la producción nacional del 8%.

Existen diferentes especies de *Fusarium* causantes de severos daños en las plantas, interrumpiendo su desarrollo y producción final. *F. oxysporum* es la especie que ocasiona la mayor parte de problemas en la agricultura, causando daños en cultivos como: repollo (f. sp. *Conglutinans*), alverja (f. sp. *Pisi*), brócoli (*Brassicaolearacea*) y zanahoria (*Daucus carota; sativus*); los cuales coinciden con los cultivos de importancia en el departamento de Chimaltenango (Arbeláez Torres, s.f.).

2.2 Generalidades de *Fusarium*

Fusarium, se caracteriza por ser un patógeno que permanece por un largo periodo de tiempo presente en los suelos, por lo que una vez establecido, dicho organismo puede estar presente por un tiempo indefinido. Sobrevive en el suelo en forma de micelio y en cualquier forma de sus esporas, pero permanece con mayor frecuencia como clamidosporas, las cuales pueden llegar a sobrevivir hasta por 30 años. El medio de dispersión no es muy complejo, y es en este punto donde podemos encontrar el mayor de los problemas para las producciones agrícolas; ya que por medio de agua de riego o

lluvia, movimientos y trasplante de materiales en suelo contaminado; es como puede movilizarse y dar paso a su propagación. Las condiciones de suelo, no suelen ser tan rigurosas, ya que el hongo puede desarrollarse en suelos de textura fina francos y arenosos. Se multiplica en mayor medida, teniendo suelos que van de ligeramente ácidos, hacia suelos neutros; rangos entre 3.8-5.0 (Pérez Rivera, 2014).

Las especies del género *Fusarium*, ostentan la característica de ser patógenos habitantes del suelo y por lo general es a este nivel donde genera mayor parte de los daños en los sistemas de producción agrícola. Los patógenos de dicho género, ocasionan daños muy severos en las áreas radicales de diversos tipos de plantas, provocando con esto, daño en los sistemas vasculares en las plantas, los cuales son los encargados de distribuir los nutrientes esenciales para las plantas, así como también la distribución del líquido vital, como lo es el agua (Pérez Rivera, 2014).

Los síntomas de este género en particular, se caracterizan por una ligera decoloración de las venas (sistemas vasculares) de hojas jóvenes, después de lo cual ocurre epinastia de las hojas senescentes ocasionada por el colapso de los pecíolos (Pérez Rivera, 2014).

Este tipo de síntoma se origina debido a que el micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz en las plantas, colonizando con esto los vasos xilémicos, obstaculizando con esto el movimiento de los nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas. Cuando este suministro es inferior al mínimo requerido para el normal funcionamiento, los estomas se cierran, las hojas se marchitan y mueren, produciendo el colapso total y muerte de la planta (Pérez Rivera, 2014).

2.3 Ciclo de la Enfermedad

2.3.1 Suelo

El hongo sobrevive en el suelo o en rastrojos (residuos) de cultivo, principalmente en su forma de espora (clamidospora), teniendo la capacidad de sobrevivir en el suelo por un periodo de tiempo más allá de los 10 años. Es propagado a través del movimiento de suelo o rastrojos contaminados, por medio del agua, viento o las personas. Cuando las condiciones son favorables, el hongo germina y se ve favorecido por heridas causadas por otros organismos, tales como nematodos o bien por otro hongo, *Rhizoctonia spp.*,

una vez germinado, penetra las raíces por medio de estas heridas y logra avanzar a través del sistema vascular de la planta (De Leon, 1995).

2.3.2 Síntomas del hongo en la planta

En plántulas los síntomas tempranos consisten en tallos delgados y más pequeños, a cómo deberían de ser normalmente. Al momento de observar el sistema radicular de la planta, pareciera normal sin embargo, cuando se realiza un corte longitudinal del mismo, se puede observar una decoloración rojiza o anaranjada en todo el sistema vascular. Esta decoloración se extiende por toda la planta hasta la base de la misma, esto es debido a la degradación de los tejidos por la acción de enzima celulolíticas, características del hongo, lo que provoca de igual manera taponamiento del floema, acelerando con esto la marchitez de la planta y causando la muerte de las mismas (De Leon, 1995).

En plantas adultas se puede apreciar un amarillamiento progresivo en las hojas de la base hacia el ápice de la planta. En la mayor parte de las ocasiones, este amarillamiento es unilateral, lo que es decir que se logra apreciar solo de un lado de las hojas (De Leon, 1995).

2.3.3 Epidemiología

Inicialmente plantas individuales son infectadas y mueren antes de llegar a cosecha en verde. El incremento potencial del inóculo se ve producido en mayor medida por la práctica del monocultivo. A razón de esto, pequeñas áreas circulares se desarrollan y todas las plantas presentes en esta área mueren, especialmente cuando se siembran variedades susceptibles a este tipo de hongo. El grado de pérdida y de diseminación en campos individuales depende del potencial de inóculo, temperatura, cultivar y la conductividad del suelo al patógeno *Fusarium* (De Leon, 1995).

Bajo las condiciones ideales para el patógeno, las pérdidas de cultivos pueden ser severas y los campos enteros pueden llegar a perderse. Estas pérdidas usualmente ocurren en las partes maduras del área de crecimiento debido a lo elevado de la temperatura del suelo, lo cual es una de las principales características para que el patógeno se desarrolle (De Leon, 1995).



Figura 1: Sintomatología de *Fusarium* sp. En pepinos.

Fuente: Hortalan (2016).

2.4 Generalidades de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794, Rifai en 1824 hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que se utiliza hasta el presente, a pesar de las dificultades que se presentan para la identificación de especies por este método, debido a la cercanía morfológica y la evolución de las mismas. Son hongos saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento rápido. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición (Martínez, 2013).

Este género pertenece al grupo de hongos Deiteromicetes o conocidos como hongos imperfectos, al orden Hifales (moniliales) y su principal característica es la presentación de conidióforos hialinos, muchas veces blanquecinos, no verticilados, fiálides simples o en grupos, conidias hialinas, unicelulares ovoides que yacen en pequeños racimos terminales, se les reconoce fácilmente por su rápido crecimiento y el color verde de las conidias. En su estado vegetativo presentan un micelio o septos simples. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Las hifas que llevan las esporas o conidióforos son ramificadas (Santema, 2015).

Las especies de este género, en su mayoría micoparasíticas, son los antagonistas más utilizados para el control biológico de enfermedades por hongos debido a cualidades específicas, tales como; ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en varios sustratos, combate a una amplia variedad de hongos fitopatógenos responsables de la mayoría de enfermedades en cultivos de importancia, pero sobre todo porque no ataca plantas superiores (Chávez, 2006).

2.4.1 *Trichoderma* como un agente biológico

La acción de *Trichoderma* como micoparásito natural se demostró por Weindling en 1932, y su utilización en experimentos de control biológico se implementó a partir de 1970, cuando se incrementaron los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales. No obstante, la información sobre su empleo en la producción agrícola es insuficiente y dispersa (Martínez, 2013).

Las especies de *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico por más de 70 años, pero solo recientemente se han comercializado; esto es resultado del cambio que el mundo está teniendo con respecto al uso de los insumos químicos para el control de plagas y enfermedades (Chávez, 2006).

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo. Las especies del género mencionado, 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 (Santema, 2015).

Han sido considerados buenos agentes de control biológico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos en invernadero y en campo. Sin embargo la eficacia de estos hongos en suelos naturales puede estar limitada por la fungistasis del suelo, competencia por otros microorganismos del suelo, una pobre colonización de las raíces de la planta, o condiciones ambientales desfavorables (Santema, 2015).

2.4.2 Mecanismos de antagonismo

Los mecanismos de acción por medio de los cuales los antagonistas afectan a los fitopatógenos son la competencia, antibiosis, micoparasitismo e inducción de mecanismos de resistencia. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto (Santema, 2015).

Los mecanismos empleados por estos organismos para su efectivo control de las enfermedades de las plantas son varios y en su mayoría muy complejos, y su uso varía con el tipo de agente de biocontrol, patógeno y planta hospedera involucrados en la interacción. Estos mecanismos se ven influidos por factores, tales como; tipo de suelo, temperatura, pH, humedad de la planta y el ambiente del suelo (Howell, 2003).

2.4.2.1 Competencia

Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un requerimiento, ya sea el espacio o bien nutrientes, por lo que competencia puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás (Martínez, 2013).

La presencia de *Trichoderma* en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y los recursos naturales presentes en dicho medio. La forma de competencia por nutrientes por parte de mencionado organismo, es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista, se encuentran la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en “interrumpir el paso” al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Martínez, 2013).

2.4.2.2 Micoparasitismo

El micoparasitismo es esencialmente una interacción hospedero-parásito. La interacción se inicia con el reconocimiento del hospedero o de moléculas liberadas por este, esto debido a la acción enzimática del micoparásito. Tales señales pueden ser generadas por los diferentes polímeros componentes de la pared de distintas estructuras de hongos patógenos o, productos de degradación de la pared celular que son liberados durante el contacto o el acercamiento del hospedero (Chávez, 2006).

En este proceso, inicialmente el micoparásito crece directamente hacia su hospedero y usualmente se enrolla alrededor de este, o se une por medio de la formación de estructuras similares a ganchos y apresorios, los cuales permiten el anclaje. Seguido de esta interacción el micoparásito en ocasiones penetra el micelio del hospedero, esto aparentemente por la degradación de su pared celular. Para que el micoparasitismo ocurra en el suelo, las hifas del antagonista deben crecer hacia el contacto con los propágulos (esclerocios o hifas del fitopatógeno) y parasitorios (Chávez, 2006).

De este modo podemos definir que el micoparasitismo realizado por *Trichoderma* sp., el cual fue demostrado por Weindling en 1932 y 1934, es un proceso complejo que incluye una serie de eventos sucesivos. La primera señal de interacción detectable muestra un crecimiento quimiotropico de *trichoderma* en respuesta a algún estímulo en la hifa del hospedero o hacia un gradiente de químicos producidos por el mismo. Cuando el micoparásito hace contacto físico con su huésped, sus hifas se enrollan alrededor de este o se le adhieren por medio de estructuras especializadas. Como un paso posterior a estas interacciones el micoparásito penetra al micelio huésped (Chávez, 2006).

2.4.2.3 Antibiosis

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitoras fueron consideradas antibióticos (Martínez, 2013).

Se han podido identificar compuestos del tipo de las alquil-pironas (6-a-pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina). Recientemente, Vinaleet *al.* (2006) caracterizaron un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil-a-pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, koninginina, ácido heptelídico, trichoviridina, ácido harziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) obtenidos de la interacción entre *R. solani* y dos cepas comerciales (T22 Y T39) de *T. harzianum* (Martínez, 2013).

La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos, aspecto relevante desde el punto de vista práctico. Estos resultados ejemplifican la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo (Martínez, 2013).

2.4.2.4 Producción de Enzimas

Investigaciones recientes de los posibles mecanismos de acción involucrados en el control biológico realizado por las especies de *Trichoderma sp.* Han llevado a varias explicaciones alternas para un biocontrol exitoso. Una de ellas es la producción de enzimas tales como quitinasas y/o glucanasas producidas por este hongo y que pueden ser responsables de la disminución en la presencia de hongos patógenos presentes en suelos agrícolas. Estas enzimas son hidrolíticas y degradan los polisacáridos que otorgan rigidez y estructura a la pared celular de hongos, destruyendo con esto la integridad de los mismos; así mismo se ha establecido que estos hongos pueden producir proteasas que afectan las enzimas de los patógenos perturbando su capacidad de atacar las células de las plantas (Chávez, 2006).

2.4.2.5 Inducción de resistencia

Estudios recientes a niveles celular y molecular explican la diversidad de vías y mecanismos de acción de este hongo. Según Hernan, G. et al. (2004), mencionado por Martínez, B. (2006), se descubrió, que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas, conocido como Inducción de la

Resistencia Sistémica (por sus siglas en inglés IRS). Esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista (Chávez, 2006).

Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizosfera y estar relacionados con la IRS en las plantas. La primera clase son proteínas con actividad enzimática o de otro tipo. Algunas de las proteínas secretadas por *Trichoderma* al parecer inducen solo respuestas locales y necrosis, otras activan mecanismos de defensa en plantas como los productos de los genes de avirulencia (Chávez, 2006).

Cuadro 1: Especies del género *Trichoderma* empleadas en el control biológico de hongos y bacterias

ESPECIE	ANTAGONISTA FRENTE A
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Pseudomonas syringae</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Pythium sp</i>
<i>T. hamatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Sclerotinia minor</i>
	<i>Botrytis cinerea</i>
	<i>Xanthomonas vesicaria</i>
<i>T. harzianum</i>	<i>Botrytis cinérea</i>
	<i>Sclerotinia sclerotium</i>
	<i>Pseuoperonosporacubensis</i>
	<i>Sphaeroteca fusca</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Pythiumsp</i>
	<i>Bipolarisoryzae</i>
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	

Fuente: Aguilar, 2015.

2.5 Control biológico de plagas y enfermedades

Como reacción a la crisis en el manejo de plagas ocurrida durante la “revolución verde” y caracterizada por la aparición de resistencia de las plagas a los plaguicidas, la acumulación de los clorinados en el ambiente, el aumento exagerado en los costos de los plaguicidas y otra serie de factores de tipo biológico y conceptual, surgen en la década del setenta, propuestas más racionales para el manejo de las plagas en la agricultura como el Manejo Integrado de Plagas –MIP- y dentro de éste, el control biológico adquiere mayor relevancia,, como uno de los componente fundamentales y quizá, el más estratégico (Druan Ramírez, s.f.).

Como esencia del concepto, se basa en la comprensión de la manera como viven juntos los animales y las plantas (principios ecológicos), e incorpora diversos métodos de lucha natural y artificial que se combinan para reducir las plagas y enfermedades que generan daños significativos en los sistemas agrícolas.

Una combinación de estos métodos abarcaría: lucha biológica, lucha química (a base de insecticidas de origen botánico), resistencias genéticas y prácticas agronómicas.

Han sido varios los términos utilizados para referirse al concepto de control biológico, uno de estos es el de “Lucha Biológica”, la cual según el Manual de Cultivos Orgánicos y Alelopatía (2006) Consiste en el uso de enemigos naturales (parásitos, predadores y enfermedades) para atacar a las plagas. Esta práctica tiene la ventaja, entre otras, de no alterar el ecosistema y permitir un control prolongado no representa ningún problema para el agricultor ni para el consumidor y prácticamente evita la posibilidad de que los insectos desarrollen una resistencia natural como lo han hecho con los plaguicidas.

Una de las motivaciones principales para el desarrollo actual de sistemas de control biológico es la reducción de la utilización de plaguicidas químicos de síntesis. La preocupación que comienza a existir actualmente sobre la salud, seguridad y medio ambiente, y los efectos negativos de los productos químicos utilizados por la agricultura en las aguas, suelos y alimentos, requieren una disminución en el uso de dichos plaguicidas (Rubio, s.f.)

El control biológico generalmente tiene efectos más específicos que el control químico, y solo el microorganismo patógeno o la plaga clave se ve negativamente afectado, respetando a otros microorganismos beneficiosos y fauna útil (Rubio, s.f.).

2.5.1 Descripción del método y técnicas

Los factores a considerar en la implementación del control biológico son los mismos de cualquier método de control, y están relacionados con la interacción entre la densidad de la población de la plaga, el daño que causa y la producción. Sin embargo, un prerrequisito en el cual se basa enteramente un programa de control biológico es la correcta identificación de la plaga. Los demás factores son:

- El umbral económico de la plaga
- La magnitud de las pérdidas
- El valor de la cosecha (en términos monetarios, ecológicos y sociales) (Duran Ramírez, s.f.).

Para llevar a cabo un plan de control biológico, los siguientes serían los pasos fundamente en dicho proyecto:

- Definir la posición taxonómica y la importancia del organismo que se va a controlar (plaga, maleza o enfermedad)
- Colectar y evaluar toda la información disponible acerca de dicho organismo
- Si la información anterior no revela un agente de control biológico disponible, se debe seleccionar un área de exploración para iniciar un inventario de los enemigos naturales. Generalmente, esta área es un país extranjero o país de origen de la plaga
- Selección del agente benéfico y estudios bioecológicos
- Introducción y liberación de agente benéfico
- Evaluación del establecimiento (Duran Ramírez, s.f.).

Según Felipe Duran (s.f.) en su libro de Control Biológico de plagas menciona que aunque puede haber algunas innovaciones, introducidas por las recientes tecnologías de la biología molecular, el control biológico actualmente se practica mediante las siguientes técnicas o estrategias consideradas como convencionales:

Introducción: la introducción y establecimiento de un agente exótico para la regulación de la población de una plaga a largo plazo, “Control biológico clásico” (Duran Ramírez, s.f.).

Inoculación: estrategia similar a la anterior, pero que requiere de liberaciones periódicas del agente de control ya que éste no puede persistir y establecerse definitivamente (Duran Ramírez, s.f.).

Aumento: incluye liberaciones de enemigos naturales ya existentes en forma nativa en el agroecosistema y el propósito es contribuir a la acción de los agentes nativos, principalmente en determinadas épocas cuando la plaga se halla en los estados mas susceptibles (Duran Ramírez, s.f.).

Inundación: liberación de grandes cantidades de agentes de control, para controlar una sola generación de la plaga. En esta técnica no se espera que las liberaciones tengan efecto sobre las generaciones siguientes de la plaga. Esta estrategia se utiliza con los bioplaguicidas y podría considerarse similar a la del control químico (Duran Ramírez, s.f.).

2.6 Evolución y coevolución de microorganismos.

Un aspecto crucial en este tema es lo que llamamos coevolución huésped-parásito, es decir, la evolución de ambos elementos de la interacción apoyada en los mecanismos derivados de la influencia mutua entre ambos. Relacionado con este aspecto, quizás habría que fijarse en ejemplos muy conocidos de simbiosis microbio-huésped, donde ambos elementos se han adaptado a la vida común y ya no pueden vivir el uno sin el otro tras un prolongado proceso de coevolución que ha llevado a que incluso compartan mecanismos bioquímicos y moléculas (De Vicente, s.f.).

Para el caso específico de la interacción que se da en los suelos agrícolas para el control de plagas y enfermedades, podemos observar el proceso de coevolución como el parásito evoluciona en respuesta al huésped y el huésped en respuesta al patógeno. Esto indica que un organismo responderá ante la acción que el otro organismo genere en un sistema, en nuestro caso el suelo (De Vicente, s.f.).

2.7 Extracto del protocolo de Montreal

El Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono fue diseñado para reducir la producción y consumo de sustancias que agotan la capa de ozono reduciendo su abundancia en la atmosfera protegiendo así la capa de ozono de nuestro planeta, la cual a causa de la emisión de los gases de efecto invernadero, ha disminuido, provocando con esto gran daño a todo el sistema del planeta tierra. El Protocolo de Montreal original se concertó el 16 de septiembre de 1987 y entró en vigor el 1° de enero de 1989 (Secretariat, 2015).

El Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono, se mantiene como uno de los ejemplos más exitosos de cooperación internacional para hacer frente a una gran amenaza mundial para el medio ambiente. La producción y consumo de peligrosos grupos de sustancias químicas, con capacidad para agotar la capa de ozono, han sido exitosamente suprimidos en los países desarrollados. El mismo proceso está en marcha en el mundo en vías de desarrollo, en el cual Guatemala se encuentra presente, con la lucha de disminuir la emisión de agentes contaminantes que dañan el sistema del planeta tierra; es especialmente en el área agrícola, donde se hace mayor referencia para combatir el uso de agentes contaminantes, como lo es el Bromuro de Metilo (Secretariat, 2015).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Definición del problema y justificación del trabajo

El departamento de Chimaltenango se caracteriza por ser uno de los principales productores agrícolas del país, esto debido a su diversidad en cuanto a clima, suelo y otras características edafoclimáticas en las cuales se pueden desarrollar una gran diversidad de cultivos. Sin embargo se consideran cultivos de importancia, según el Agro en cifras (2014) generado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, los cultivos de Arveja china, Brócoli, Repollo y Zanahoria, siendo Chimaltenango el departamento que cuenta con la mayor área cosechada de dichos cultivos a nivel nacional.

El cultivo de arveja china presenta diferentes problemas en su producción, como lo son la incidencia de plagas y enfermedades. Los hongos del suelo son uno de los principales causantes de enfermedades en dicho cultivo, los mismos han aumentado como consecuencia del uso excesivo y continuo de fertilizantes amoniacales (tipo urea), los cuales acidifican el suelo y lo convierten en medio propicio para el crecimiento de hongos como *Fusarium* sp. De la misma manera ocurre con los cultivos de Brócoli, Repollo y Zanahoria; donde la principal causante es la marchitez de los cultivos en una fase fisiológica específica, causando con esto impacto económico a los productores.

En la actualidad existen diversos métodos utilizados para el manejo de *Fusarium*, en suelos agrícolas. El principal método que se utiliza en el área de estudio es el control químico que consiste en el uso de productos químicos sintetizados artificialmente, los cuales son capaces de controlar la enfermedad pero son altamente contaminantes para el medio ambiente y de alto costo. Estos productos principalmente son aplicados al suelo al momento de la siembra como método preventivo y de ahí su alto impacto al ecosistema edáfico. Dichos productos han desarrollado alta resistencia de los organismos y eliminación de enemigos naturales que ayudan a la mitigación del patógeno, además de no desinfectar los suelos por completo, esto debido a que *Fusarium* es un hongo capaz de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo y volver a surgir teniendo las condiciones favorables para su desarrollo. Todo lo anterior

ha obligado a técnicos y científicos investigadores a buscar alternativas de control para este problema.

Dentro de las investigaciones se ha observado que *Trichoderma*, es un hongo micoparásito agresivo que compite con patógenos de suelo. Este desarrolla su micelio alrededor de hifas de hongos patógenos desintegrando las hifas del patógeno previendo su penetración. Recientemente se ha determinado que *Trichoderma* sp. Es un agente efectivo de control biológico contra *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*. (Mora, 2001)

Guatemala por ser un país con una biodiversidad amplia, se hace evidente la presencia de *Trichoderma* y sobre todo en un entorno productivo como lo es el departamento de Chimaltenango. Sin embargo en la actualidad no existe documentación alguna que sustente la presencia, distribución y caracterización de cepas de dicho hongo, y menos aún si cuentan con el potencial de controlar plagas y enfermedades, principalmente de patógenos causantes de pudriciones como lo es *Fusarium* sp.

Por lo consiguiente, esta propuesta de investigación, planteó una prospección de *Trichoderma* y *Fusarium* con el objetivo de recolectar muestras que fueron tomadas en los principales cultivos en el departamento de Chimaltenango, con las cuales se realizaron aislamientos y caracterización morfológica de las cepas de ambos hongos, determinando así la presencia de los mismos en diferentes condiciones edafoclimáticas así como también los diferentes métodos de manejo que se realizan en dichos cultivos.

Así también, se contribuyó a la creación de un cepario de *Trichoderma* y *Fusarium*, en el cual se encontraran cepas de otras regiones del país, facilitando con esto a los productores el conocimiento de patógenos que puedan afectar en el área y una futura solución al manejo y control de los mismos, con microorganismos antagonistas.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar una prospección de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* en los cultivos de importancia del departamento de Chimaltenango, Guatemala

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de *Trichoderma* y *Fusarium*, en parcelas productoras de los cultivos de Arveja China, Brócoli, Repollo y Zanahoria.
- Obtener aislamientos de suelo y tejido de las especies de *Trichoderma* y *Fusarium*, que se encuentren en las muestras recolectadas de los sitios de interés.
- Caracterizar morfológica y físicamente las cepas de los hongos obtenidos en la prospección.

5. METODOLOGÍA

5.1 Ambiente o lugar de trabajo

Departamento de Chimaltenango, Guatemala. Se encuentra ubicado en la Región Central de la República y abarca una extensión territorial de 1,979 kilómetros cuadrados. Limita al norte con El Quiché, al sur con Escuintla, al este con Guatemala y Sacatepéquez, y al oeste con El Quiché, Sololá y Suchitepéquez.

El departamento cuenta con 16 municipios, en los cuales resaltan; El Tejar, Patzún, Patzicía, Tecpán, y su cabecera Chimaltenango, como los más importantes en cuanto a la agricultura se refiere; siendo para el objetivo de esta investigación, los puntos de referencia para realizar el muestreo de la presencia de especies de *Fusarium* y *Trichoderma*.

Dicha investigación se realizó dentro de sistemas productivos de los cultivos de Arveja China, Toamte, Chile Pimiento y Repollo por lo que se determinó realizar los muestreos respectivos en los municipios de: Patzún, Patzicía, San Juan Comalapa y Santa Cruz Balnyá por concentrar la mayoría de extensión con estos cultivos (MAGA, 2014).

5.2 Sujetos y/o unidades de investigación

Para la presente investigación fueron tomados como sujetos y/o unidades las siguientes:

- Muestras de suelo rizósferico para *Trichoderma*.
- Muestras de tejido vegetal para *Fusarium*.
- Aislamientos de los dos géneros.
- Cultivos monospóricos.

5.3 Tipo de investigación

La presente propuesta de investigación es un estudio exploratorio con un enfoque mixto (cualitativo y cuantitativo) en la prospección de *Trichoderma* y *Fusarium* en el departamento de Chimaltenango (Hernández, Fernández y Baptista, 2003).

5.4 Instrumento

Es necesario generar información sobre las muestras que se recolectarán para la investigación, por lo cual se utilizó una boleta de toma de muestreo, (Anexos, Cuadro 2).

5.5 Procedimiento

5.5.1. Fase de campo

a) Método de muestreo utilizado

Con razón a que la investigación tiene como objetivo la búsqueda de los géneros *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. El método de muestreo utilizado fue totalmente al azar.

Los aislamientos de las especies de *Fusarium* Y *Trichoderma*, fueron obtenidos de muestras de suelos rizosférico para el caso de *Trichoderma* y material vegetal con sintomatología para *Fusarium*, dichas muestras se tomaron totalmente al azar, durante el período de producción de hortalizas en el departamento de Chimaltenango, Guatemala.

Con base a los cultivos de importancia para el departamento, el muestreo se realizó en los tres municipios más importantes 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*

En cada sitio de muestreo se colectaron submuestras de 1 kg de suelo cada una, estas se homogenizaron, de tal forma que se obtuvo 1 kg como muestra representativa del sitio. Cada submuestra de suelo se tomó de los primeros 20 cm de profundidad, esto debido a que es el área donde podremos encontrar la mayor diversidad de organismos, específicamente *Trichoderma*.

Para el caso de *Fusarium*, se colectaron plantas que presentaban sintomatología, la cual se caracteriza por la marchitez parcial o total de la planta. Se recolectaron 5 submuestras por cada muestra compuesta.

Para llevar a cabo el muestreo, fue necesario el utilizar instrumentos, tales como:

- Barreno
- Pala
- Cubetas plásticas
- Tijeras jardineras

b) Transporte de muestras

Las muestras recolectadas se transportaron por medio de bolsas plásticas de 5lbs. cada una. Estas muestras fueron llevadas directamente a los laboratorios de la FCAA en la Universidad Rafael Landívar.

c) Almacenamiento de muestras

Una vez ubicadas las muestras en los laboratorios de la FCAA, se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su uso, esto previendo la descomposición de las muestras.

5.5.2. Fase de Laboratorio

a) Equipo de 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 area 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.

b) Aislamiento de hongos

El aislamiento fue realizado en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas de la Universidad Rafael Landívar de Guatemala. El método de aislamiento utilizado fue dilución en placa.

De suelo

1. En condiciones estériles (se recomienda trabajar en campana de flujo laminar), adicionar 1 g del suelo a una botella de dilución o matraz con tapa con 10 ml de agua estéril (dilución 10-2). Dispersar el suelo y homogenizar con agitación vigorosa en vórtex.
2. Tomar 1 ml y transferirlo a un tubo con 9 ml de agua estéril (dilución 10-3). De ahí se elaboran 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 cada una de las diluciones elaboradas y colocarla en el centro de la superficie del medio de cultivo PDA. Realizar esto por triplicado.
4. Extender la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersar en alcohol y realizar flameado por medio del mechero permitiendo su enfriamiento). Asegurar una distribución homogénea por toda la superficie del medio. El medio utilizado para Trichoderma fue Agar Papa Dextrosa PDA.
5. Incubar las cajas Petri que contienen la dilución a temperatura ambiente.

De tejido vegetal

1. Se seleccionaron varios cortes pequeños de 5 a 10 mm², los cuales se realizaron a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos

enfermos y tejidos al parecer sanos. Estos cortes fueron sometidos a un proceso de lavado, el cual consistió en sumergir por 1 minuto en alcohol, luego 1 minuto en agua estéril, se continuó con 2 minutos en cloro y se finalizó con dos lavados en agua estéril.

2. Posteriormente los cortes fueron secados con trozos limpios de papel estéril y se dejaron reposar por un período de tiempo de una hora.
3. Por último se colocaran sobre el medio nutritivo, de 3 a 5 cortes por caja Petri. El medio a utilizar para *Fusarium* fue Agar Papa Dextrosa. La esterilización de los cortes nos garantiza que no contengan agentes contaminantes que puedan afectar el cultivo de *Fusarium*.

c) Purificación de cepas

Posterior de realizada la siembra de las muestras obtenidas, ya sea de suelo para el caso de *Trichoderma* o de tejido vegetal para *Fusarium*, al observar crecimiento micelial, se tomó un trozo de medio que contuviera micelio, no más de 0.5 cm², el cual se trasladó a una nueva caja petri con medio de cultivo PDA y se dejó reposar en incubadora, esto con el objetivo de purificar la muestra y obtener las características requeridas para la elaboración del cultivo monospórico. Esta práctica se realizó las veces que fueron necesarias, hasta el momento de tener la muestra con las características únicas de cada uno de los géneros.

d) Caracterización morfológica

Esta etapa consistió de una descripción detallada de las cepas; como color de colonia, reversos de las colonias, textura de las colonias; así como la descripción de las estructuras de los hongos encontrados incluyendo, hifas, conidióforos, microconidias, macroconidias, fiálides, entre otras. Se midió el crecimiento micelial de los hongos como factor principal de evaluación del desarrollo de las cepas.

e) Almacenamiento de cepas

Las cepas de los hongos cultivados, fueron colocadas en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA y agua esterilizada en refrigeradora a una temperatura de 4°C lo cual garantiza que las cepas permanezcan a una temperatura donde agentes contaminantes

no puedan crecer. Los tubos fueron identificados por lugar donde se tomó la muestra y género de hongo.

5.6 Análisis de la información

Para llevar a cabo el análisis de la información, fue necesario la utilización de cuadros comparativos y un estudio estadístico descriptivo, ya que en base a estos se determinó si los géneros analizados son los de importancia para la investigación. Además esto se sustentó por medio de fotografías.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DESCRIPCIÓN DEL AMBIENTE EN FUNCIÓN DEL CULTIVO

6.1.1 Cultivo de arveja (*pisum sativum*)

El departamento de Chimaltenango es el mayor productor de Arveja China del país, dentro del mismo los municipios de Patzicía y Patzún los que cuentan con la mayor área de producción. Para fines de esta investigación, estos municipios se tomaron como referencia para realizar el muestreo correspondiente, uno de los principales factores al momento de muestrear fue el estadio del cultivo, en base a investigaciones, en los últimos días de crecimiento vegetal en la planta, donde el hongo *Fusarium* afecta.

En Patzicía fue localizado un lote productor de Arveja china (Anexo, Figura 16). El cultivo se encontraba en etapa de cosecha, presentando los síntomas característicos de *Fusarium*; amarillamiento, marchitez, necrosis en los haces vasculares, por lo tanto se tomaron a corde a la metodología, 4 submuestras totalmente al azar (Anexo, Figura 17), con el objetivo de determinar la presencia del hongo en el área. Se trasladaron a los laboratorios para su análisis en bolsas plásticas.

6.1.2 Cultivo de tomate (*solanum lycopersicum*)

El cultivo de tomate a lo largo del tiempo ha estado presente en la producción del departamento de Chimaltenango, San Juan Comalapa ha sido el principal municipio en la producción del mismo. La presencia de agentes causantes de enfermedades y en casos más graves la muerte del cultivo, siempre está presente.

La locación muestrear cuenta con la producción de tomate bajo condiciones controladas. A través de la recopilación de información por parte de los productores, un zurco presenta los síntomas característicos de *Fusarium* previo a la floración, causando la muerte de la planta. Se realizaron pruebas de campo para indagar sobre la problemática. Se tomó una de las plantas y se realizó un corte transversal en la base del tallo, al momento de realizar el corte se pudo observar necrosis en los haces vasculares de la planta, uno de los principales indicios del ataque de *Fusarium* así como también de bacteria. Para descartar la presencia de bacteria, se realizó la prueba

de flujo bacterial, colocando en un recipiente con agua un trozo del material vegetal, dando como resultado negativo a la presencia de bacteria en la planta, por lo que se determinó que el ataque era causado por *Fusarium* (Anexo, Figura 21).

6.1.3 Cultivo de chile pimiento (*Capsicum anum*)

El chile pimiento es un cultivo importante en la producción del departamento de Chimaltenango. Las extensiones producidas en el departamento son de grandes dimensiones sobre todo en Santa Cruz Balanyá, donde la producción de solanáceas es de suma importancia. Es por esta razón que fue tomado en cuenta como punto de muestreo para fines de esta investigación.

La locación para el muestreo cuenta con una producción de chile pimiento bajo condiciones controladas. La plantación se encontraba en etapa de cosecha en primer corte y se podía observar focos de plantas con presencia de síntomas característicos de *Fusarium*; marchitez, debilidad en plantas y haces vasculares con necrosis.

6.2 Determinación de la presencia de *Trichoderma* y *Fusarium* en parcelas productoras del departamento de Chimaltenango.

En base a la metodología definida para la investigación, se procede a la búsqueda de parcelas productoras que cuentan con presencia de los cultivos determinados. No obstante la presencia del hongo *Fusarium* en los cultivos Brócoli y Zanahoria fue nula, por lo que fueron sustituidos por Tomate y Chile pimiento de importancia para la región.

Cuadro 2 determinación de la presencia de *Trichoderma* y *Fusarium*.

CULTIVO	GENERO DE HONGO		UBICACIÓN
	FUSARIUM	TRICHODERMA	
ARVEJA CHINA	+	-	PATZICIA
	-	-	PATZÚN
TOMATE	+	+	COMALAPA
CHILE PIMIENTO	+	-	BALANYA
REPOLLO	-	-	PATZÚN

+ = Positivo - = Negativo

6.3 Aislamiento de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*.

Según en la metodología establecida para esta investigación, el medio de cultivo para la multiplicación de cepas del género *Fusarium* era Peptona PCNB Agar, sin embargo en base a investigaciones con resultados favorables, se realizó el cambio de medio a Agar Papa Dextrosa, utilizando una dosis de 39 gr de medio en 100 ml de agua. Este medio fue de suma importancia para la investigación, ya que permitió el crecimiento rápido de las cepas del hongo, además de generar por más tiempo el nutriente necesario para el crecimiento de micelio y esporas.

En el caso de *Trichoderma* el medio establecido en la metodología era Basal Medium el mismo fue modificado para utilizar Agar Papa Dextrosa, utilizando una dosis de 39 gr de medio en 1000 ml de agua añadiendo a esta solución 1 gramo de Streptomina quien fungió como antibiótico para prever la proliferación de agentes bacterianos en las muestras a utilizar. El periodo de vida útil de este medio permitió que el hongo pueda desarrollarse y el antibiótico realizó su trabajo permitiendo únicamente el crecimiento de la cepa y no de agentes que pudieran contaminar la muestra.

6.3.1 Cultivo de Arveja (*pisum sativum*)

Se realizó el procedimiento de lavado y secado de esquejes (Anexo, Figura 18), posteriormente se colocaron las muestras en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Anexo, Figura 19). Luego de 10 días en incubadora fue posible observar el crecimiento micelial característico de *Fusarium*. Se realizaron las purificaciones correspondientes y por medio de montajes microscópicos se determinó la presencia del hongo en las muestras (Figura 2).

La presencia del hongo en dicho lote se debe a una serie de factores que benefician el desarrollo del patógeno, siendo el principal factor a considerar la explotación del terreno para la producción del mismo cultivo por un largo período de tiempo, sin dar oportunidad de descanso al suelo contribuyendo a la práctica de monocultivo. La aplicación de productos sin dar rotación ha desarrollado resistencia del patógeno a lo mismo, por lo cual el efecto de los productos y métodos aplicados no genera los resultados que se desean.

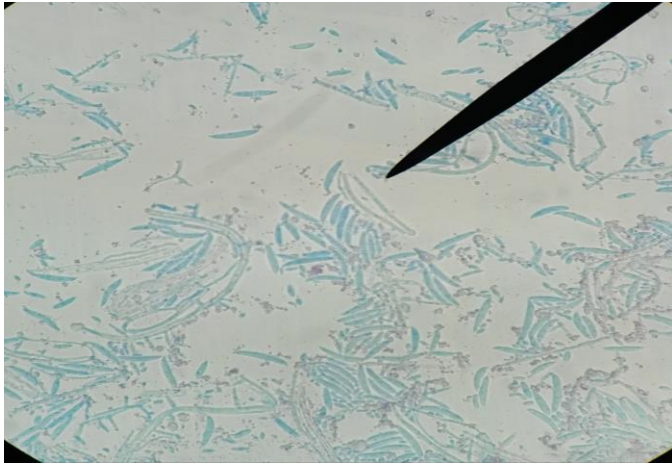


Figura 2: Cepa del género *Fusarium* cultivo de arveja china, Patzicía.

El muestreo para determinar la presencia de *Trichoderma* fue el mismo. Tomando 4 submuestras del área totalmente al azar, se homogenizó en una sola muestra aproximadamente de 1 lb. Se colocó en bolsas plásticas para su transporte. Se realizó la dilución de suelo en agua. Por cada dilución se tomaron 3 muestras colocadas en caja Petri con medio PDA y streptomina. Se dejaron reposar por 10 días a temperatura ambiente. No obstante no se obtuvieron resultados positivos. La constante aplicación de productos químicos para el control de plagas como lo es *Fusarium* no contribuye a generar un ambiente favorable para el desarrollo de agentes de control en el suelo como lo es *Trichoderma* teniendo como resultado el que la infestación por parte de agentes malignos no ceda y no permita el correcto desarrollo de cultivares.

El segundo muestreo para el cultivo de arveja, fue realizado en un lote de producción ubicado en el municipio de Patzún. El cultivo se encontraba en etapa de cosecha, presentando los síntomas característicos de *Fusarium*, se tomaron 4 submuestras totalmente al azar (Anexo, Figura 20). Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas para su traslado. Se realizó el proceso de lavado y secado de pequeñas muestras, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos para la presencia de *Fusarium* en el área, al momento de observar las muestras colocadas en las cajas Petri, se pudo observar que el daño generado en el cultivo era causado por bacterias que no permitían su correcto desarrollo. Los productores del área al no tener un estudio que les garantizara que organismo era el causante del daño, aplicaban productos químicos

para el control de *Fusarium*, al no contrarrestar el daño, solo fue generado un sistema de resistencia por parte del agente bacterial.

La presencia de agentes de control biológico como *Trichoderma* es nula en el área, debido a la resistencia que se ha desarrollado en el sistema de producción por la aplicación constante de productos químicos, inhibiendo el desarrollo de agentes que contribuyan al control de agentes fitopatógenos dañinos para la producción.

6.3.2 Cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum*)

Fueron tomadas 2 muestras totalmente al azar del zurco dañado y 2 muestras más de zurdos retirados al afectado. Las plantas fueron colocadas en bolsas plásticas para su transporte a los laboratorios. Se procedió a realizar el lavado y secado de las muestras, las cuales posteriormente fueron colocadas en medio de cultivo, se dejaron por un período de 10 días en incubadora. Transcurrido el tiempo fue posible observar el crecimiento micelial característico de *Fusarium*, por lo cual se realizaron las purificaciones correspondientes. Ya con crecimiento micelial representativo y de realizados montajes microscópicos se determinó la presencia de *Fusarium* en las muestras (Figura 3).

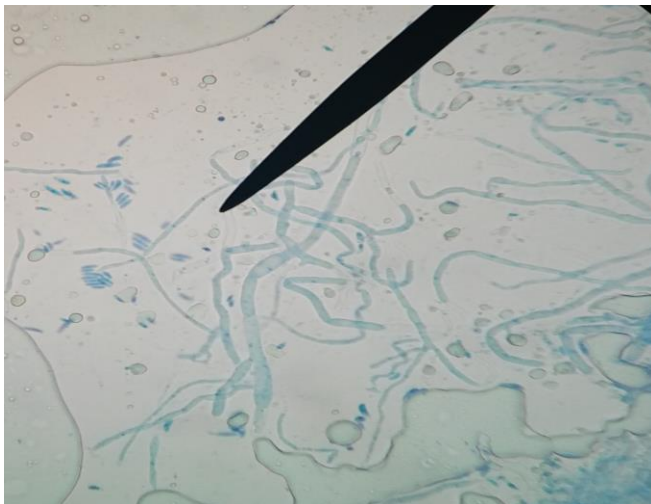


Figura 3: Cepa del género *Fusarium* cultivo de tomate, San Juan Comalapa.

La presencia del hongo en la locación se puede dar debido a la intensidad de producción que se maneja en el área, ya que no se da la rotación pertinente dentro de las áreas de producción lo que favorece al patógeno a obtener un ambiente con las

condiciones necesarias para desarrollarse. La aplicación de productos en una manera continua para el control ha generado resistencia por el patógeno ocasionando los daños en la plantación.

El muestreo de suelo en el lote fue realizado de la misma forma, tomando 4 submuestras totalmente al azar y luego homogenizando la muestra, aproximadamente 1 lb de suelo fresco. Se colocó en bolsas plásticas para su transporte a los laboratorios, es importante mencionar que los productores indicaron que están en proceso de aplicar microorganismos al suelo, con el objetivo de generar un ambiente diverso para el desarrollo de las plantas. Ya en los laboratorios se realizó la disolución, tomando 3 muestras por cada disolución, colocando 1 ml en medio de cultivo. Las cajas Petri se dejaron reposar por 10 días a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se pudo observar crecimiento de esporas características del género *Trichoderma*, por lo cual se realizaron purificaciones. Transcurrido el tiempo de espera y por medio de montajes microscópicos se determinó que existía presencia del género *Trichoderma* en las muestras (Figura 4).

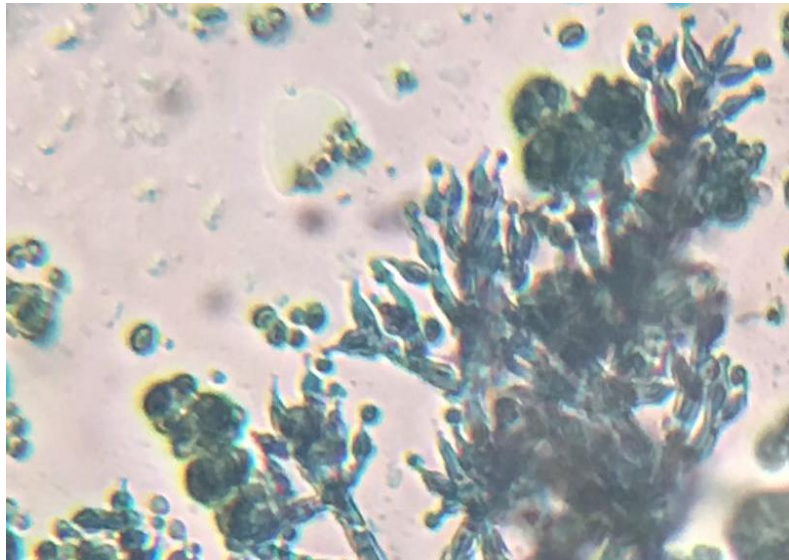


Figura 4: Cepa del género *Trichoderma* cultivo de tomate, San Juan Comalapa.

La aplicación de microorganismos por parte de los productores en el área, ha favorecido para el género *Trichoderma* se desarrolle y pueda, en un mediano plazo, llegar a contrarrestar el impacto generado por *Fusarium*. Es de suma importancia

continuar la investigación e identificar la especie de la cepa y determinar si es antagonista de *Fusarium*.

6.3.3 Cultivo de chile pimiento (*capsicum annuum*)

Fueron tomadas 4 submuestras totalmente al azar, las cuales fueron transportadas en bolsas plásticas a los laboratorios. Se procedió a realizar el proceso de lavado y secado de pequeñas muestras que posteriormente fueron colocadas en medio de cultivo, dejándolos en incubadora por un período de 10 días. Transcurridos los días, se pudo observar crecimiento micelial característico de *Fusarium* por lo cual se realizaron las purificaciones correspondientes y se dejaron nuevamente en incubadora por un período de 5 días. Por medio de montajes microscópicos se pudo determinar que el micelio generaba un resultado positivo para el género *Fusarium* (Figura 5).

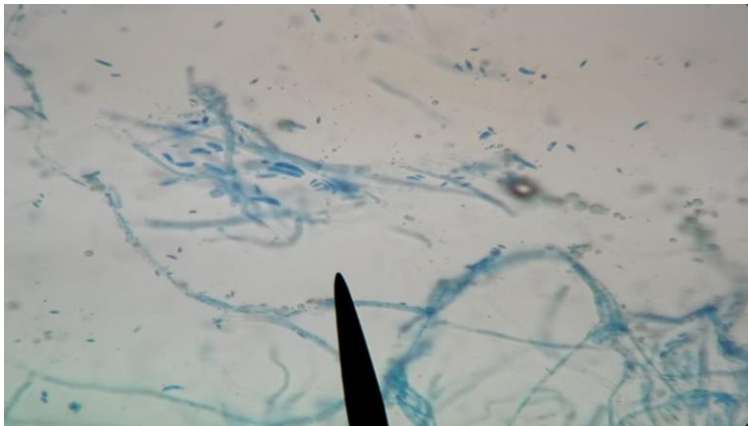


Figura 5: Cepa género *Fusarium* cultivo chile pimiento, Santa Cruz Balanya.

El mismo procedimiento de muestreo fue utilizado para las muestras de suelo, tomando 4 submuestras que se homogenizaron para obtener una muestra general aproximadamente de 1 lb de suelo. Se colocó en bolsa plástica para su traslado a los laboratorios, donde se procedió a realizar la disolución, donde por cada una se obtuvieron 3 muestras de 1 ml, se colocó y disperso en medio de cultivo PDA con antibiótico streptomycin. Las cajas Petri fueron colocadas a temperatura ambiente por 10 días. Transcurrido el período de tiempo no se obtuvieron resultados en ninguna de las muestras, por lo que se determinó que no existía presencia del género *Trichoderma* en las muestras.

6.3.4 Cultivo de repollo (*Brassica oleracea*).

Se realizó muestreo en lotes de producción en la región de Patzún, obteniendo resultados nulos para ambos géneros, únicamente se pudo observar presencia de bacteria (Figura 6).



Figura 6: Muestras del cultivo de Repollo.

6.4 Purificación de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*

Una vez con crecimiento micelial característico de los géneros fungosos en prospección, se realizaron nuevas cajas Petri con medio PDA nuevo, en las mismas se colocaron trozos de medio que contienen micelio no mayor a un milímetro cuadrado. Por cada muestra con micelio se realizaron de 3 a 5 cajas purificadas (Figura 7).

Cuadro No. 3 número de purificaciones en muestras.

CULTIVO	No. PURIFICACIONES POR GENERO	
	<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>
ARVEJA CHINA	3	X
TOMATE	4	3
CHILE PIMIENTO	4	X
REPOLLO	X	X



Figura 7: Purificaciones de cepas de *Trichoderma* y *Fusarium*.

6.4.1 Cultivo de arveja china

En la arveja china fue necesario realizar dos veces el procedimiento de purificación para posteriormente realizar montajes microscópicos y constatar la presencia de *Fusarium* en las muestras (Figura 8). En esta cepa se obtuvo un promedio de crecimiento de 1 cm por día de micelio, teniendo en cinco días la caja Petri totalmente cubierta por el mismo.

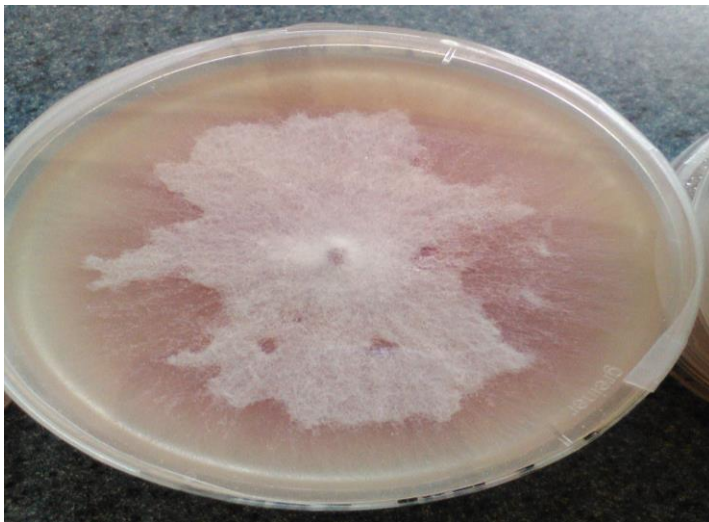


Figura 8: Purificación de cepa *Fusarium* en cultivo de arveja.

6.4.2 Cultivo de tomate

En el tomate fue necesario realizar tres veces el procedimiento de purificación para posteriormente realizar montajes microscópicos y constatar la presencia de *Fusarium*

en las muestras (Figura 9). Para esta cepa se pudo observar un promedio de crecimiento de 1.2 cm por día de micelio lo que generó que en cuatro días la caja Petri estuviera cubierta.

De igual forma para el caso de *Trichoderma* se realizó en tres veces el procedimiento de purificación para luego realizar montajes microscópicos y constatar la presencia del hongo en las muestras (Figura 10). La cepa de *Trichoderma* tuvo la característica de ser de crecimiento lento, en un promedio de 0.5 cm por día lo que ocasionó que tardara hasta 10 días en cubrir la superficie de medio que contenía la caja Petri.



Figura 9: Purificación cepa *Fusarium* en cultivo de tomate.



Figura 10: Purificación cepa *Trichoderma* en cultivo de tomate.

6.4.3 Cultivo de chile pimiento

Para el cultivo de chile pimiento fue necesario realizar tres veces el procedimiento de purificación para posteriormente realizar montajes microscópicos y constatar la presencia de *Fusarium* en las muestras (Figura 11). A comparación de las otras cepas de *Fusarium* encontradas, en este cultivo el crecimiento micelial fue lento, en promedio 0.8 cm por día, ocasionando que en cinco días la superficie de medio que contenía la caja Petri, fuera cubierta.



Figura 11: Purificación cepa *Fusarium* en cultivo de chile pimiento.

6.5 Caracterización de las cepas de *Trichoderma* y *Fusarium*

6.5.1 Caracterización de colonias

Se realizaron las observaciones de las características macroscópicas y microscópicas de las cepas identificadas a través del aislamiento y purificación de muestras, que anteriormente fueron descritas; las cuales fueron registradas fotográficamente (Figura 12).



Figura 12: Cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* caracterizadas

6.5.1.1 *Fusarium*.

Cuadro 4 Descripción macroscópica de *Fusarium*.

MEDIO			DESCRIPCCION DE COLONIAS		
AGAR (PDA)	PAPA	DEXTROSA	COLONIA 1 (PATZICIA)	COLONIA 2 (COMALAPA)	COLONIA 3 (BALANYA)
			Colonias al principio blancas posteriormente rojo intenso, con micelio algodonoso y con buena esporulación.	Colonias al principio blancas posteriormente color púrpura, micelio algodonoso y con buena esporulación.	Colonias siempre blanca con una leve coloración purpura, micelio algodonoso y con buena esporulación.

Cuadro 5 Descripción microscópica de *Fusarium*.

<i>ESTRUCTURA</i>	<i>DESCRIPCION DE COLONIAS</i>		
	COLONIA 1 (PATZICIA)	COLONIA 2 (COMALAPA)	COLONIA 3 (BALANYA)
<i>HIFAS</i>	Hialinas ramificadas	Hialinas ramificadas	Hialinas ramificadas
<i>CONIDÍOFORO</i>	Cortos, simples	Largos, simples	Cortos, simples
<i>MICROCONIDIAS</i>	Elipsoidales a cilíndricas, abundantes.	Elipsoidales a cilíndricas.	Elipsoidales a cilíndricas, abundantes.
<i>MACROCONIDIAS</i>	Abundantes, delgadas.	Abundantes, delgadas	Escasas, delgadas.

Se puede observar que existen diferencias entre las cepas encontradas, esto es un claro indicio a que pertenecen a diferentes especies de *Fusarium*, dando resultado a lo esperado, debido a que cada cepa fue muestreada en diferentes regiones, donde aspectos como clima, altitud, manejo agronómico y sobre todo el cultivo influye en el desarrollo del patógeno.

6.5.1.2 *Trichoderma*.

Cuadro 6 Descripción macroscópica de *Trichoderma*

<i>MEDIO</i>	<i>DESCRIPCION DE COLONIAS</i>
AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) + STRECTOMICINA	COLONIA 1 (COMALAPA) Colonia al principio con un tono blanco y amarillo que posteriormente paso a verde intenso, el fondo de la caja se pudo apreciar amarillo, lanosas y formación de anillos concéntricos. Esporulación abundante.

Cuadro 7 Descripción microscópica de *Trichoderma*.

ESTRUCTURA	DESCRIPCION DE COLONIAS
	COLONIA 1 (COMALAPA)
HIFAS	Hialinas, septadas hialinas.
CONIDÍOFORO	Hialinos, erguidos.
FIÁLIDES	Con la forma característica de botella ancha en la base, se presenta solitaria o en racimos.
CONIDIAS	Elipsoidales, hialinos, equinulada en racimos.

6.5.2 Caracterización del crecimiento

6.5.2.1 *Fusarium*.

A continuación se presentan estadísticas descriptivas del crecimiento medido como diámetro en centímetros, por localidad para el hongo indicado.

Cuadro No. 8 Estadística descriptiva de las cepas de *Fusarium*.

REGION	VARIABLE	N	MEDIA	D.E.	E.E.	CV	Min	Máx	P (05)	P (95)
Arv.Patz	Diámetro	25	2.20	1.44	0.29	65.67	0.10	4.30	0.20	4.20
Pim.Bal	Diámetro	25	1.92	1.16	0.23	60.27	0.20	3.60	0.30	3.60
Tom.SJC	Diámetro	25	2.64	1.73	0.35	65.64	0.20	5.10	0.20	5.10

El cuadro No. 8 nos demuestra el comportamiento de crecimiento de las cepas de *Fusarium* identificadas en la investigación, clasificadas por la región de donde fueron tomadas. La variable que se tomó como referencia fue el diámetro en cm de las cepas, el cual tuvo diferencia significativa para cada una, teniendo un promedio aproximado de crecimiento de las tres cepas de 2.5 cm. Siendo la cepa de mayor diferencia en crecimiento la que se tomó en Santa Cruz Balanya, la causa de esto puede ser por varias razones, tomando como principal la especie de la cepa, la cual puede ser diferente a las dos cepas restantes.

En promedio para las tres cepas se pudo obtener un mínimo de crecimiento de 0.20 cm y un máximo en su crecimiento de 5 cm. Con una velocidad rápida de crecimiento,

conforme a la duración en días, ya que cada una de las cepas no tardó más de 5 días en cubrir la superficie de medio de cultivo contenido en cajas Petri. En cuanto a la desviación estándar se refiere no hubo mayor diferencia entre las cepas, el comportamiento fue lineal el cual se puede observar en la Figura 13, donde se presenta el gráfico del comportamiento de las cepas en su crecimiento, tomando en cuenta como variables el diámetro en cm (eje y) contra el tiempo de crecimiento en días (eje x).

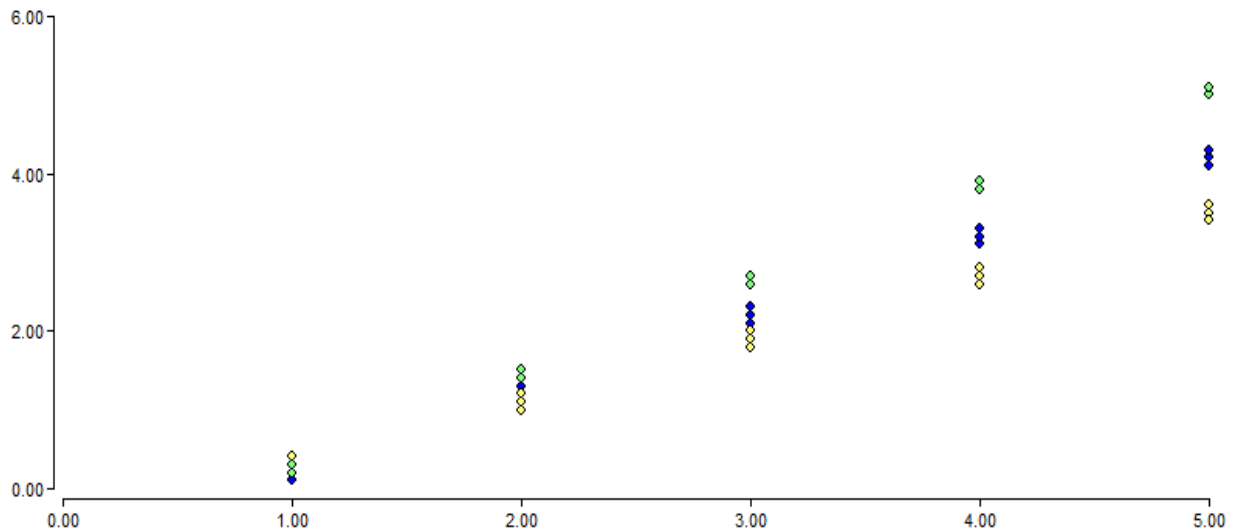


Figura 13: Diagrama de dispersión, del crecimiento de las cepas de *Fusarium*. Diámetro (cm) por los días de crecimiento.

En la Figura 13 podemos observar el crecimiento de cada una de las cepas identificadas para *Fusarium* en la investigación, siendo identificadas con azul la cepa de Patzicía, amarillo para la cepa de Santa Cruz Balanya y verde para la cepa de San Juan Comalapa. Con dicha gráfica podemos constatar la poca diferencia significativa que existe entre las cepas.

6.5.2.2 *Trichoderma*

Al igual que para *Fusarium* la variable a tomar en cuenta para el análisis de la cepa de *Trichoderma* fue el crecimiento en cm por el tiempo en días.

Cuadro 9 Estadística descriptiva para la cepa de *Trichoderma*.

Muestra	Variable	N	Tendencia	D.E.	E.E	CV	Min	Máx	P (05)	P (95)
1	Cm	10	2.65	1.47	0.46	55.35	0.50	4.90	0.50	4.90
2	Cm	10	2.63	1.52	0.48	57.64	0.40	4.80	0.40	4.80
3	Cm	10	2.57	1.53	0.48	59.55	0.30	4.80	0.30	4.80
4	Cm	10	2.68	1.46	0.46	54.58	0.50	4.90	0.50	4.90
5	cm	10	2.67	1.53	0.49	57.46	0.40	5.00	0.40	5.00

En el cuadro 9 se pueden observar la estadística descriptiva y comportamiento de la cepa, teniendo una tendencia de crecimiento de 2.60 cm con una desviación estándar poco considerable no siendo mayor a 1.6 en cada una de las muestras.

Para la cepa de *Trichoderma* identificada se obtuvo un promedio de crecimiento mínimo de 0.40 cm y un promedio de crecimiento máximo de 5.00 cm. Dicha cepa muestra una tendencia de crecimiento similar a la de *Fusarium* sin embargo el tiempo que llevo para su crecimiento es mayor comparado entre sí. La principal razón por la cual sucedió esto, es debido a que las muestras de la cepa de *Trichoderma* no fue colocada en incubadora para su crecimiento, por lo tanto al estar expuesta a la luz natural, hace que el crecimiento del hongo sea lento comparado con respecto a la velocidad de crecimiento de las cepas de *Fusarium*.

La Figura 14, presenta el crecimiento de la cepa en una curva, teniendo el diámetro en cm (eje y) contra el tiempo en días (eje x), se muestra un crecimiento lineal durante los 10 días, donde no se refleja alguna diferencia significativa en el crecimiento de la cepa. Al ser una cepa identificada se muestra una curva con las 5 repeticiones elaboradas.

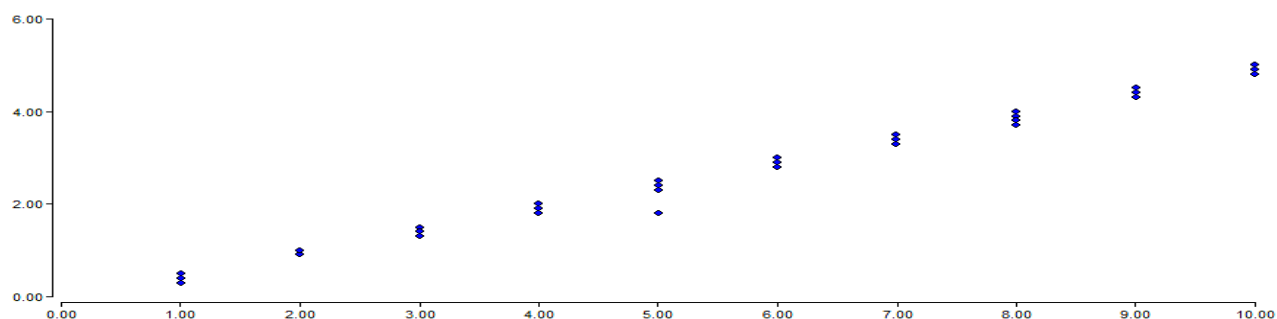


Figura 14: Diagrama de dispersión del crecimiento de la cepa de *Trichoderma*. Diámetro (cm) por los días de crecimiento. Esto no puede ser un factor que limite el potencial biológico que tiene *Trichoderma* como controlador biológico de *Fusarium*. Ya que se pueden realizar modificaciones en el método de aplicación del organismo antagonista (*Trichoderma*), con el objetivo que pueda colonizar el suelo tiempo antes que *Fusarium* lo pueda hacer.

Cuadro 10 Área bajo la curva *Fusarium* y *Trichoderma*.

Área bajo la curva

Organismo	Método trapecio	Método Simpson
Fusarium Arv.Patz	56.25	52.83
Fusarium Tom.SJC	64.75	60.5
Fusarium Pim.Bal	47.25	44.16
Trichoderma SJC.	18.70	19.37

En el Cuadro 10, se presenta un análisis de las áreas bajo la curva para el tiempo de saturación tanto de *Fusarium* como de *Trichoderma*, utilizando dos métodos de análisis, el método Trapecio y el método Simpson. Donde existe mayor saturación por parte de *Fusarium* en un período más corto de tiempo en comparación de *Trichoderma* que refleja menor saturación en un período más largo.

Nótese la diferencia en la intensidad en el crecimiento de *Trichoderma* en comparación a *Fusarium*, éste indicador orienta sobre las medidas a tomar para favorecer su uso como controlador biológico, como darle más tiempo de acción antes de la siembra u otras en la misma lógica.

6.6 Conservación de las cepas de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*.

Luego de realizar las evaluaciones correspondientes a las conservaciones realizadas en dicha investigación, se procedió a conservar las cepas identificadas. Para dicha conservación se realizaron dos procedimientos, que en base a investigaciones realizadas, son las dos principales fuentes de conservación de hongos, obteniendo resultados favorables en un periodo de 2 a 3 años; estos procedimientos fueron: conservación en agua estéril y conservación en medio PDA.

En la conservación fueron utilizados tubos viales de 5.3 cm de longitud por 1.1 cm de diámetro con tapa de rosca, los cuales fueron colocados en autoclave para su respectiva esterilización y posterior uso.

6.6.1 Conservación en agua estéril

Por cada una de las cepas identificadas se tomaron tres tubos anteriormente descritos, los cuales se encontraban en condiciones de esterilidad, con la ayuda de un embudo estéril, se procedió a colocar 2 ml de agua estéril en cada uno de los tubos; este procedimiento fue realizado en cámara de flujo para tener un ambiente controlado libre de cualquier agente contaminante. Con los tubos ya conteniendo agua estéril, se procedió a tomar muestras de micelio en las cepas no mayor a 2 milímetros de área, estos trozos fueron colocados en los tubos por medio de pinzas esterilizadas. Seguidamente se rotularon y se colocaron en refrigeradora. El agua estéril garantiza un ambiente sin contaminación para las cepas de los hongos, garantizando que el hongo permanezca puro en un rango de 1 a 2 años, lo cual permite el continuar la investigación para determinar la especie si fuese necesario.

6.6.2 Conservación en medio Agar Papa Dextrosa (PDA)

De igual manera por cada una de las cepas se tomaron tres tubos, los cuales se encontraban en condiciones de esterilidad, con la ayuda de un embudo de vidrio estéril, se procedió a colocar 2 ml de medio PDA en cada uno de los tubos; se dejaron reposar en inclinación para que el medio cubriría la mayor parte del tubo. Posteriormente se tomó un trozo no mayor a 2 milímetros de las cepas identificadas y con la ayuda de pinzas desinfectadas se colocó en el interior de los tubos con medio. Seguidamente se

rotularon y se colocaron en refrigeradora. La conservación de las cepas en un medio de crecimiento garantiza que las mismas puedan estar nutridas en un periodo de tiempo máximo de 1 año, transcurrido el tiempo es necesario renovar el medio para garantizar la pureza de los hongos.



Figura 15: Cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* conservadas en medio PDA y Agua estéril.

7. CONCLUSIONES

Se determinó la presencia del agente *Fusarium* en las muestras recolectadas en los sitios de interés.

Se logró un diagnóstico certero de los 2 géneros dispuestos para la investigación y se observó que la intensidad de *fusarium* supera a la de *Trichoderma* en función del tiempo.

Se pudieron purificar y aislar las especies de *Fusarium* y *Trichoderma*, garantizando la presencia de las mismas en las áreas destinadas.

Se caracterizaron las cepas de *Fusarium* y *Trichoderma* microscópica y macroscópicamente y se determinó la media de crecimiento en centímetros por día de cada una de las muestras.

Se realizó la entrega de un cepario a los laboratorios de la Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, como base para futuras investigaciones.

8. RECOMENDACIONES

En base al factor de crecimiento, donde *Trichoderma* se ve superado por *Fusarium* en función del tiempo, se recomienda hacer la aplicación de *Trichoderma* como medida preventiva en campo de producción previo al establecimiento de un cultivo.

Se recomienda en este estudio determinar las especies de las cepas aisladas.

Se recomienda hacer una evaluación de patogenicidad/antagonismo de las cepas identificadas de *Trichoderma* para constatar su uso efectivo en un control biológico.

9. BIBLIOGRAFÍA

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>

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

De Leon, A. L. (1995). *Determinacion 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>

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

Howell, C. (2003). Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of curren concepts. *Plant disease* , 4-10.

Martínez, B. I. (2013). trichoderma spp. y su funcion en el control de plagas en los cultivos. *Revista de proteccion vegetal* , 20.

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.

- 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 biològic de Fusarium spp. en Berenjena utilitzando Trichoderma Harzianum y Bacillus subtilis; Ocòs, San Marcos*. Guatemala: Universidad Rafael Landívar.
- Satema, B. (2015). *Control biologico de Fusarium spp. en berenjena utilitzando Trichoderma harzianum y Bacillus subtilis; Ocòs, San Marcos*. Guatemala: Universidad Rafael Landívar.
- 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-capa-de-ozono/2>
- Tapia, C., & Amaro, J. (31 de enero de 2014). *Retrato microbiològic*. Recuperado el 26 de enero de 2015, de Retrato microbiologico: www.sochinf.cl

10. ANEXOS

Cuadro 2: Cronograma de actividades.

MESES	MES 1				MES 2				MES 3			
SEMANAS	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
ACTIVIDADES												
MUESTREO DE ESPECIES.	X	X										
AISLAMIENTO DE LAS MUESTRAS.			X	X	X							
PURIFICACION.			x	x	x	X	X	X	X	x	x	
CARACTERIZACION DE LOS HONGOS.										X	X	
REDACCION DE RESULTADOS.												X



Figura 16: Plantación de arveja china en Patzicía.



Figura 17: Muestras recolectadas del cultivo de arveja china.



Figura 18: Lavado y secado de esquejes.



Figura 19: Siembra de esquejes en cajas Petri.



Figura 20: Segundo lote muestreado para el cultivo de Arveja china.



Figura 21: Muestras del cultivo de tomate, necrosidad en los haces vasculares.



Figura 22: Muestras de suelo.



Figura 23: Preparación de medio de cultivo PDA.

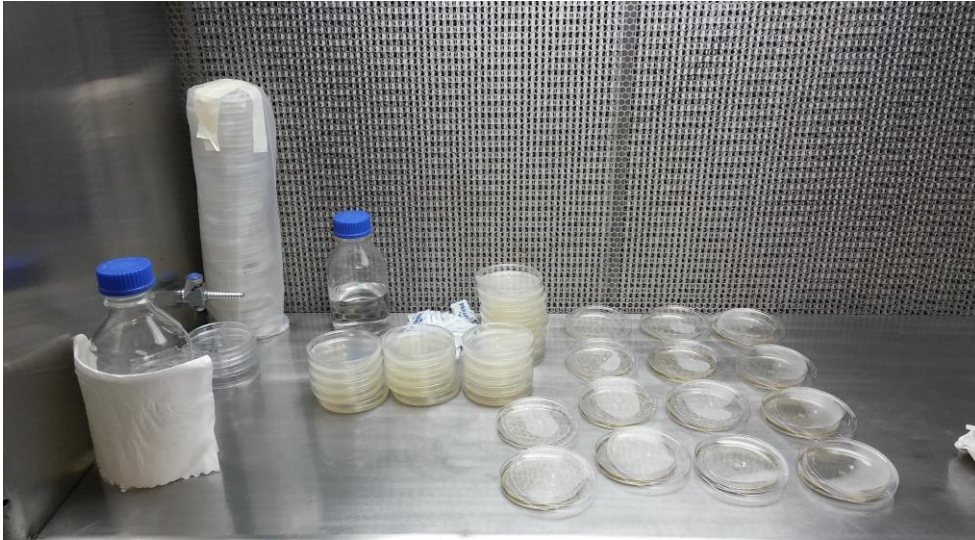


Figura 24: Llenado de cajas Petri con medio de cultivo PDA.



Figura 25: Esquejes sembrados en medio de cultivo PDA.

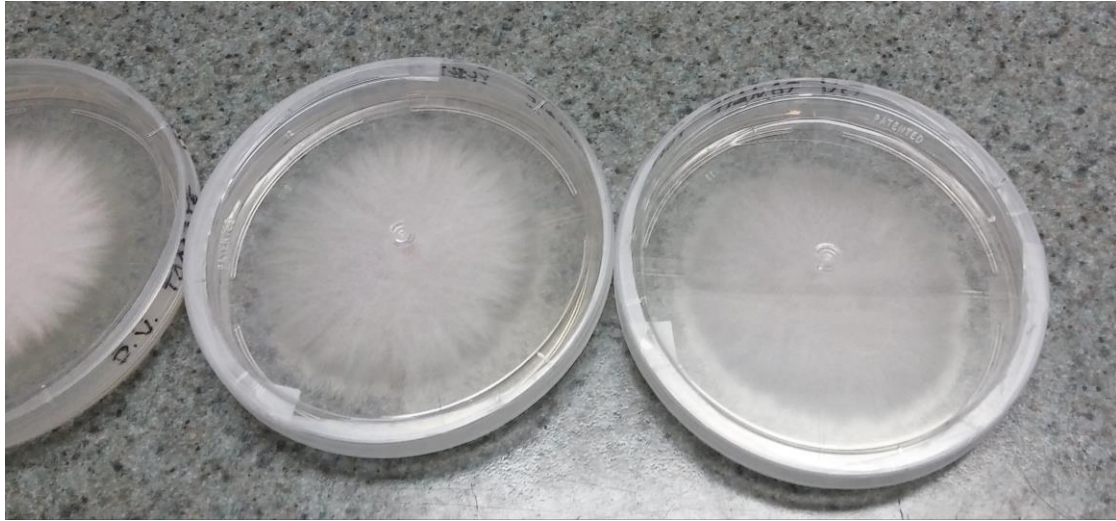


Figura 26: Purificaciones de cepas del género *Fusarium*.



Figura 27: cepas de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*, identificadas.



Figura 28: Conservación de cepa del género *Trichoderma* en agua estéril y medio PDA.
Localización: San Juan Comalapa.



Figura 29: Conservación de cepa del género *Fusarium* en agua estéril y medio PDA.
Localización: San Juan Comalapa.



Figura 30: Conservación de cepa del género *Fusarium* en agua estéril y medio PDA.
Localización: Santa Cruz Balanya.



Figura 31: Conservación de cepa del género *Fusarium* en agua estéril y medio PDA.
Localización: Patzicía.

Guatemala de la Asunción 3 de marzo del 2017

Laboratorios

Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas.

Universidad Rafael Landívar.

Estimados,

Les saludo cordialmente deseándole el mejor de los éxitos en sus labores diarias.

Por medio de la presente se hace entrega oficial de las cepas de los patógenos *Trichoderma* y *Fusarium*, las cuales fueron identificadas en el trabajo de tesis titulado: PROSPECCIÓN DE ESPECIES DE *TRICHODERMA* Y *FUSARIUM* EN EL DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO, GUATEMALA. Realizada por DAVID ESTUARDO VALDÉS SALAN, en el presente año.

Esto con el objetivo que las mismas sean objeto de análisis para futuros profesionales en las ciencias agrícolas.

Agradeciendo su apoyo y atención.

Att.

David Valdés

1247712

David Valdés
01-03-2017
UNIVERSIDAD RAFAEL LANDIVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN

Figura 32: Entrega de cepario a los Laboratorios de la FCAA.