



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

CARRERA INGENIERIA FORESTAL

**EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO Y DEL POTENCIAL DE
CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS ENDÓFITOS OBTENIDOS
DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS FRENTE A *Fusarium
circinatum*.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTORA

KATTIA LISBETH ROJAS GAVIRIA

Riobamba- Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

CARRERA INGENIERIA FORESTAL

**EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO Y DEL POTENCIAL DE
CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS ENDÓFITOS OBTENIDOS
DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS FRENTE A *Fusarium
circinatum*.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTORA: KATTIA LISBETH ROJAS GAVIRIA

DIRECTOR: Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO Ph.D.

Riobamba- Ecuador

2022

©2022, Kattia Lisbeth Rojas Gaviria

Se autoriza la reproducción total o parcial con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho De Autor.

Yo, Kattia Lisbeth Rojas Gaviria, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

Riobamba 11 de abril de 2022



Kattia Lisbeth Rojas Gaviria

2100836929

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA INGENIERIA FORESTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: el Trabajo de Integración Curricular: Tipo Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO Y DEL POTENCIAL DE CONTROL BIOLÓGICO DE HONGOS ENDÓFITOS OBTENIDOS DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS FRENTE A *Fusarium circinatum***, realizado por la señorita **KATTIA LISBETH ROJAS GAVIRIA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros de Tribunal del Trabajo De Integración Curricular el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Miguel Ángel Guallpa Calva MSc.

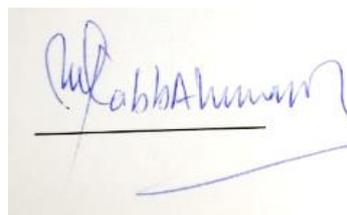
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



2022-04-11

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph.D.

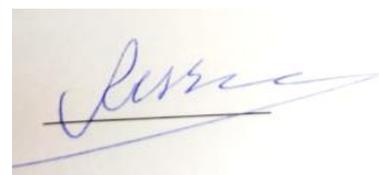
**DIRECTOR DEL TRABAJO
INTEGRACION CURRICULAR**



2022-04-11

Ing. Rosa Del Pilar Castro Gómez Ph.D

MIEMBRO DE TRIBUNAL



2022-04-11

DEDICATORIA

El presente trabajo de integración curricular está dedicado en primer lugar a Dios por permitirme tener vida y salud para poder realizar este proyecto y poder culminar mi carrera universitaria.

A mi madre, mi motor, que con su amor incondicional me ha ayudado a continuar en los momentos más difíciles y me ha brindado su apoyo en todo momento, por ser una madre ejemplar y sabia en sus consejos y por el sacrificio que hace día a día por sus hijas.

A mi padre que fue un pilar fundamental en mi vida y aunque no esté físicamente me dio las fuerzas para continuar mis estudios, sé que desde el cielo este logro es tan especial para ti como lo es para mí. A mis hermanas y familiares por estar presentes en todo momento, por el cariño y apoyo en esta etapa. A mí por ser perseverante y no rendirme ante las dificultades, por cada día lejos de la familia y adaptarme a un nuevo estilo de vida. A todas las personas, familiares y amigos que hicieron posible esta meta, por sus palabras de ánimo, momentos de felicidad y de tristeza durante este proceso, los llevo en el corazón y les dedico este trabajo con mucho cariño.

Kattia

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme disfrutar de la vida, por la salud y darme las fuerzas para desarrollar este trabajo.

A mis padres y hermanas y familiares por ser ese pilar fundamental en mi vida, por el constante apoyo y amor que me brindaron durante todo este proceso, por los valores que me inculcaron y por darme ánimos a nunca rendirme y cumplir mis metas.

A mi tribunal Dr. Pablo Álvarez(Director) e Ing. Hugo Rodríguez (Miembro) por permitirme realizar este trabajo dentro de su proyecto de investigación y por su constante orientación y paciencia en el desarrollo de este trabajo de integración curricular. Al Ing. Juan Guerra por su incondicional apoyo y excelente dirección en la fase de laboratorio y campo ,al Ing. Álvaro Rivero, técnico del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales y a la empresa Aglomerados Cotopaxi por la donación de las plantas de *Pinus radiata* y *Pinus patula* que fueron fundamentales en el ensayo de vivero. A los docentes de la carrera de Ingeniería Forestal por haber compartido sus conocimientos, en especial a aquellos que llevaban consigo la vocación de docentes y por inculcarnos amor y la importancia de la carrera.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme desarrollar este proyecto en sus instalaciones y enriquecerme de conocimientos durante toda la carrera universitaria.

Kattia

TABLA DE CONTENIDO

INDICDE TABLAS.....	viii
INDICEDE GRAFICOS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY/ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I

1.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1.	Información de <i>Fusarium circinatum</i>.....	4
1.1.1	<i>Taxonomía</i>.....	4
1.1.1.	<i>Importancia</i>.....	4
1.1.2.	<i>Sintomatología de <i>Fusarium circinatum</i></i>.....	5
1.1.4.	<i>Destrucciones relacionadas al Pino</i>.....	6
1.1.5.	<i>Métodos de control</i>.....	6
1.1.5.1.	<i>Prácticas culturales</i>.....	6
1.1.5.2.	<i>Control biológico por medio de hongos endófitos</i>.....	7
1.2.	Información de hongos endófitos.....	7
1.1.1.	<i>Características de hongos endófitos</i>.....	7
1.1.2.	<i>Importancia</i>.....	8
1.3.	Antagonismo.....	9

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLOGICO.....	10
2.1.	Materiales y métodos.....	10
2.1.1.	<i>Características del lugar</i>.....	10
2.1.1.1.	<i>Localización</i>.....	11
2.1.1.2.	<i>Ubicación</i>.....	11
2.1.1.3	<i>Características del clima</i>.....	11
2.1.2.	<i>Materiales y equipos</i>.....	11
2.1.2.1.	<i>Materiales de laboratorio</i>.....	11

2.1.2.2.	<i>Equipos de laboratorio</i>	12
2.1.2.3.	<i>Reactivos e insumos</i>	12
2.1.2.4.	<i>Material biológico</i>	13
2.1.2.5.	<i>Materiales y equipos de oficina</i>	13
2.2.	Metodología	13
2.2.1.	Fase de laboratorio	13
2.2.1.1.	<i>Reactivación de cepas</i>	13
2.2.1.2.	<i>Cultivo dual</i>	14
2.2.1.3.	<i>Preparación de inóculo para el experimento en vivero</i>	14
2.2.2.	Fase de vivero	15
2.2.2.1.	<i>Preparación del área</i>	15
2.2.2.2.	<i>Especificación de campo experimental P. radiata</i>	16
2.2.2.3.	<i>Especificación de campo experimental P. patula</i>	16
2.2.2.4.	<i>Descripción de los tratamientos</i>	17
2.2.2.5.	<i>Riego</i>	18
2.2.2.6.	<i>Inoculación de plantas de Pino con F. circinatum</i>	18
2.2.2.7.	<i>Inoculación de los hongos antagonistas endófitos</i>	18
2.2.3.	Variables evaluadas	18
2.2.3.9.	<i>Aislamiento del hongo patógeno inoculado</i>	19
2.2.3.10.	<i>Análisis de datos</i>	20

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1.	Crecimiento micelial de los cultivos duales	21
3.2.	Alturas totales a los 15, 30 y 45 días	25
3.3.	Tamaño de la raíz	29
3.4.	Peso fresco de la planta	32
3.5.	Peso seco de la raíz	34
3.6.	Peso seco del tallo	36
3.7.	Incidencia	38

CONCLUSIONES	44
--------------	-------	----

RECOMENDACIONES	45
-----------------	-------	----

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Descripción taxonómica de <i>Fusarium circinatum</i>	4
Tabla 2-2:	Información de aislados de hongos endófitos utilizados en las confrontaciones...	12
Tabla 3-2:	Información de aislados del hongo patógeno utilizado en las confrontaciones....	13
Tabla 4-2:	Concentración inicial de los hongos antagonistas (propágulos/ mL).....	15
Tabla 5-2:	Concentración inicial hongo patógeno. (propágulos /mL).....	15
Tabla 6-2:	Volumen inicial de hongos antagonistas y hongo patógeno (mL).....	15
Tabla 7-2:	Descripción de los tratamientos para <i>P. patula</i>	17
Tabla 8-2:	Descripción de los tratamientos para <i>P. radiata</i>	17
Tabla 9-3:	Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial de los aislados relacionados con <i>P. radiata</i>	22
Tabla 10-3:	Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial de los aislados relacionados con <i>P. patula</i>	22
Tabla 11-3:	Prueba de Tukey al 5% para la tasa de crecimiento micelial de las diferentes confrontaciones relacionados con <i>P. patula</i>	24
Tabla 12-3:	Prueba de Tukey al 5% para crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. en <i>P.</i> <i>radiata</i>	24
Tabla 13-3:	Prueba de Tukey al 5% para el análisis de las alturas en <i>P. patula</i>	27
Tabla 14-3:	Prueba de Tukey al 5% para el análisis de la altura en <i>P. radiata</i>	28
Tabla 15-3:	Prueba de Tukey al 5% para el tamaño de la raíz en <i>P. patula</i>	30
Tabla 16-3:	Prueba de Tukey al 5% para longitud de la raíz en <i>P. radiata</i>	31
Tabla 17-3:	Prueba de Tukey al 5% para el peso fresco de la planta en <i>P. patula</i>	33
Tabla 18-3:	Prueba de Tukey al 5% del peso fresco de la planta en <i>P. radiata</i>	33
Tabla 19-3:	Prueba de Tukey al 5% del peso seco de la raíz de <i>P. patula</i>	35
Tabla 20-3:	Prueba de Tukey al 5% para el peso seco de la raíz de <i>P. radiata</i>	35
Tabla 21-3:	Prueba de Tukey al 5% del peso seco del tallo en <i>P. patula</i>	37
Tabla 22-3:	Prueba Tukey al 5% del peso seco del tallo de <i>P. radiata</i>	37
Tabla 23-3:	Prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de incidencia en <i>P. patula</i>	39
Tabla 24-3:	Prueba de Tukey al 5% del porcentaje de incidencia de <i>P. radiata</i>	40

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1-3:	Diagrama de caja y bigote de la tasa de crecimiento micelial de las confrontaciones de <i>Trichoderma</i> vs <i>F. circinatum</i> en A <i>P. radiata</i> y B <i>P. patula</i>	21
Gráfico 2-3:	Diagrama de caja y bigote de la tasa de crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. frente a <i>F. circinatum</i> en A <i>P. patula</i> y B <i>P. radiata</i>	23
Gráfico 3-3:	Diagrama de caja y bigote para la variable altura a los 15, 30 y 45 de las plantas de pino inoculadas con los diferentes tratamientos A <i>P. patula</i> y B <i>P. radiata</i>	25
Gráfico 4-3:	Diagrama de caja y bigote para el tamaño de la raíz en <i>P. patula</i> A y <i>P. radiata</i> B inoculadas con los diferentes tratamientos.....	29
Gráfico 5-3:	Diagrama de caja y bigote para el Peso fresco de las plántula A <i>P. patula</i> y B <i>P. radiata</i> inoculadas con los diferentes tratamientos.....	32
Gráfico 6-3:	Diagrama de caja y bigote del peso seco de la raíz de A <i>P. patula</i> y B <i>P. radiata</i> inoculadas con los diferentes tratamientos.....	34
Gráfico 7-3:	Diagrama de caja y bigote del peso seco del tallo de A <i>P. patula</i> y B <i>P. radiata</i> inoculadas con los diferentes tratamientos.....	36
Gráfico 8-3:	Diagrama de caja y bigote del porcentaje de incidencia a los 15, 30 y 45 días después de inocular <i>F. circinatum</i> en <i>P. patula</i> A y <i>P. radiata</i> B	38
Gráfico 9-3:	Curva del progreso de la enfermedad para la variable incidencia de <i>F. circinatum</i> en <i>P. patula</i> A y <i>P. radiata</i> B	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-2:	Ubicación del vivero de la facultad de recursos naturales en la ESPOCH.	10
Figura 2-2:	Distribución de los tratamientos en <i>Pinus patula</i>	16
Figura 3-2:	Distribución de los tratamientos en <i>Pinus radiata</i>	17

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** LABORES REALIZADAS EN LA FASE DE LABORATORIO.
- ANEXO B:** SIEMBRA DUAL DE HONGOS ENDOFITOS FRENTE A *F.circinatum*
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE INÓCULO
- ANEXO D:** LABORES REALIZADAS EN VIVERO
- ANEXO E:** REACCIÓN A LA INOCULACIÓN
- ANEXO F:** TOMA DE DATOS DEL PESO DE LA PLANTULA Y DE LA RAIZ
- ANEXO G:** REAISLAMIENTO DE RAÍZ INFECTADAS CON *Fusarium circinatum*
- ANEXO H:** ANALISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Trichoderma* EN *P. radiata*
- ANEXO I:** ANALISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Trichoderma* EN *P. patula*
- ANEXO J:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Colletotrichum* EN *P. patula*
- ANEXO K:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Colletotrichum* EN *P.radiata*
- ANEXO L:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA EN *P. patula*
- ANEXO M:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA EN *P. radiata*
- ANEXO N:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL TAMAÑO DE LA RAIZ EN *P. patula*
- ANEXO O:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL TAMAÑO DE LA RAIZ EN *P. radiata*
- ANEXO P:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO FRESCO DE LA PLANTA EN *P. patula*
- ANEXO Q:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO FRESCO DE LA PLANTA EN *P. radiata*
- ANEXO R:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DE LA RAIZ en *P. patula*
- ANEXO S:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DE LA RAIZ en *P. radiata*
- ANEXO T:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DEL TALLO en *P. patula*
- ANEXO U:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DEL TALLO en *P. radiata*
- ANEXO V:** ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA EN *P. patula*
- ANEXO W:** ANÁLISIS DE VARIANZA DL PORCENTAJE DE INCIDENCIA EN *P. radiata*

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el antagonismo y el potencial de control biológico de hongos endófitos de especies forestales nativas frente a *Fusarium circinatum*, para lo cual se utilizaron hongos endófitos preservados anteriormente por el método Castellani, esta investigación tuvo dos fases, una de laboratorio que consistió en reactivar los hongos antagonistas y patógenos para obtener colonias puras, para proceder a realizar confrontaciones entre ambos. Se estudiaron 7 cepas de hongos endófitos y dos cepas de *F. circinatum* cada 24 horas se realizó la medición del crecimiento micelial con ayuda de un calibrador digital tanto del hongo patógeno como del antagonista. Se recopiló la información de la tasa de crecimiento micelial y se escogieron los hongos según el porcentaje de inhibición. En vivero se utilizaron plantas de *P. radiata* de 2 meses y plantas de *P. patula* de 1 mes, para realizar el ensayo con las cepas seleccionadas se utilizaron 576 plantas con los tratamientos H329, P1R1R3, M3, M5, *F. circinatum* y dos tratamientos de control. Con el método de inoculación a los treinta días empezó el marchitamiento de las plantas inoculadas con *F. circinatum*, el tratamiento con mayor incidencia en *P. radiata* fue T1 con el 100% de incidencia y el de menor incidencia fue de T8 con 0%, concluyendo que los tratamientos *in vitro* presentaron antagonismo, pero en pruebas *in vivo* no presentaron resultados prometedores por ello se recomienda evaluar el efecto de los hongos endófitos utilizados en este estudio con otros patógenos de especies forestales.

Palabras claves: <ENDOFITOS>, <CONTROL BIOLÓGICO>, <CONÍFERAS>, <DAMPING-OFF>, <*Fusarium circinatum*>



DBRA
Dr. Cristian Castillo



0808-DBRA-UTP-2022

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the antagonism and biological control potential of endophytic fungi of native forest species against *Fusarium circinatum*, for which endophytic fungi previously preserved by the Castellani method were used, this research had two phases, a laboratory phase which consisted on reactivating the antagonistic and pathogenic fungi to obtain pure colonies, yto carry out confrontations between the two. Seven strains of endophytic fungi and two strains of *F. circinatum*were studied and mycelial growth was measured every 24 hours with a digital calibrator aid, for both, the pathogenic fungus and the antagonist. The mycelial growth rate information was collected and the fungi were chosen according to the percentage of inhibition. In the nursery, 2- month-old *P. radiata* plants and 1-month-old *P. patula* plants were used to carry out the test with the selected strains, 576 plants were used with the treatments H329, P1R1R3, M3, M5, *F. circinatum*and two control treatments. With the inoculation method, after thirty days the wilting of the plants inoculated with *F. circinatum*began, the treatment with the highest incidence in *P. radiata* was T1 with 100% incidence and the lowest incidence was T8 with 0%, concluding that the in vitro treatments showed antagonism, but in vivo tests did not show promising results, therefore it is recommended to evaluate the effect of endophytic fungi used in this study with other pathogens of forest species.

Key words: <ENDOPHYTES>, <BIOLOGICAL CONTROL>, <CONIFERS>, <DAMPINGOFF>, <*Fusarium circinatum*>.



Lcda. Elsa Amalia Basantes Arias. Mgs.
C.I: 0603594409

INTRODUCCIÓN

En Ecuador el empleo de microorganismos favorecedores en sistemas de producción agrícolas y forestales, se denomina una opción sustentable y de precios accesibles para mantener controladas las alteraciones provocadas por patógenos, limitando el uso de químicos agrícolas, que causan efectos devastadores en el medio ambiente, además de ofrecer muchos efectos beneficiosos para las plantas (Carmona, 2017, pp.26-30). Los hongos son organismos microscópicos que favorecen en grandes proporciones a la biomasa de los suelos, actúan en el ciclo de varios elementos, minerales y favorecen a la nutrición de plantas. Una de las dificultades que afrontan los cultivos es la susceptibilidad a virus y nematodos, pero en especial a enfermedades transferidas por hongos patógenos.

Los hongos endófitos son microorganismos extremadamente comunes y muy diversos que viven dentro de los tejidos vegetales, pero generalmente permanecen asintomáticos. Los endófitos tradicionalmente se han considerado mutualistas de plantas, principalmente al reducir la acción herbívora a través de la producción de micotoxinas, como los alcaloides. Sin embargo, la gran mayoría de endófitos, especialmente los de transmisión horizontal que se encuentran comúnmente en plantas leñosas, aparentemente tienen poco o ningún efecto sobre los herbívoros. Los hongos endófitos son un grupo importante, aunque relativamente poco estudiado, de simbiosis de plantas microbianas. Los hongos endófitos viven de forma asintomática, y algunas veces sistémica, dentro de los tejidos vegetales (Carroll, 1988, p.73).

Según Arnold A.E., et al. (2003, pp. 15649-15654). Los hongos endófitos tienen el poder de producir metabolitos secundarios que no permiten a un patógeno en especial o a diferentes hongos endófitos. No obstante, puede no impedir a demás organismos de su similar ambiente.

Son diversos los hongos endófitos que provocan síntomas alelopáticos en su hospedero por medio de la elaboración de metabolitos secundarios o alelo químicos, es decir, intervienen en el crecimiento y desarrollo de las demás especies que se desarrollan a su alrededor y que comúnmente son contrincantes por el espacio y nutrientes (Strobel G., et al., 2004, p.493).

De otra manera, por la complicada interacción que se comprueba entre los hongos endófitos y su planta hospedera, entre diferentes especies de hongos endófitos, y demás especies invasoras como otros hongos y bacterias, se tiene colocado cuidado no solamente en el papel ecológico que logran ejercer los metabolitos secundarios elaborados por los hongos endófitos en las mencionadas interacciones, sino en los empleos de estos compuestos para el crecimiento de químicos agrícolas como fungicidas, insecticidas y herbicidas (Meléndez, C, 2008, p. 86).

ANTECEDENTES

La palabra 'endófito' lo planteo Barry en 1869 y los registros nacientes del aspecto de hongos endófitos proceden del año 1898. (Barry, 1866, p. 145). En la actualidad, Wilson (1995, pp. 274-276), muestra a los organismos endófitos como hongos o bacterias que por una parte o en su ciclo completo de vida irrumpen en tejidos vegetales vivos y provocan enfermedades asintomáticas totalmente dentro del tejido vegetal. Recientemente la importancia de estos microorganismos se ha aumentado considerablemente ya que elaboran metabolitos secundarios novedosos y con mucha acción biológica.

Estudios en la actualidad señalan la extensa capacidad que poseen los hongos endófitos para elaborar combinados activos que le conceden defensa a su hospedera frente a el ataque de patógenos y herbívoros, estableciendo una nueva ruta para la producción de varios precursores o moléculas novedosas de beneficio en la agricultura y en la medicina (Sánchez R, et al, 2013, p.4).

PROBLEMA

En Ecuador es poca la información sobre cepas de hongos endófitos, que hayan sido aisladas de especies forestales nativas y que tengan capacidad de antagonistas y potencial para el control biológico de *Fusarium circinatum*. Estos hongos, al ejercer en ocasiones, antagonismo frente a patógenos fúngicos en la planta hospedante, pueden ser una solución para el control de muchas de las enfermedades forestales causadas por otros hongos. Este campo ha sido poco evaluado en pruebas *in vitro* y en pruebas *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

La patología del Chancro Resinoso del Pino (CRP), es una enfermedad provocada por el hongo ascomiceto *Fusarium circinatum* Nirenberg, perturbando en especial a especies del género *Pinus* (Nirenberg & O'Donnell, 1998, p.434). La patología aqueja con mayor virulencia la especie de *Pinus radiata* D. Don, que es la especie forestal de pino más cultivada alrededor del mundo por su interés económico. Organismos microscópicos como los hongos, fundamentalmente los endófitos, han incitado la ambición de algunos investigadores en los actuales años por la interacción que ejecutan con las plantas y su implicación dentro la biodiversidad y composición de las comunidades (McCormick, et al., 2012, p.1516).

Los hongos endófitos son organismos que viven asintóticamente durante una parte o todo su ciclo de vida dentro del tejido vegetal vivo y que pueden formar relaciones simbióticas complejas con su hospedero (Carroll, 1995). Los microorganismos antagonistas (bacterias,

levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (Costa & Erabadupitiya, 2005, p. 33). Los antagonistas microbianos tienen gran potencial de empleo y se ha comprobado que el uso de los mismos ha sido eficiente en el control de patógenos que afectan diferentes partes de las plantas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la acción antagonista y el potencial de control biológico de hongos endófitos de especies forestales nativas frente a *Fusarium circinatum*.

Objetivos específicos

- Seleccionar las cepas de hongos endófitos de plantas nativas que presenten mejor eficacia antagonista frente a *Fusarium circinatum*.
- Establecer las formas de antagonismo que presenten las cepas de hongos endófitos de plantas nativas frente a *Fusarium circinatum*.

HIPÓTESIS

NULA

Ninguna de las cepas de hongos endófitos de plantas nativas presentan antagonismo o tienen potencial de control biológico frente a *Fusarium circinatum*.

ALTERNATIVA.

Al menos una de las cepas de hongos endófitos de plantas nativas presenta antagonismo o tiene potencial de control biológico frente a *Fusarium circina*

CAPITULO I

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Información de *Fusarium circinatum*.

1.1.1 Taxonomía

Tabla 1-1. Descripción taxonómica de
Fusarium circinatum

Reino	Fungi
Sub-reino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Sub-filo	Pezizomycotina
Clase	Sordarioomycetes
Sub-clase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Genero	<i>Fusarium</i>
especie	<i>circinatum</i>

Fuente : (Britz et al., 1991, p. 1199).

Realizado por: Rojas, K., 2022.

1.1.1. Importancia

Fusarium es un género de hongos de distribución universal, ubicuos y con gran importancia económica ya que son habituales fitopatógenos. Aunque la patología se caracteriza como chancro resinoso en la actualidad no ha sido estudiada en plantaciones de importancia comercial, el patógeno se localiza en viveros y plantas de setos de *Pinus radiata*. Se supone que la destrucción ocasionada por este hongo en plantaciones de *Pinus radiata* con menos a cuatro años sería ligada a plantas sin síntomas e infectadas con *Fusarium circinatum* que se originan en viveros (Mitchell, et al., 2012, pp. 203-210).

1.1.2. Sintomatología de *Fusarium circinatum*

El hongo *Fusarium circinatum*, es uno de los factores perjudiciales más virulentos en las coníferas, teniendo la capacidad de contagiarlas por rutas directas (heridas e insectos vectores) y/o indirectas (viento y agua). Se identifica por provocar coloraciones en las acículas que van desde un color amarillento hasta rojizo, hasta ocasionar su caída (secado de las puntas); en el eje principal del árbol se producen chancros que exudan resina, de ahí surge el nombre común, estos síntomas también se reflejan en las ramificaciones primarias y secundarias, con menor incidencia en las ramificaciones terciarias (Aegerter, et al., 2003, p.13; D. Bezos, et al., 2017, p.279). Se piensa que tanto semillas y las piñas pueden ser atacadas por el patógeno siendo una manera de dispersión (Dwinell, 1988, p. 225).

Los síntomas son más fácilmente identificables se dan en las acículas jóvenes pudiendo ser vistas también en acículas maduras. Se evidencia por coloraciones inicialmente amarillas tornándose a grisáceas o marrones, inclusive una combinación de ambas. La especie que muestra una sintomatología más clara es *Pinus radiata*(Dvorak, WS S. &Kietzka, 2007, p.127). Cada uno de los hospedantes de este hongo patógeno presenta particularidades en la expresión de los síntomas de la infección. Sin embargo, se pueden describir varias generalidades que hacen fácil su identificación visual (Thomas, R., et al, 2015, p.30). La infección se inicia en una ramificación que está cerca a morir generando un estrangulamiento y chancho (cáncer) en esa zona. El crecimiento del cáncer resinoso es tanto distal como proximal, creciendo mayoritariamente para arriba del árbol generando así la muerte de las ramas y de la copa, pero también se ha registrado afectación hacia la parte baja del tallo (Dwinell, et al., 1998, p.228).

1.1.3. Agentes trasmisores

Se conocen de algunos insectos que logran transportar al patógeno del chancho resinoso del pino, en especial el escarabajos de la corteza (Coleóptera: *Scolytidae*), los géneros *Pityophthorus*, *Ips* y *Conophthorus*, y *Ernobius* (Coleóptera: *Anobiidae*). La enfermedad también se ha apartado de *Lasconotus*spp., escarabajos que se conoce que son dañinos, pero no se conoce su valor como actores de dispersión. Existe la posibilidad que algunos insectos no clasificados procedan como dispersores (portador y/o vector) de *Fusarium circinatum*(Brockerhoff, et al., 2016, p.1181).

También puede tener una natural dispersión ya que *Fusarium circinatum* forma esporas que logran transformarse en suspensión en el aire, y estos son, posiblemente, los propágulos primarios que se descubren en el aire (Storer et al., 2002, p.697). Escaso es el conocimiento acerca de

los límites de la propagación en el aire, pero el patógeno está fácilmente resguardado en lugares no afectados. Estas indagaciones insinúan que la transportación por medio del aire se provoca a trayectos relativamente cortos. Esta enfermedad, de manera parecida que cualquiera de los vectores tiene la capacidad de ser trasladado en madera o material vegetal (acículas, ramas, piñas, raíces) que consigue no presentar síntomas. Generalmente son los manejos silvícolas y el manejo de los la mano de obra dentro de los viveros y plantaciones las que precipitan esta distribución. Debe de haber específicos cuidados en la tierra de llantas e instrumentos (herramientas) empleados en zonas con especial peligro a la aparición del hongo (McNee, et al., 2002, p.51). Está verificado la capacidad de sobrevivencia del patógeno en suelos con restos vegetales, generalmente cuando son de pinos (Serrano, et al., 2016, p.4).

1.1.4. Destrucciones relacionadas al Pino

Las pérdidas provocadas por este patógeno son especialmente a una disminución en la calidad de la madera por mal formaciones en sus ramas y tallos, de igual manera la destrucción de árboles y plántulas en los viveros (Storer, *et al*, 2002, pp. 697-699). El hongo asimismo logra contagiar órganos reproductivos, causando la destrucción de conos femeninos y maduros, estropeando las semillas (Dwinell, et al., 2001, p.228). En las áreas donde está demostrado la aparición de este hongo se alcanzan costosas pérdidas económicas en viveros, semilleros forestales, plantaciones silvestres y comerciales de distintas especies de pinos. No menos significativo es la depreciación de los ecosistemas provocado por el desequilibrio de los bosques y nichos ecológicos con gran susceptibilidad a las transiciones de la flora. En la actualidad es calificada como la patología más trascendental a nivel del mundo en los pinos o coníferas, tanto silvestres como comerciales, y no posee procedimientos curativos por lo que las exploraciones están centrados en el tratamiento preventivo. Dentro del ámbito científico destacan las investigaciones en resistencia genética del hospedante y el uso de controladores biológicos que prometan resultados significativos.

1.1.5. Métodos de control

1.1.5.1. Prácticas culturales

Entre las opciones de manejo y/o control de prevención de la patogénesis del chancro resinoso del pino en viveros se conoce la esterilización de semillas de hospedantes susceptibles con agua caliente. Investigaciones anteriores han confirmado los beneficios con tratamientos con agua caliente, con 51° C - 52° C por treinta minutos son una posibilidad para la esterilización de

semillas de *Pinus* contagiadas con *Fusarium circinatum* (Agustí, B., et al., 2009, p.10; Bernal, V. et al., 2009, p.829). Por otro lado, otras investigaciones han determinado que la temperatura mortal para el micelio y las esporas de *Fusarium circinatum* son de 55° C y 52° C, respectivamente (Baker, et al., 2010, p.56). Desgraciadamente, estas prácticas no frenan el arribo de semillas contagiadas a los viveros forestales y a las plántulas al bosque. Para disminuir el efecto de la patología es forzoso un rumbo de manejo integrado y, de igual manera, el papel del control biológico es importante debido a las mejorías que posee ante la utilización de productos con compuestos químicos (Álvarez, P., 2015, p.19).

1.1.5.2. Control biológico por medio de hongos endófitos

Entre los amplios beneficios que la infección de los endófitos suministra a la planta huésped podemos determinar el aumento del desarrollo, la obstinación al estrés hídrico provocado por las etapas de sequías extensas (Barka, et al, 2002, pp.135-142), mas tolerancia y adaptación a suelos inoportunos para la planta (Malinowski, et al., 2005, p.10), favorece en los procesos de aprovechamiento de nutrientes (White, et al., 1997, p.75) y protección de herbívoros y patógenos (Arnold et al., 2003, p.15649). Es por este último beneficio que se los hongos endófitos poseen un valor especial en la investigación. Los mecanismos utilizados por estos son: Efectos directos o ecológicos en los que el endófito reduce directamente al hongo a través de la exudación de antibióticos o enzimas líticas (Oelmüller, et al., 2009, p. 12).

1.2. Información de hongos endófitos

1.2.1. Características de hongos endófitos

Los hongos endófitos, son organismos microscópicos que colonizan el interior de las plantas sin provocar perjuicio aparente. Pueden reducir la incidencia de plagas y enfermedades junto con promover su desarrollo. Para el manejo de enfermedades de plantas los endófitos muestran cuatro mecanismos: por medio de la competencia por espacio y nutrimento, excluyendo a microorganismos patógenos. Mediante la fabricación de metabolitos secundarios que poseen una actividad antimicrobiana, logran parasitar directamente a otro hongo (mico parasitismo) y además activan la resistencia sistémica de la planta. En el ámbito del control de insectos además presentan cuatro mecanismos: ser patógenos. Producen sustancias con una acción repelente, peligrosa o anti alimentario para un insecto plaga éste se halla con alguna estructura de hongo endófito en su interior. Son capaces de impulsar la resistencia sistémica de la planta. Por último, algo que se está investigando en la actualidad, desde el interior de la planta, el endófito podría

presentar metabolitos volátiles que cautivan a insectos benéficos (depredadores o parasitoides) para que reduzca las poblaciones del insecto plaga (Barra, L. 2021, p.1).

Los hongos endófitos constituyen con sus hospederos conexiones simbióticas complicadas, y recientemente se conocen un gran número de interrogantes sobre el funcionamiento de esta simbiosis. En primer momento se anhela conocer qué beneficio toma cada uno de los participantes por estar involucrado en esta conexión simbiótica. En los trópicos no existe ningún ejemplo demostrado de mutualismo entre endófitos y sus hospederos, pero se supone que sí hay casos. Existe un conjunto de hongos endófitos en pastos de las áreas templadas que les suministran aparo contra herbívora y depredación de semillas por medio de producción de toxinas. A cambio recogen alimento, un lugar donde hospedarse y, en algunos casos, dispersión por medio de la semilla de su hospedero (Johnson et al., 1985, pp. 568-571)

1.2.2. Importancia

Los hongos endófitos constantemente toman nutrientes y amparo de su hospedera y muchos de ellos en retribución tienen la capacidad de desempeñar un papel mutualista, ya que pueden beneficiarla al provocar su desarrollo, al incrementar su tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le otorga protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos. Un hongo endófito puede elaborar metabolitos secundarios que no permiten a un patógeno en particular o a otros hongos endófitos. Sin embargo, puede no permitir a otros organismos de su mismo entorno. Algunos hongos endófitos estimulan los efectos alelopáticos de su hospedera por medio de la producción de metabolitos secundarios o alelo químicos, es decir, influyen dentro del crecimiento y desarrollo de otras especies que se desarrollan a su alrededor y que siempre son competidores por el espacio y nutrientes (Rodríguez, R. et al. 2009, pp. 314-330).

1.2.3. Control biológico usando hongos endófitos

Los hongos endófitos son parte del conjunto de agentes de control biológico microbianos. Estos se conceptualizan como cualquier ente microbiológico, incluidos los virus y los hongos inferiores, celulares o no celulares, con capacidad de replicarse o de transferir material genético (Feldmann&Hommes, 2013, p. 86). Los endófitos pueden elaborar metabolitos secundarios que le confieren obstinación al hospedero contra factores bióticos como infecciones provocadas por nematodos, bacterias y hongos patógenos (Rodríguez et al., 2009, pp. 324-330).

Una de las principales características de los microorganismos endófitos es la producción de metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos son antibióticos con propiedades anti

fúngicas, antibacteriales e insecticidas, los cuales pueden no permitir eficazmente el desarrollo de otros microorganismos, incluyendo fitopatógenos (Gunatilaka , 2006, p.519). Estas propiedades permiten que la bioprospección de microorganismos endófitos haya tomado fuerza en los últimos años, dado su potencial de manejo dual de insectos plaga y de enfermedades, así como los diferentes mecanismos de acción que permiten tener plantas con mejor producción de biomasa gracias a la promoción de crecimiento que otorgan algunos de estos microorganismos (Strobel & Daisy, 2003, p. 498).

1.3. Antagonismo

El antagonismo microbiano también distinguido como exclusión microbiana, es la competitividad entre microorganismos. Esta competencia se da entre los microorganismos que resguardan al huésped contra los posibles organismos patógenos. El antagonismo se origina porque compiten por la disponibilidad de nutrientes, oxígeno o espacio, causa sustancias que cambian el pH. Recientemente, la utilización de microorganismos antagonistas es de gran importancia ya que la mayoría de microorganismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos (Pérez, 2004, pp. 249-253). Por lo general, los antagonistas no posee un único mecanismo de acción, y esto disminuye los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Esta resistencia también se puede reducir mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Fernández & Vega, 2001, pp. 96-100).

CAPITULO II

2. MARCO METODOLOGICO

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Características del lugar

2.1.1.1. Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología y en el vivero de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.



Figura 1-2.Ubicación del vivero de la facultad de recursos naturales en la ESPOCH.

Fuente: Wallancañay, T., 2022.

2.1.1.2. Ubicación geográfica

Altitud: 2622m.s.n.m.

Latitud:-1.65

Longitud:-78,65

2.1.1.3. Características climatológicas.

Temperatura media anual: 13,8°C

Precipitación media anual: 571,8mm

Humedad relativa: 48,80% (Estación Meteorológica de la ESPOCH)

2.1.2. Materiales y equipos

2.1.2.1. Materiales de laboratorio

- Envases plásticos
- Cajas petri
- Parafilm
- Papel aluminio
- Jeringas 10mL
- Jeringas de insulina
- Pipetas
- Puntas de pipetas
- Probeta
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Porta y cubre objetos
- Erlenmeyer
- Frascos de vidrio
- Cepillos
- Sorbetes y palillos

2.1.2.2. Equipos de laboratorio

- Autoclave

- Cámara de flujo laminar Biobase
- Microscopio óptico Amscope B100-MS
- Incubadora Biobase modelo BJPX
- Mechero de bunsen
- Cámara de Neubauer
- Balanza digital Radwag WTC 2000
- Adaptador de cámara fotográfica a microscopio
- Cámara Canon

2.1.2.3. Reactivos e insumos

- Papa dextrosa agar (PDA)
- Cloranfenicol
- Alcohol 70%
- Agua destilada

2.1.2.4. Material biológico

- 360 Plantas de *P. patula* de 1 mes y 360 plantas de *P. radiata* de 2 meses obtenidas de Aglomerados Cotopaxi
- Aislados fúngicos de *Fusarium circinatum* (Tabla 3-2)
- Aislados de hongos endófitos de plantas nativas forestales (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Información de aislados de hongos endófitos utilizados en las confrontaciones.

Código	Especie forestal de donde se aisló	Recolector	Fecha de aislamiento	Método de aislamiento	Origen	Tipo
H329	Cedro	Camila Uvidia	2020	Inclusión de fragmento	Foliolo de Cedro	Nativa
P1R1R3	Pino	Camila Uvidia	2020	Dilución seriada	Acícula de pino	Exótica
M3	Ocotea	Camila Uvidia	2020	Inclusión de fragmento	Foliolo de Ocotea	Nativa
M5	Cedro	Camila Uvidia	2020	Inclusión de fragmento	Foliolo de Ocotea	Nativa

Tabla 3-2: Información de aislados del hongo patógeno utilizado en las confrontaciones.

Código	Especie	Recolector	Fecha de aislamiento	Método de aislamiento	Origen
FCR1	<i>Pinus patula</i>	Pablo Álvarez	2020	Aislamiento indirecto de tejido	Raíces
FCP1	<i>Pinus radiata</i>	Pablo Álvarez	2020	Aislamiento indirecto de tejido	Raíces

Realizado por:Rojas, K.,2022.

2.1.2.5. *Materiales y equipos de oficina*

- Computadora
- Impresora
- Hojas
- Libreta
- Lápiz
- Borrador
- Marcadores
- Cinta masking
- Papel absorbente

2.2. Metodología

2.2.1. *Fase de laboratorio*

2.2.1.1. *Reactivación de cepas.*

Los hongos patógenos y antagonistas se encontraban conservados por el método de Castellani, para su reactivación se obtuvo un disco de micelio con un diámetro de 5 mm y mediante un palillo estéril se transfirió a una caja Petri con medio PDA. Posteriormente se incubaron a $24 \pm$

2 °C en condiciones de oscuridad durante 8 días en el caso del género *Trichoderma* y durante 14 días en el caso de *Colletotrichum* sp. antes de realizar las confrontaciones.

2.2.1.1. Cultivo dual.

Se utilizó la metodología de cultivo dual para las confrontaciones descrita por Montealegre et al. (2003) y Ramírez et al. (2006) con algunas modificaciones: al hongo fitopatógeno se lo cultivó en PDA, una vez reactivados los hongos (fitopatógenos y antagonistas) se procedió a colocar discos de micelio de 5mm de diámetro de los dos hongos en cada extremo a 1 cm del borde de la caja Petri, posteriormente se incubaron las cajas Petri a 24 ± 2 °C en condiciones de oscuridad. Se evaluó el crecimiento micelial de cada uno de los hongos midiendo el diámetro vertical y horizontal cada 24 h con un parquímetro digital.

2.2.1.2. Preparación de inóculo para el experimento en vivo.

Para esto se partió de un cultivo puro de los hongos endófitos y patógenos, luego de una semana de crecimiento se procedió a la preparación del inóculo, en cada caja Petri se colocaron 10 mL de agua destilada estéril y luego con un cepillo dental o un palillo estéril se raspó la superficie del medio de cultivo para la liberación de las esporas. La suspensión obtenida se colocó en un vaso de precipitación estéril, posteriormente el inóculo se ajustó a una concentración final de 1×10^6 propágulos por mL para *Trichoderma*, y de 1×10^5 propágulos por mL para *Colletotrichum*.

2.2.1.3. Cálculo de volumen y concentración de los inóculos.

La concentración inicial para el hongo antagonista se obtiene utilizando la siguiente fórmula. (Tabla 4-2)

$$C_i = x * 2,5 \times 10^5$$

La concentración inicial para el hongo patógeno se obtiene utilizando la siguiente fórmula. (Tabla 5-2.)

$$C_i = x * 1,6 \times 10^5$$

Para calcular el volumen inicial del antagonista se utilizó la siguiente fórmula. (Tabla 6-2)

$$V_i = (c_f * v_f) / c_i$$

Tabla 4-2: Concentración inicial de los hongos antagonistas (propágulos/ mL)

Tratamientos	x	Concentración inicial (Ci)	Concentración final (Cf)
H329	73,4	$1,84 \times 10^7$	1×10^6
P1R1R3	52,4	$1,31 \times 10^7$	1×10^6
M5	20,5	$3,40 \times 10^6$	1×10^5
M3	20,2	$5,05 \times 10^6$	1×10^5

Realizado por: Rojas, K., 2022.

Tabla 5-2: Concentración inicial hongo patógeno. (Propágulos /mL)

Tratamiento	Promedio (x)	Concentración inicial (Ci)	Concentración final (Cf)
FC1R	95	$1,52 \times 10^7$	1×10^6
FC1P	72	$1,15 \times 10^7$	1×10^6

Realizado por: Rojas, K., 2022.

Tabla 6-2: Volumen inicial de hongos antagonistas y hongo patógeno (mL)

Tratamientos	Volumen inicial	Volumen final
H329	40,87 mL	400 mL
P1R1R3	30,53 mL	400 mL
M3	8 mL	400 mL
M5	12 mL	400 mL
FC1R	16,44 mL	147 mL
FC1P	21,70 mL	153 mL

Realizado por: Rojas, K., 2022.

2.2.2. Fase de vivero

2.2.2.1. Preparación del área

Se realizó la limpieza de las camas dentro del umbráculo del vivero de la facultad de Recursos Naturales, donde se recibieron 576 plantas de Aglomerados Cotopaxi

2.2.2.2. *Especificación de campo experimental P. radiata*

- Número de tratamientos: 8 tratamientos
- Número de repeticiones: 3 repeticiones
- Número total de unidades experimentales: 24
- Número de plantas utilizadas en el estudio: 288



Figura 2-2. Distribución de los tratamientos en *Pinusradiata*

Realizado por: Rojas, K., 2022.

2.2.2.3. *Especificación de campo experimental P. patula*

- Numero de tratamientos: 8 tratamientos
- Numero de repeticiones: 3 repeticiones
- Número total de unidades experimentales: 24
- Número de plantas utilizadas en el estudio: 288

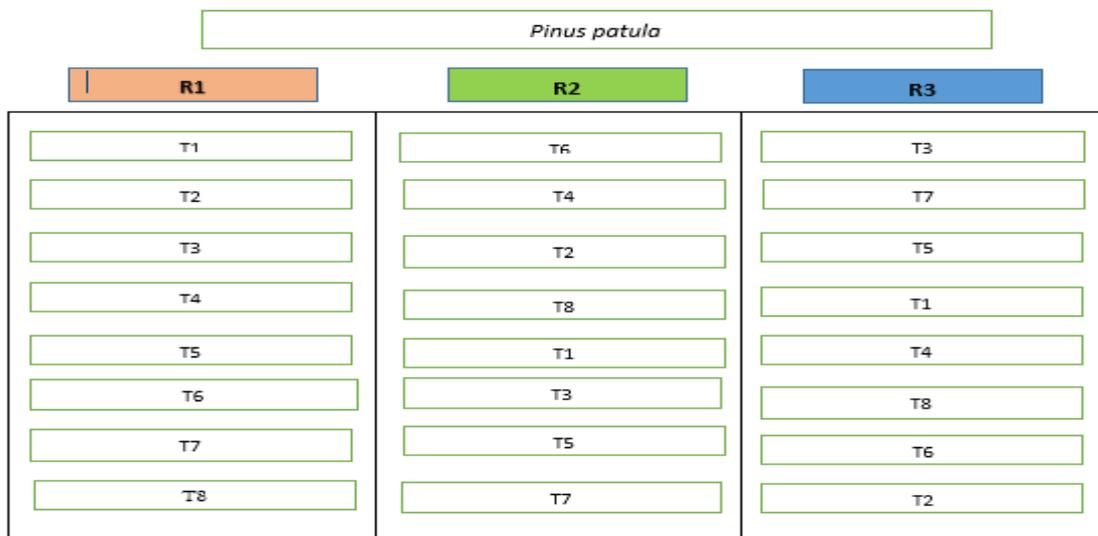


Figura 3-2.Distribución de los tratamientos en *Pinus patula*

Realizado por: Rojas, K., 2022.

2.2.2.4. Descripción de los tratamientos

Tabla 7-2:Descripción de los tratamientos para *P.patula*

Nº de Tratamiento	Código	Enfrentamientos
T1	H329	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> * <i>F. circinatum</i>
T2	P1R1R3	<i>Trichoderma</i> sp. vs. <i>F. circinatum</i>
T3	M3	<i>Colletotrichum</i> sp. vs. <i>F. circinatum</i>
T4	M5	<i>Colletotrichum</i> sp vs. <i>F. circinatum</i>
T5	FC1P	<i>Fusarium circinatum</i>
T6	H329 (+)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
T7	Agua destilada	Agua destilada
T8	Sin tratamiento	Sin tratamiento

Realizado por: Rojas, K., 2022.

Tabla 8-2: Descripción de los tratamientos para *P. radiata*

Nº de Tratamiento	Código	Enfrentamientos
T1	H329	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> * <i>F. circinatum</i>

T2	P1R1R3	<i>Trichoderma</i> sp vs. <i>F. circinatum</i>
T3	M3	<i>Colletotrichum</i> sp vs. <i>F. circinatum</i>
T4	M5	<i>Colletotrichum</i> sp vs. <i>F. circinatum</i>
T5	FC1R	<i>Fusarium circinatum</i>
T6	H329 (+)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
T7	Agua destilada	Agua destilada
T8	Sin tratamientos	Sin tratamiento

Realizado por: Rojas, K., 2022.

2.2.2.5. Riego

Los riegos se realizaron según las condiciones climáticas y los requerimientos de las plantas dos hasta tres veces en semanas muy calurosas.

2.2.2.6. Inoculación de plantas de Pino con *F. circinatum*.

Plantas de *P. patula* y *P. radiata* fueron inoculadas mediante inyección en el tallo a una altura de 1 cm con un volumen de 0,5mL suspensión usando una jeringa de insulina estéril. En las plántulas de *P. patula* la cepa de *F. circinatum* usada correspondió a un aislado obtenido de plántulas de *P. patula*.

2.2.2.7. Inoculación de los hongos antagonistas endófitos.

Se inoculó un volumen de 5 mL de la suspensión de esporas de los distintos antagonistas directamente al sustrato de las plantas de pino (*P. radiata* y *P. patula*) con ayuda de una jeringa. Se realizaron dos inoculaciones la primera aplicación se realizó una semana antes de realizar la inoculación de *F. circinatum* en las plantas de pino y la segunda aplicación una semana después de la inoculación del patógeno.

2.2.3. Variables evaluadas.

2.2.3.1. Altura de las plantas a los 15,30 y 45 días.

La recolección de los datos de altura de las plantas de pino en el vivero (umbráculo) se comenzó quince días después de la inoculación de *F. circinatum*. Los datos de altura fueron recogidos de seis plantas de cada unidad experimental, cada 15 días con ayuda de una regla.

2.2.3.2. Incidencia de *F. circinatum* en vivero.

La cuantificación de la incidencia de *Fusarium* en las plantas de *P.patulay P.radiatase* determinó cada 15 días y la incidencia fue calculada mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ incidencia} = \frac{\# \text{ de plantas con sintomas de } F.\text{circinatum}}{\# \text{ de plantas totales /tratamiento}} \times 100$$

2.2.3.3. Peso seco y fresco de las plantas.

De cada unidad experimental fueron escogidas tres plantas las cuales fueron llevadas a laboratorio y para la obtención del peso fresco fueron colocadas en una balanza digital RADWAG. Para obtener el peso seco las mismas plantas se colocaron por 48 h en una estufa marca SELECTAa 50°C. Luego se pesaron las plantas.

2.2.3.4. Tamaño de la raíz.

Se escogió tres plantas de cada unidad experimental se retiró el sustrato y se llevaron a laboratorio para medir el tamaño de la raíz con una regla.

2.2.3.5. Peso seco de las raíces.

Para el peso seco de las raíces se separó la parte superior (foliar) de las raíces de las plantas puestas en la estufa anteriormente y se pesó solamente las raíces.

2.2.3.6. Peso seco del tallo.

Para el peso seco del tallo se separó la parte superior (foliar) de los tallo de las plantas puestas en la estufa anteriormente y se pesó solamente los tallos.

2.2.3.7. Aislamiento del hongo patógeno inoculado.

Para el aislamiento del patógeno primero se separó la raíz del tallo con una tijera previamente desinfectada, luego se lavó la raíz con abundante agua, en un recipiente con hipoclorito de sodio se colocaron por un minuto las raíces, posteriormente se pasaron en agua destilada por un minuto. Una vez desinfectadas las raíces se llevaron a la cámara de flujo laminar para colocar

las raíces en cajas Petri con medio PDA estéril, finalmente se incubaron a 25 ± 2 °C, durante siete días. Las colonias recuperadas fueron purificadas posteriormente mediante repicados sucesivos.

2.2.3.8. Análisis de datos.

El registro de los datos se realizó en una hoja de Excel, posteriormente se utilizó el software R versión 4.1.1 para realizar el análisis estadístico, usando gráficos de caja y bigote (box plot) de las distintas variables evaluadas, obteniendo tablas con la media aritmética como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. Se usó un análisis inferencial a través del análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias a través de la prueba de Tukey al 5%.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Crecimiento micelial de los cultivos duales.

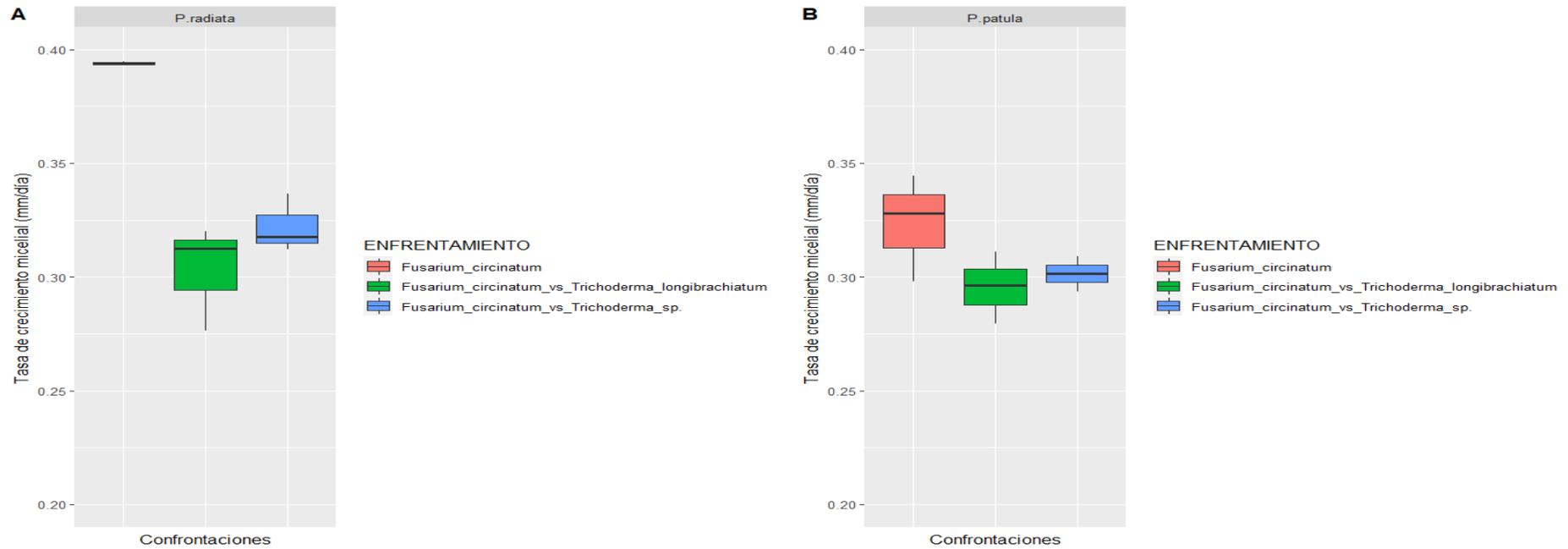


Gráfico1-3. Diagrama de caja y bigote de la tasa de crecimiento micelial de las confrontaciones de *Trichoderma* vs *F. circinatum* en **A** *P. radiata* y **B** *P. patula*

Realizado

por:

Rojas,

K.,

2021.

El análisis de varianza (Anova) en *P. radiata* de la tasa de crecimiento micelial mostró que hubo efecto entre los tratamientos (Anexo H). La prueba de Tukey al 5% mostró dos grupos comprendidos por tres tratamientos (Tabla 9-3). Se observó que las cepas del tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial en *P. radiata* fue el testigo *F. circinatum* con un promedio de 0,39 mm/día y en la de menor tasa de crecimiento micelial la confrontación fue *Fusarium circinatum* vs *Trichoderma longibrachiatum* con un promedio de 0,30mm/día (Grafico 1-3 A).

Tabla 9-3: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial de los aislados relacionados con *P. radiata*.

Tratamientos	Media	Grupo
<i>Fusarium circinatum</i>	0,39	a
<i>Fusarium circinatum</i> vs <i>Trichoderma</i> sp.	0,32	b
<i>Fusarium circinatum</i> vs <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,30	b

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El Anova de la tasa de crecimiento micelial en *P. patula* (Anexo I) mostró que no hubo efecto entre los tratamientos. La prueba de Tukey al 5% mostró un solo grupo comprendido por tres tratamientos (Tabla 10-3). En *P. patula* las cepas del tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue el testigo *F. circinatum* con un promedio de 0,32mm/día y en la de menor tasa de crecimiento micelial fue *Fusarium circinatum* vs *Trichoderma longibrachiatum* con un promedio de 0,29 mm/día (Grafico 1-3 B).

Tabla 10-3: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial de los aislados relacionados con *P. patula*

Tratamientos	Media	Grupo
<i>Fusarium circinatum</i>	0,32	a
<i>Fusarium circinatum</i> vs <i>Trichoderma</i> sp.	0,30	a
<i>Fusarium circinatum</i> vs <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,29	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

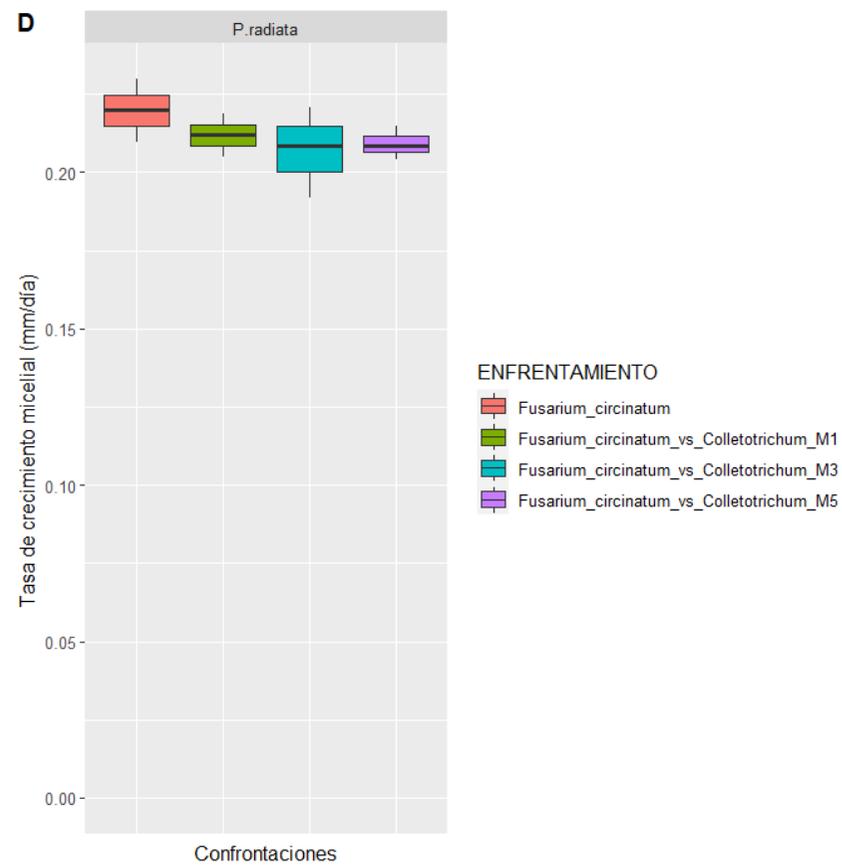
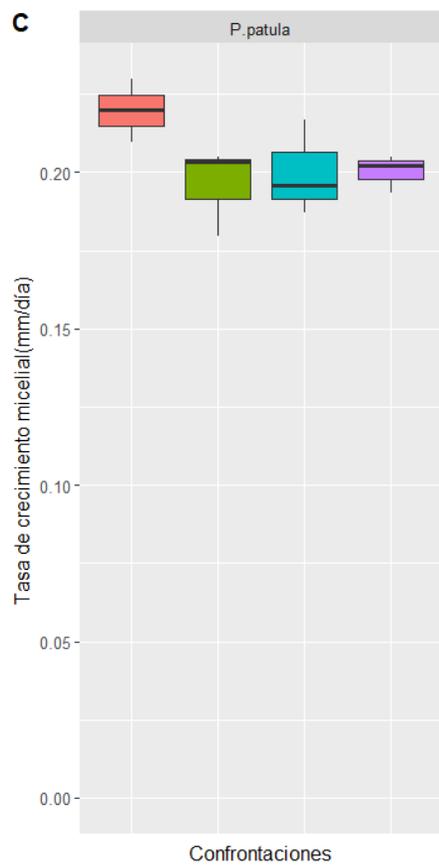


Gráfico2-3.Diagrama de caja y bigote de la tasa de crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. frente a *F. circinatum* en **A** *P. patula* y **B** *P. radiata*

Realizado por: Rojas K., 2022.

El análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial en *P. patula* (Anexo J) mostró que no hubo efecto entre los tratamientos. La prueba de Tukey al 5% mostro un solo grupo comprendido por tres tratamientos (Tabla 11-3). Se observó en *P. patula* que las cepas del tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *F. circinatum* con un promedio de 0,22 mm/día, mientras que los enfrentamiento M1, M3Y M5 tuvieron un comportamiento casi similar con un promedio de 0,20 mm/día (Gráfico 2-3 C).

Tabla 11-3: Prueba de Tukey al 5% para la tasa de crecimiento micelial de las diferentes confrontaciones relacionados con *P. patula*

Tratamientos	Media	Grupo
<i>Fusarium circinatum</i>	0,22	a
<i>Fusarium_circinatum_vs_Colletotrichum_M5</i>	0,20	a
<i>Fusarium_circinatum_vs_Colletotrichum_M3</i>	0,20	a
<i>Fusarium_circinatum_vs_Colletotrichum_M1</i>	0,20	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial en *P. radiata* (Anexo K) mostró que no hubo efecto en el factor enfrentamiento. La prueba de Tukey al 5% mostro un solo grupo comprendido por cuatro tratamientos. Las cepas del tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial en *P. radiata* fue *F. circinatum* con 0,22 mm/día y la menor tasa de crecimiento micelial fue la confrontación *F. circinatum_vs_Colletotrichum_M3* con 0,20 mm/día (Gráfico 2-3 D).

Tabla 12-3: Prueba de Tukey al 5% para crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. en *P. radiata*

Tratamientos	Media	Grupo
<i>Fusarium circinatum</i>	0,22	a
<i>Fusarium_circinatum_vs_Colletotrichum_M1</i>	0,21	a
<i>Fusarium_circinatum_vs_Colletotrichum_M5</i>	0,20	a
<i>Fusarium_circinatum_vs_Colletotrichum_M3</i>	0,20	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

Se tomó las medidas de altura de las plantas de *P. patula* y *P. radiata* a los 15 -30 y 45 días después de la inoculación por inyección de *Fusarium circinatum*, dando los siguientes resultados:

En *P. patula* el análisis de varianza de la altura presentó efecto en el factor tratamiento con p valor $1,18e-10$, tiempo con un valor de $6,23e-06$ y la interacción tratamiento-tiempo con $2,12e-08$. (Anexo L). La prueba de Tukey al 5 % mostró catorce grupos comprendidos por ocho tratamientos en tres tiempos (Tabla 13-3).

A los quince días el tratamiento que presentó mayor altura fue el tratamiento T4 (M5) con una altura de 7,88 cm, y los tratamientos con menor altura fueron los tratamientos T8 con 6,30 cm y agua destilada T7 con 6,69 cm. A los treinta días los tratamientos con mayor altura fueron los tratamientos T6 (H329+) con una altura promedio de 8,58 cm y agua destilada con una altura promedio de 8,33 cm y los que presentaron menor altura fueron los tratamientos T3 (M3) con 1,44 cm y T5 (FC1P) con 2,13 cm. A los cuarenta y cinco días los tratamientos con mayor altura fueron los tratamientos testigos T6 (H329+) con 10,40 cm de promedio y sin tratamiento (T7) con 9,57 cm, y los que presentaron menor altura fueron los tratamientos T3 (M3) con 0,55 cm, el tratamiento testigo T5 (FC1R), T1 (H329) T2 (PIR1R3) empezaron a amarillarse y morir (Gráfico 3-3 A).

Tabla 13-3: Prueba de Tukey al 5% para el análisis de las alturas en *P. patula*.

Tratamientos	Promedio	Grupos
T6:45	10.40	a
T8:45	9.57	ab
T7:45	9.36	ab
T6:30	8.58	abc
T7:30	8.33	abcd
T8:30	8.25	abcd
T4:15	7.88	abcd
T5:15	7.36	abcde
T2:15	7.33	abcde
T3:15	7.02	abcdef
T1:15	6.97	abcdef
T6:15	6.77	abcdef
T7:15	6.69	abcdef
T8:15	6.30	abcdefg
T4:30	5.05	abcdefgh
T2:30	4.61	bcdefgh
T1:30	3.38	cdefgh
T4:45	2.77	defgh
T5:30	2.13	efgh
T3:30	1.44	fgh
T5:45	1.42	fgh
T2:45	0.97	gh
T3:45	0.51	h
T1:45	0.50	h

Realizado por: Rojas, K., 2022.

En *P. radiata* el análisis de varianza de la altura mostró efecto en el factor tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento: tiempo (Anexo M) La prueba de Tukey al 5% en mostró cuatro grupos con ocho tratamientos en tres tiempos (Tabla 14-3).

En *P. radiata* los quince días el tratamiento que presentó mayor altura fue el tratamiento T3 (M3) con 10,55 cm mientras que el tratamiento con menor altura fue el tratamiento de control sin tratamiento T8 con 8,02 cm. A los treinta días los tratamientos que presentaron mayor altura fueron agua destilada con una altura promedio de 11,87 cm, T6 (H329+) con 11,70 cm, mientras que, los tratamientos con menor altura fueron T4 (M5), T3(M3), T5 (FC1R), T1(H329) y T2 (P1R1R3) ya que presentaron marchitez. A los cuarenta y cinco días el tratamiento que presentó mayor altura fue T7 (con altura de 13,20 cm, mientras que, los tratamientos con menor altura fueron T4 (M5), T3 (M3), T5 (FC1R), T2 (H329) y T2 (P1R1R3), ya que empezaron a amarillarse y morir (Gráfico 3-3 B).

Tabla 14-3: Prueba de Tukey al 5% para el análisis de la altura en *P. radiata*.

Tratamientos	Promedio	Grupos
T7:45	13.20	a
T6:45	13.17	a
T8:45	12.77	a
T7:30	11.70	a
T6:30	11.67	a
T8:30	10.86	a
T3:15	10.55	a
T4:15	10.50	a
T1:15	10.47	a
T7:15	10.36	a
T5:15	9.83	ab
T6:15	9.00	ab
T2:15	8.86	ab
T8:15	8.02	ab
T4:30	1.916	bc
T1:30	0,00	c
T1:45	0,00	c
T2:30	0,00	c
T2:45	0,00	c
T3:30	0,00	c
T3:45	0,00	c
T4:45	0,00	c
T5:30	0,00	c
T5:45	0,00	c

Realizado por: Rojas, K. 2022

3.3. Tamaño de la raíz

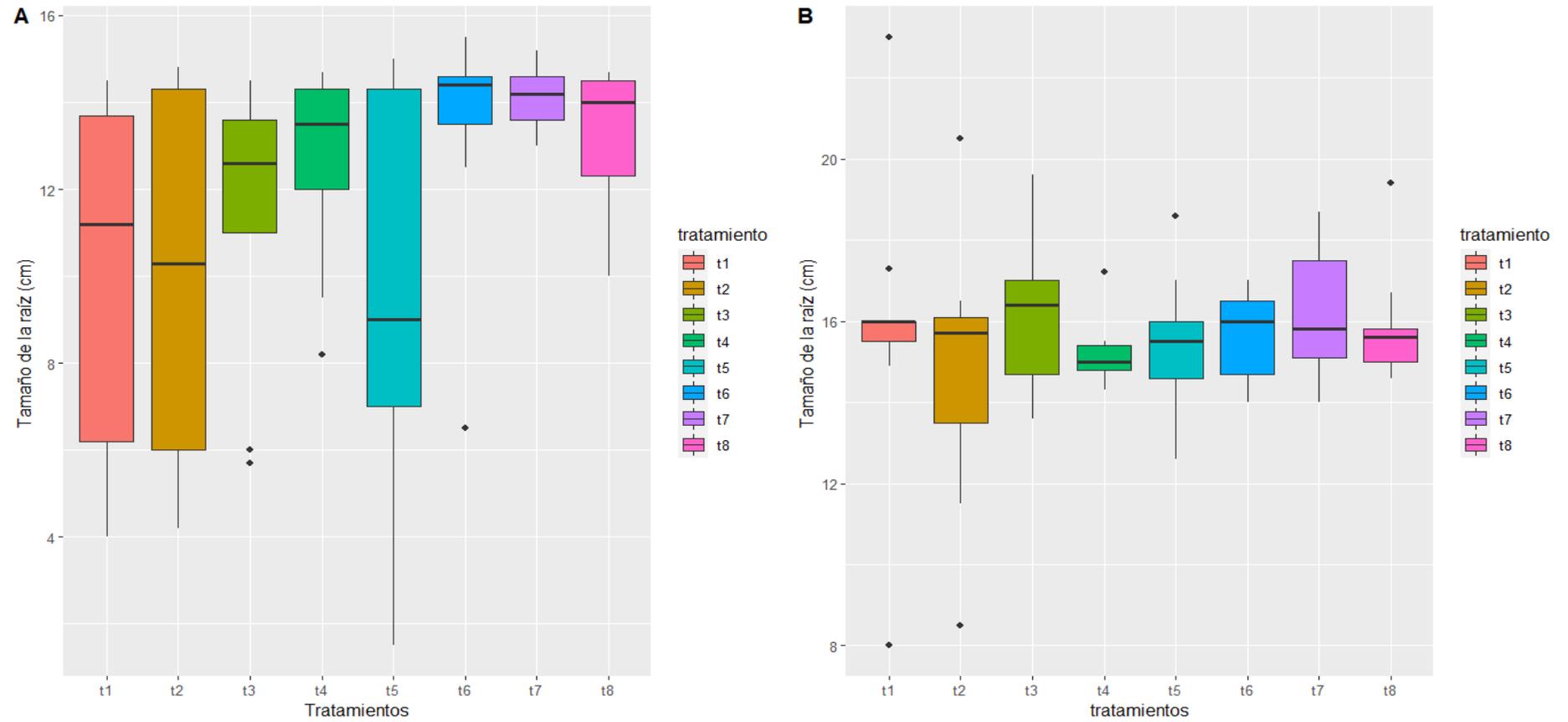


Gráfico4-3. Diagrama de caja y bigote para el tamaño de la raíz en *P. patula* **A** y *P. radiata* **B** inoculadas con los diferentes tratamientos.

Realizado por: Rojas, K. 2022

El análisis de varianza del tamaño de la raíz en *P. patula* (Anexo N) mostró que no hubo efecto en los tratamientos ni repetición. La prueba de Tukey al 5 % mostró un solo grupo comprendido por ocho tratamientos (Tabla 15-3).

En *P. patula* el mejor tratamiento fue el testigo agua destilada (T7) con un promedio de 14,11 cm, mientras que la raíz con menor longitud se presentó en el tratamiento testigo T5 (FC1P) con un promedio de 9,35 cm (Gráfico 4-3 A).

Tabla 15-3: Prueba de Tukey al 5% para el tamaño de la raíz en *P.patula*.

Tratamientos	Media	Grupos
T7	14,11	a
T6	13,38	a
T8	13,37	a
T4	12,55	a
T3	11,46	a
T2	10,08	a
T1	10,02	a
T5	9,35	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza para el tamaño de la raíz en *P. radiata* (Anexo O) mostró que no hubo efecto sobre los tratamientos, en la repetición hubo efecto con un P valor de 0,0366. La prueba de Tukey al 5 % mostró un solo grupo comprendido por ocho tratamientos (Tabla 16-3).

En la especie forestal *P. radiata* el promedio más alto fue de T3 con 16,32 cm y el tratamiento con el promedio más bajo fue de T4 (M5) con 14,86cm (Gráfico 4-3 B).

Tabla 16-3: Prueba de Tukey al 5% para longitud de la raíz en *P. radiata*

Tratamientos	Media	Grupos
T3	16,32	a
T7	16,11	a
T8	15,86	a
T1	15,83	a
T6	15,65	a
T5	15,36	a
T2	15,22	a
T4	14,86	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

3.4. Peso fresco de la planta

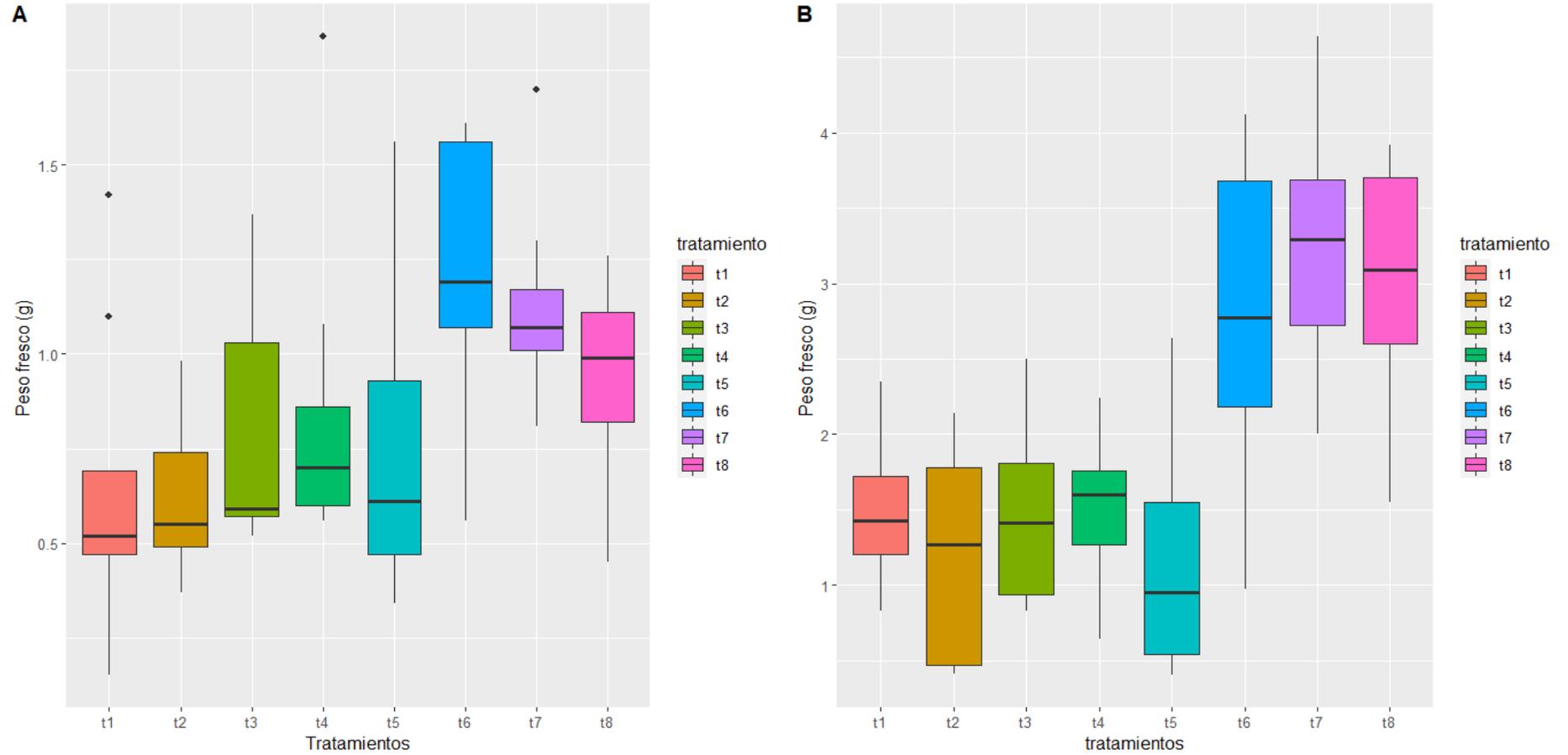


Gráfico5-3. Diagrama de caja y bigote para el Peso fresco de las plántula **A** *P. patula* y **B** *P. radiata* inoculadas con los diferentes tratamientos.

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza del peso fresco de las plántulas en *P. patula* (Anexo P) no mostró efecto de los tratamientos. La prueba Tukey al 5% mostró un solo grupo comprendido por ocho tratamientos (Tabla 17-3). Se observó que las cepas del tratamiento con mayor peso fresco en *P. patula* fue el tratamiento T6 con un promedio de 1,20 g y el tratamiento con menor peso fresco fue T2 con un promedio de 0,61g (Gráfico 5-3 A).

Tabla 17-3: Prueba de Tukey al 5% para el peso fresco de la planta en *P. patula*

Tratamientos	Media	Grupos
T6	1,20	a
T7	1,13	a
T8	0,91	a
T4	0,83	a
T5	0,80	a
T3	0,77	a
T1	0,63	a
T2	0,61	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza del peso fresco de las plántulas en *P. radiata*(Anexo Q) mostró efecto de los tratamientos. La prueba de Tukey al 5% mostró dos grupos comprendidos por ocho tratamientos (Tabla 18-3). Se observó que las cepas del tratamiento con el valor más alto de peso fresco fue del testigo agua destilada T7 con una media de 3,29g y el valor de la media más bajo fue de 1,11g correspondiente al tratamiento del patógeno *Fusarium circinatum* T5 (Gráfico 5-3 B)

Tabla 18-3: Prueba de Tukey al 5% del peso fresco de la planta en *P. radiata*.

Tratamientos	Media	Grupos
T7	3,29	a
T8	3,00	a
T6	2,73	a
T4	1,50	b
T1	1,46	b
T3	1,42	b
T2	1,22	b
T5	1,11	b

Realizado por: Rojas, K., 2022.

3.5. Peso seco de la raíz

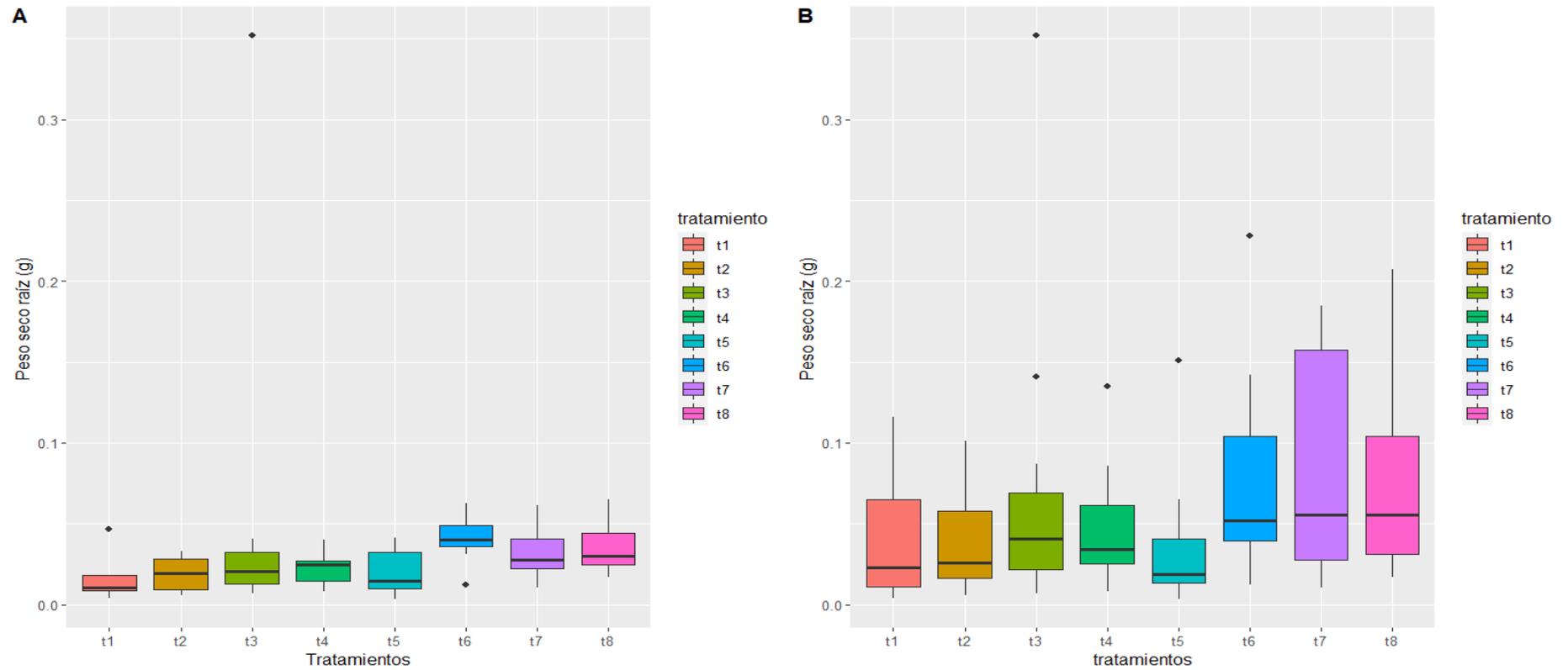


Gráfico6-3. Diagrama de caja y bigote del peso seco de la raíz de **A** *P. patula* y **B** *P. radiata* inoculadas con los diferentes tratamientos.

Realizado por:Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza del peso seco de la raíz en *P. patula* (Anexo R) no mostró efecto de los tratamientos. La prueba de Tukey al 5% mostró un solo grupo comprendido por ocho tratamientos (Tabla 19-3).

En el peso seco de raíz se observó que en el valor más alto fue del tratamiento T6 presentando una media de 0,057g y el peso más bajo fue del tratamiento T5 con una media de 0,001 g (Gráfico 6-3 A).

Tabla 19-3: Prueba de Tukey al 5% del peso seco de la raíz de *P. patula*

Tratamientos	Media	Grupos
T6	0,05	a
T3	0,04	a
T8	0,03	a
T7	0,03	a
T4	0,02	a
T5	0,01	a
T2	0,01	a
T1	0,01	a

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza del peso seco de la raíz en *P. radiata* (Anexo S) mostró efecto de los tratamientos. La prueba de Tukey al 5% mostro cinco grupos comprendidos por ocho tratamientos (Tabla 20-3).

En *P. radiata* el mayor promedio fue de 0,14 g del tratamiento agua destilada T7, mientras que el valor más bajo fue de 0,04g del patógeno *F. circinatum* T5 (Gráfico 6-3 B).

Tabla 20-3: Prueba de Tukey al 5% para el peso seco de la raíz de *P. radiata*

Tratamientos	Media	Grupos
T7	0,14	a
T8	0,11	ab
T6	0,10	abc
T3	0,07	bc
T4	0,06	bc
T1	0,06	bc
T2	0,05	bc
T5	0,04	c

Realizado por: Rojas, K., 2022.

3.6. Peso seco del tallo

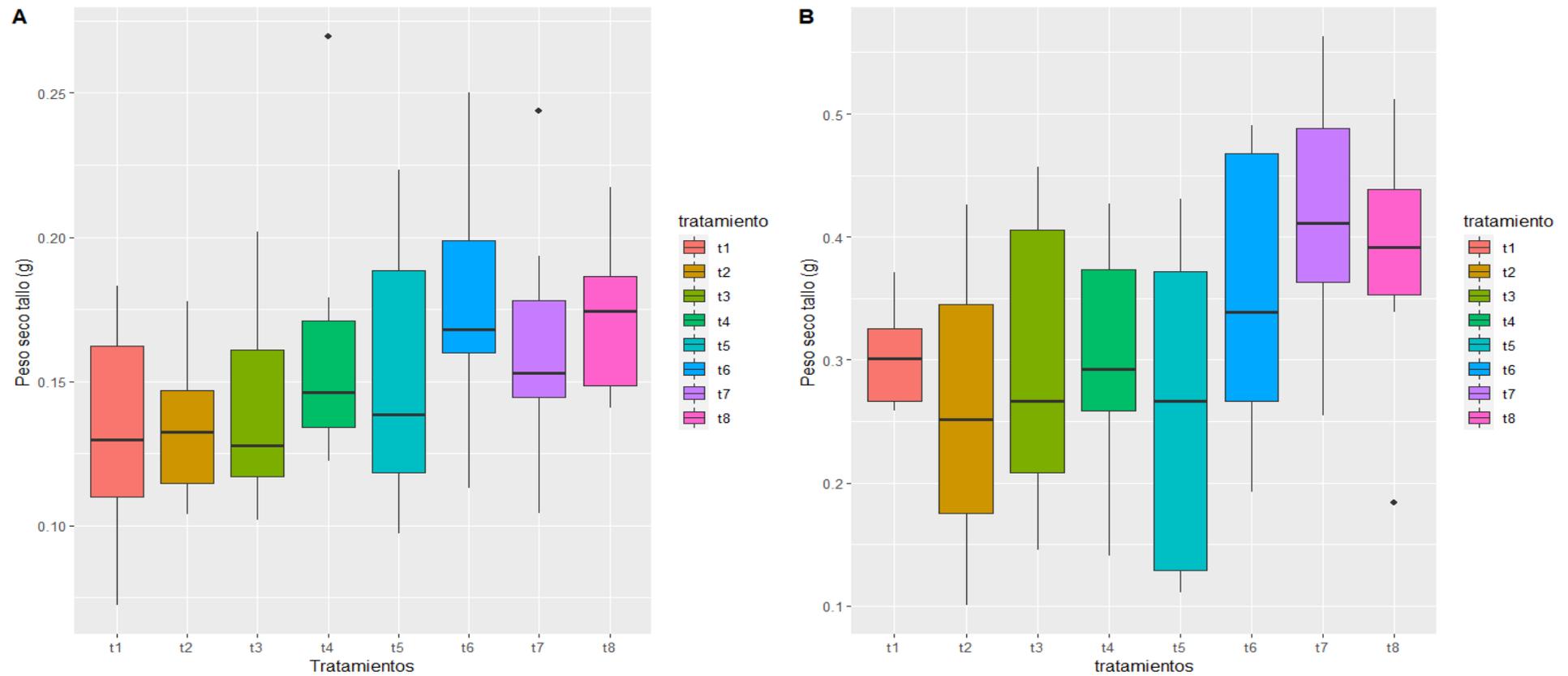


Gráfico 7-3. Diagrama de caja y bigote del peso seco del tallo de **A** *P. patula* y **B** *P. radiata* inoculadas con los diferentes tratamientos

Realizado por:Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza del peso seco del tallo en *P.patula*(Anexo T) no presentó efecto de los tratamientos.La prueba de Tukey al 5% mostro un solo grupo comprendido por ocho tratamientos (Tabla 21-3).

En *Pinus patula* el peso seco del tallo mostró los mayores pesos secos en el tratamientoT6 con un promedio de 0,18 g y el tratamiento T3 con el de menor promedio de 0,13 g (Gráfico 7-3 A).

Tabla 21-3: Prueba de Tukey al 5% del peso seco del tallo en *P. patula*

Tratamientos	Medias	Grupos
T6	0,18	a
T8	0,17	a
T7	0,16	a
T4	0,16	a
T5	0,14	a
T3	0,13	a
T2	0,13	a
T1	0,13	a

Realizado por:Rojas, K., 2022.

El análisis de varianza del peso seco del tallo en *P. radiata* (Anexo U) mostrò que hubo efecto en los tratamientos. La prueba de Tukey al 5% dio como resultado tres grupos comprendidos de ocho tratamientos (Tabla 22-3).

En *P. radiata* las cepas del tratamiento con mayor peso seco del tallo fue de T7 con un promedio de 0,42 g y las cepas con menor peso seco fueron las del tratamiento T2 con un promedio de 0,25 g (Gráfico 7-3 B).

Tabla 22-3:Prueba Tukey al 5% del peso seco del tallo de*P. radiata*

Tratamientos	Medias	Grupos
T7	0,42	a
T8	0,38	ab
T6	0,35	ab
T4	0,31	ab
T1	0,30	ab
T3	0,29	ab
T5	0,26	b
T2	0,25	b

Realizado por: Rojas, K., 2022.

3.7. Incidencia

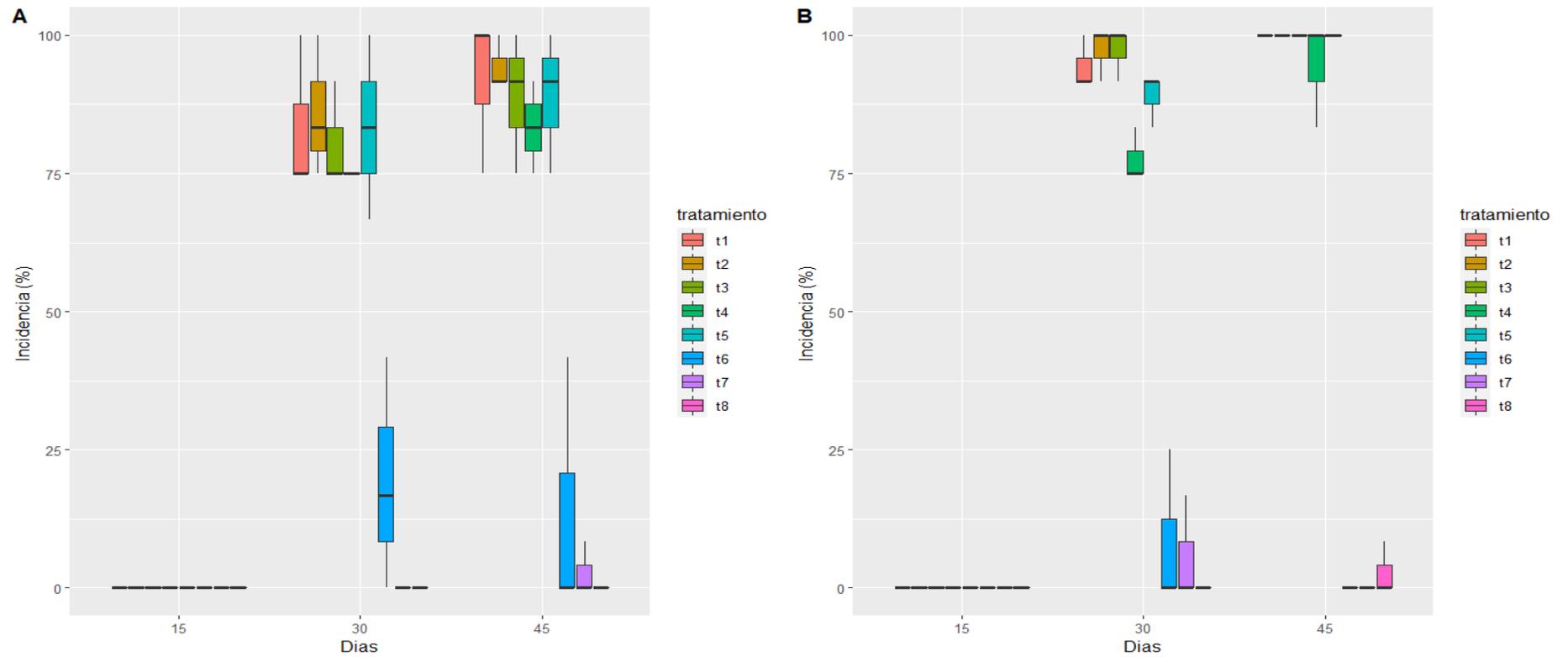


Gráfico 8-3. Diagrama de caja y bigote del porcentaje de incidencia a los 15, 30 y 45 días después de inocular *F. circinatum* *P.patula* **A** y *P. radiata* **B**.

Realizado por: Kattia, R. 2022

El Anova de la incidencia para *P.patula* mostro efecto en los tratamientos, el tiempo y la interaccion tratamiento:tiempo (Anexo V). La prueba de Tukey al 5% mostrò dos grupos comprendidos de ocho tratamientos en tres tiempos (Tabla 23-3).

En *P. patulaa* los quince dias no se presentó incidencia de ninguno de los tratamientos, a los treinta dias el tratamiento mas afectado fue T2 con un porcentaje de 86,11% y el tratamiento con menor incidencia fue T8 con un porcentaje de 0%, a los cuarenta y cinco dias el tratamiento con mayor incidencia fue T2 con una incidencia de 94,44% y el tratamiento con menor incidencia fue T8 con 0%(Gráfico8-3 A).

Tabla 23-3:Prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de incidencia en *P.patula*

Tratamientos	Media	Grupo
T2:45	94,44	a
T1:45	91,66	a
T3:45	88,88	a
T5:45	88,88	a
T2:30	86,11	a
T1:30	83,33	a
T4:45	83,33	a
T5:30	83,33	a
T3:30	80,55	a
T4:30	75,00	a
T1:15	0,00	b
T2:15	0,00	b
T3:15	0,00	b
T4:15	0,00	b
T5:15	0,00	b
T6:15	0,00	b
T6:30	0,00	b
T6:45	0,00	b
T7:15	0,00	b
T7:30	0,00	b
T7:45	0,00	b
T8:15	0,00	b
T8:30	0,00	b
T8:45	0,00	b

Realizado por: Rojas, K., 2022.

El Anova de la incidencia para *P.radiata* mostrò efecto en los tratamientos, el tiempo y la interaccion tratamiento:tiempo (Anexo W). La prueba de Tukey al 5% mostrò dos grupos comprendidos de ocho tratamientos en tres tiempos (Tabla 24-3)

En *P. patulaa* los quince días no se presentòningun porcentaje de incidencia en los tratamientos, a los treinta días el tratamiento mas afectado fue T2 con un porcentaje de 97,22% y el tratamiento con menor incidencia fue T8 con un porcentaje de 0%, a los cuarenta y cinco días el tratamiento con mayor incidencia fue T1 con una incidencia de 100% y el tratamiento con menor incidencia fue T8 con 0%(Grafico 8-3 B).

Tabla 24-3: Prueba de Tukey al 5% del porcentaje de incidencia de *P.radiata*

Tratamientos	Media	Grupo
T1:45	100,00	a
T2:45	100,00	a
T3:45	100,00	a
T5:45	100,00	a
T2:30	97,22	a
T3:30	97,22	a
T1:30	94,44	a
T4:45	94,44	a
T5:30	88,88	a
T4:30	77,00	a
T1:15	0,00	b
T2:15	0,00	b
T3:15	0,00	b
T4:15	0,00	b
T5:15	0,00	b
T6:15	0,00	b
T6:30	0,00	b
T6:45	0,00	b
T7:15	0,00	b
T7:30	0,00	b
T7:45	0,00	b
T8:15	0,00	b
T8:30	0,00	b
T8:45	0,00	b

Realizado por: Rojas, K., 2022.

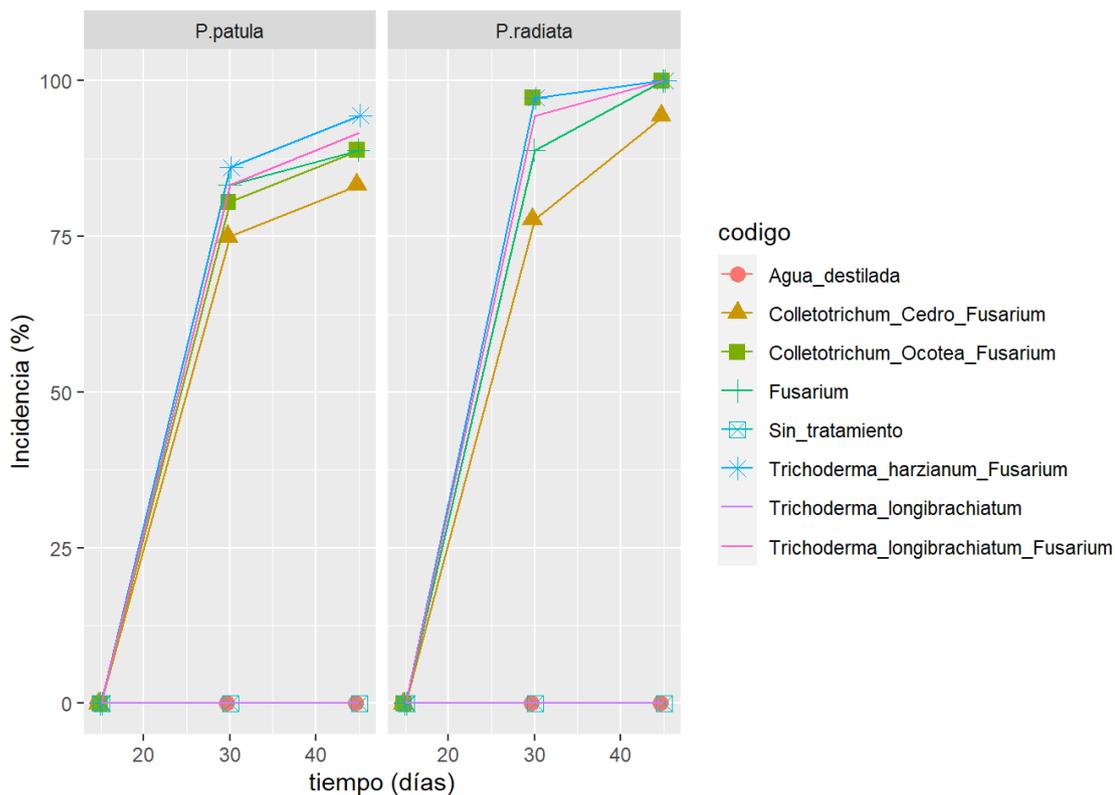


Gráfico 9-3. Curva del progreso de la enfermedad para la variable incidencia de *F. circinatum* en *P. patula* A y *P. radiata* B

Realizado por: Rojas, K., 2022.

La curva de porcentaje de incidencia (Gráfico 9-3) muestra el progreso de la enfermedad en *Pinus patula* a partir del día 15 donde todos los tratamientos mostraron incidencia de 0% ya que a este tiempo el patógeno no ejercía efecto aún sobre las plantas ni se desarrollaron síntomas, a partir de los treinta días se empezó a desarrollar síntomas muy notorios como la marchitez de algunas plantas en especial de aquellos tratamientos inoculados con el patógeno, a los cuarenta y cinco días el tratamiento con mayor porcentaje de incidencia fue *Trichoderma longibrachiatum* frente a *Fusarium circinatum* con un porcentaje de incidencia del 94,44%.

En *Pinus radiata* a los 15 días todos los tratamientos mostraron incidencia 0%, aparentemente no hubo ningún efecto durante este tiempo, a los 30 días los tratamientos inoculados con *F. circinatum* alcanzaron más del 75% de incidencia mientras que los tratamientos testigos se mantuvieron con incidencia del 0%, a los cuarenta y cinco días los tratamientos T1-T2-T3-T5 inoculados con *F. circinatum* alcanzaron el 100% de incidencia, el tratamiento T4 alcanzó el 94,44% siendo el menos afectado.

DISCUSION DE RESULTADOS

De acuerdo con Robin & Heiniger (2001, p.363) el uso de hongos endófitos, tiene un futuro prometedor tanto por los resultados que proporciona como por la inocuidad en el ecosistema en que se emplee. Hasta el momento el control biológico ha sido empleado con éxito en el control de varias patologías vegetales, en algún caso producidas por patógenos del género *Fusarium* (SIVAN et al., 1987, p.589).

En cada una de las variables estudiadas se presentó diferencias significativas tanto en la especie forestal como en los tratamientos, en el crecimiento micelial se tomaron en cuenta 4 ensayos duales de los cinco que se compararon y se estableció antagonismo y se llevaron a prueba en vivero los mejores aislados. En la fase de vivero los tratamientos testigos fueron los que mejores resultados presentaron (0% de incidencia), los tratamientos inoculados con *Fusarium circinatum* empezaron a presentar marchitamiento a partir de los 30 días en las tres repeticiones de ambas especies de pino, no presentando mejoras después de la inoculación, dando a entender que los hongos endófitos no tuvieron efecto sobre el patógeno en vivero, sin embargo, en el porcentaje de incidencia se pudo observar que en *Pinus patula* el tratamiento *Colletotrichum* Cedro (M5) fue el único que presentó un nivel de incidencia menor que el de los demás tratamientos inoculados con *F. circinatum* con un promedio de incidencia del 83,33 %. (Gráfico 8-3), sin embargo queda claro que la especie forestal *Pinus radiata* fue la especie más susceptible al ataque del patógeno *F. circinatum* ya que presentó una mayor incidencia llegando al porcentaje del 100% a los cuarenta y cinco días.

Martínez-Álvarez, et al. (2012, pp. 303-316) menciona en su estudio relacionado a endófitos fúngicos que a pesar de que los aislados de *Trichoderma* habían obtenido buenos resultados en los ensayos *in vitro*, estos no tuvieron la misma efectividad en las condiciones *in vivo*. Lo mismo sucedió en el caso de los tratamientos con *Trichoderma*, como se pudo observar en la prueba de Tukey al 5% (Tabla 22-3) el tratamiento con mayor incidencia fue del tratamiento T2 (P1R1R3) con un promedio de incidencia del 97,22%, seguido de T1 (H329) con un promedio de incidencia del 95.83%.

Se sugiere que la dosis de los inóculos utilizados no fueron las suficientes para que este haga efecto sobre las plantas (Jankowiak, 2006, p.807), *Trichoderma* spp. es un hongo típico de suelo, presente habitualmente en la rizósfera (Harman, et al., 2004, p. 48). Por esta razón pueden haber resultado insuficientes dos aplicaciones cada 15 días para que el endófito se establezca en el hospedante y colonice los tejidos que el patógeno fuera a atacar.

La inoculación del patógeno no se realizó al suelo, sin embargo, en las raíces presentaron síntomas como pudrición y color negro, por lo que luego de su aislamiento en medio PDA de las partes más afectadas de la raíz se determinó presencia de *Fusarium circinatum*, esto concuerda con Peterson (2008, pp. 109-125), quien fue que señaló que *Fusarium*spp. es que tiene la capacidad de enfermar claramente el tejido, pero pospone con Soria et al. (2012, p.282), quienes indican que la enfermedad está agrupada a contusiones o laceradas en la cascara u otros tejidos en las plantas, ya que este patógeno es incompetente para ingresar concisamente al tejido.

En cuanto al peso fresco de la planta aquellas que actuaron como testigo (agua destilada por ejemplo) tuvieron un peso mayor con promedio de 1,13g \pm 0,25g y 3,29g \pm 0,82g en *Pinus patula* y *Pinus radiata* respectivamente mientras que el peso del tratamiento con *Fusarium* fue 0,86 g y 1,11g en *Pinus patula* y *Pinus radiata* respectivamente, es decir, el patógeno afectó significativamente el peso de la planta.

En la altura de la planta los tratamientos testigos tuvieron un promedio de crecimiento mayor que aquellos tratamiento que fueron inoculados con *Fusarium circinatum* en el caso de agua destilada en *Pinus patula* se obtuvieron promedios de altura de hasta 9,36mm y en *P. radiata*, con (*Trichoderma longibrachiatum*) T1 promedios de altura de 13,17mm, mientras que aquellas plantas inoculadas del tratamiento T5 (*Fusarium*) alcanzaron promedios de crecimiento de 0,51mm tanto en las dos especies forestales, dando a entender que el patógeno reduce significativamente el crecimiento longitudinal a los quince primeros días después de la aplicación del inóculo en las plantas.

En cuanto al tiempo en que se desarrolló la enfermedad tomo 30 días para presentar síntomas notorios como marchitamiento y amarillamiento de las hojas lo que concuerda con WS S Dvorak, et al, (2007, pp. 126) que menciona que se caracteriza por tonalidades primeramente amarilla tornándose a gris ocastañas, incluso una composición de las dos. La especie que muestra síntomas claros es la de *Pinus radiata*.

Si bien es efectivo en estos tiempos se están ensayando diferentes cepas endófitos para su uso como actores de control biológico (ACB) de fitopatógenos, es señalar que más del 90% de los estudios se han realizado con la especie *Trichoderma* (Benítez, et al, 2004, pp. 249-260), y es muy poca la información que se tiene acerca de los resultados con endófitos de especies nativas se puede determinar que el endófito de *Colletotrichum* obtenido de cedro es el que mejor comportamiento tuvo frente a *Fusarium circinatum*.

CONCLUSIONES

- En *P. radiata* los hongos endófitos en condiciones *in vitro* presentaron efecto frente a *Fusarium circinatum* especialmente las cepas de *Trichoderma* pero al ser llevados a condiciones *in vivo* no se observó control biológico sobre el patógeno. Los tratamientos T1, T2, T3, T5 alcanzaron el 100% de incidencia a los cuarenta y cinco días. El mejor tratamiento en la variable longitud de la raíz fue de T7 con una media de 14,11 cm, en cuanto a peso seco de la raíz, peso seco del tallo, peso fresco de la planta y altura el mejor tratamiento fue T6 en cada uno.
- En *P. patula* los hongos endófitos de en condiciones *in vitro* presentaron antagonismo frente a *Fusarium circinatum* y al ser llevados a condiciones *in vivo* tampoco se observó control biológico sobre el patógeno, el porcentaje de incidencia mayor fue en T2 con un 94,44% a los cuarenta y cinco días. El mejor tratamiento en la variable tamaño de la raíz fue de T3 con una media de 16,32 cm, En cuanto a peso seco de la raíz, peso seco del tallo, peso fresco de la planta y altura el mejor tratamiento fue T7 en cada uno.

RECOMENDACIONES

- Al realizar ensayos con hongos endófitos del género *Colletotrichum* se debe tomar en cuenta el tiempo de crecimiento micelial ya que presentaron tiempos de crecimiento más largos en comparación con *Trichoderma*, esto puede influir en la preparación de los inóculos cuando no se llega a las concentraciones adecuadas porque el hongo no ha esporulado ni ha crecido lo suficiente, tomando en cuenta que la eficiencia del control biológico con hongos endófitos depende de la cantidad de esporas en suspensión y la concentraciones del inóculo que se prepara .
- Evaluar el efecto de los hongos endófitos utilizados en este estudio con otros patógenos de especies forestales.
- Realizar un análisis de costos dentro del proyecto de laboratorio y dentro del proyecto de campo para determinar los beneficios económicos al utilizar hongos Fitopatógenos dentro del control biológico.

GLOSARIO

Antagonista: un antagonista definido en sentido amplio es un oponente o un adversario. En términos de control biológico, los antagonistas son agentes biológicos con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. Los patógenos pueden ser todo tipo de organismos: hongos, bacterias, nematodos, protozoos, virus, y plantas (CAMPBELL, 1989, p. 184).

Antagonismo: es toda acción directa o indirecta ejercida por microorganismos que resulta en la reducción de la expresión de enfermedad, la explotación del antagonismo por el hombre consiste en una modificación cuidadosa de equilibrio biocenótico para el beneficio de la planta cultivada (CAMPBELL, 1989, p.184).

Patógeno: Cualquier microorganismo que sea capaz de causar enfermedad en un organismo hospedador se denomina patógeno (Williamson, D., s/f, p.1).

Cultivo dual: Los cultivos duales se utilizan para evaluar dos mecanismos de antagonismo: competencia por sustrato y antibiosis. Se coloca en una caja Petri con medio un disco micelio del antagonista enfrentado al patógeno y se analiza el porcentaje de inhibición de crecimiento (Araya C, et al., 2012, p.3).

Inoculación: es la introducción voluntaria o accidental, por una herida de los tegumentos, del virus o el principio material de una enfermedad. También se llama así a la introducción de una sustancia en tejidos vivos o en medios de cultivo. Se inoculan sueros o vacunas con el objeto de curar o prevenir alguna enfermedad infecciosa; en ese caso se habla de inoculación curativa o preventiva (Alpizar, R, 2014, p.1).

Inóculo: es la sustancia que se inocula. . Suspensión de microorganismos que se transfieren a un ser vivo o a un medio de cultivo a través de la inoculación. (Alpizar, R, 2014, p.1)

Hospedero: En biología, se llama huésped, hospedador, hospedante y hospedero a aquel organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de parasitismo, comensalismo o mutualismo. (Cruz, A & Camargo B, s/f, p.1).

Relaciones simbióticas: La simbiosis corresponde a la interacción entre dos o más organismos biológicos, o simbiosis, los cuales pueden o no ayudarse para sobrevivir. Desde aquí es

que podemos observar (o desconocer) diferentes vínculos en la naturaleza que ayudan a comprender cuán majestuoso es el planeta y las especies que lo componen. (WWF, 2021, p.1)

Control biológico: la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o un parásito, en estado activo o durmiente, por la acción de uno o más organismos". Lo que siempre queda claro en todas es que en el control biológico interviene un tercer elemento vivo (junto con el huésped y el patógeno), que es el antagonista (Baker y Cook 1974, pp. 324-326).

Enzimas líticas: permiten al patógeno la penetración y expansión dentro de los tejidos vegetales y el uso de la PC como fuente de carbono. A su vez, estas enzimas son utilizadas por la planta para remodelación de la PC, entre otras funciones (Cantu. D., et al, 2008, p.862).

Metabolitos secundarios: son compuestos orgánicos producidos por bacterias, hongos o plantas los cuales no están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo o reproducción normal del organismo. A diferencia de los metabolitos primarios, la ausencia de metabolitos secundarios no produce la muerte inmediata, sino más bien un deterioro de la habilidad de supervivencia a largo plazo, Los metabolitos secundarios a menudo juegan un papel importante en las defensas de las plantas contra la herbivoría y otras defensas interespecies. (Knowledge, s/f, p.1)

Cámara de Neubauer: es un dispositivo de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan principalmente para el análisis de sangre (recuento de leucocitos, eritrocitos, trombocitos). Además, las cámaras de recuento sirven para contar bacterias, espermatozoides y esporas de hongo. (Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II, 2018, p.1)

Suspensión: Las suspensiones químicas son una mezcla heterogénea formada por un soluto que no se disuelve en la solución. Las suspensiones son soluciones inestables, ya que el soluto tiene la particularidad de sedimentar durante el transcurso del tiempo. (Bolívar, G. 2018, p.1)

BIBLIOGRAFIA

AEGERTER, B. J., et al. *Pitch Canker. A Technical Review. University of California. Agriculture and Natural Resources.*2003.p.13.

AGUSTÍ-BRISACH, C., et al.*Estudios preliminares sobre el control de Fusarium circinatum en semillas de Pinus spp. mediante tratamientos con agua caliente.* 5 o Congreso Forestal Español. Montes Y Sociedad: Saber Qué Hacer, 2009.p.

ARNOLD, A. E., et al. *Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003 100(26), pp.15649–15654.

ARAYA, J., et al. “Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea*”. *Agronomía mesoamericana*, [En línea], 2012, (Costa Rica) 23(2), pp.1-8. [Consulta: el 25 de noviembre de 2021]. ISSN: 1021-7444 Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v23n02_0225.pdf

BAKER, K. & COOK, R.*Biological Control of Plant Pathogens. W.H. Freeman and Company* (San Francisco).1974. Pp. 1-433 Disponible en: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/182-octubre-2006/biofungicidas-y-control-biologico-de-hongos-fitopatgenos-aplicacin-en-la-filosfera>

BAKER, R., et al. *Risk assessment of Gibberella circinata for the EU territory and identification and evaluation of risk management options.* 2010. European Food Safety Authority, 8(6), pp. 1–93. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.Available>

BARKA, E., et al. *Inhibitory effect of endophyte bacteria on Botrytis cinerea and its influence to promote the grapevine growth.* *Biological Control.* 2002. 24(2), 135–142. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00034-8)

BARRA, L.*Hongos endófitos nativos: soluciones específicas y un mundo por descubrir para el control de plagas y enfermedades en la agricultura.* (2021). Entrevista disponible en: <https://www.redagricola.com/cl/hongos-endofitos-nativos-soluciones-especificas-y-un-mundo-por-descubrir-para-el-control-de-plagas-y-enfermedades-en-la-agricultura/>

BARY, A. *Morphologie und physiologie der pilze, flechten, und myxomyceten.* Hofmeister's handbook of physiological botany, Leipzig, [Enlinea] Germany, Engelmann. 1866 pp. 1-222 [Consultado el 19 de Julio de 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=bUIAAAACAAJ&oi=fnd&pg=PR13&dq=Morphologie+und+physiologie+der+pilze,+flechten,+und+myxomyceten.+Hofmeister%E2%80%99s+handbook+of+physiological+botany,+Leipzig,&ots=QoyZZPG8l1&sig=EJwldw3T5rdg0KCqojssUHFJEiY#v=onepage&q&f=false>

BENÍTEZ, T., et al. *Biocontrol mechanisms of Trichoderma Strains.* *Int. Microbiol.* 7, 2004, pp. 249-260.

BERNAL, Vicente, et al. *Increased effectiveness of the Trichoderma harzianum isolate T-78 against Fusarium wilt on melon plants under nursery conditions.* *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009. 89(5). Pp .827–833. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3520>

BRITZ, H., et al. *Fusarium subglutinansf. sp. pinirepresents a distinct mating population in the Gibberellafujikuroispecies complex.* (1991). *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), pp.1198–1201.

BROCKERHOFF, E., et al. *Role of insect vectors in epidemiology and invasion risk of Fusarium circinatum, and risk assessment of biological control of invasive Pinus.* 2016. *Biological Invasions*, 18(4), 2016. Pp. 1177–1190.

CAMPBELL, R. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens.* Cambridge University Press. Cambridge (United States of America/ New York).1989, pp. 218. [Consulta: 18 de Noviembre de 2021] Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=IjncrR7zyG4C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Biological+Control+of+Microbial+Plant+Pathogens.&ots=YFiHVGOPYb0&sig=fLOOwNnQWeu giUMQ8TfN7IDGTo#v=onepage&q=Biological%20Control%20of%20Microbial%20Plant%20Pathogens.&f=false>

CANTU. D., et al. “The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to Botrytis cinerea”. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (3) (U.S.A), 2008, pp. 859-864. [Consulta: 25 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709813105>.

CARMONA, S.U. *Ingeniería Ecológica : efecto del uso de microorganismos de montaña sobre el suelo con base en dos cultivos agrícolas.* [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de Costa Rica 2017 pp. 26-30.

CARROLL, G. "Forest endophytes" *Pattern and process*, 1995 p.73. [consultado el 20 de julio de 2021] Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26923/1/Tesis%20Jazmin%20Salazar-OJ1.pdf>

CRUZ-R., et al. "Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines". *Instituto de Biología de la UNAM* . [En línea] s/f. (México, D. F).p. 123. ISBN 978-9-688-56878-1.[Consulta: el 25 de noviembre de 2021]. Disponible en:
<https://www.worldcat.org/title/glosario-de-terminos-en-parasitologia-y-ciencias-afines/oclc/49527838>

DE COSTA, D.M., & ERABADUPITIYA. "An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderiacepaciacomplex*". *Postharvest Biology and Technology*. [En línea], 2005, 36 pp. 31-39. [Consulta: 19 de Julio de 2021]Disponible en:
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092007000100009#:~:text=Los%20microorganismos%20antagonistas%20\(bacterias%2C%20levaduras,Wisniewski%20y%20Wilson%2C%201992\).](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092007000100009#:~:text=Los%20microorganismos%20antagonistas%20(bacterias%2C%20levaduras,Wisniewski%20y%20Wilson%2C%201992).)

DVORAK, W. S., et al. "Genetic variation in survival, growth, and stem form of *Pinus leiophylla* in Brazil and South Africa and provenance resistance to pitch canker". *SouthernHemisphereForestryJournal*. [En línea], 2007, (Brazil) 69(3), pp. 125–135.[Consulta: 22 de julio de 2021] Disponible en:
<https://doi.org/10.2989/SHFJ.2007.69.3.1.351>

DWINELL, L.D., et al. *Diseases of pines caused by the pitch canker fungus.* In: B.A. Summerell, J.F. Leslie, D. Backhouse & W.L. Bryden & L.W. Burgess (eds). *Fusarium*: 1988. Pp. 225-232.

FELDMANN, F., & HOMMES, M. *Endophytes for plant protection: the registration process at a glance.* 2013. En: C. Schneider, C. Leifert, & F. Feldmann (Eds.), *Endophytes*. pp.1- 347

FERNÁNDEZ, O., & VEGA, L. *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario*. Revista Manejo Integrado de Plagas, (2001) 62, 96-100. [Consulta: 21 de julio de 2021] Disponible en :<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2120E/A2120E.PDF>

FLORES, P. *Chancro resinoso del pino (Fusarium circinatum) Historia, evolución, dispersión y estrategias de Manejo*. 2017 Facultad de Recursos Naturales y Medio Ambiente, Bluefields Indian&Caribbean. [Consulta: 21 de julio de 2021] Disponible en: UniversityBICUfile:///C:/Users/USUARIO/Downloads/5170Texto%20del%20art%20C3%ADcul o-17796-2-10-20170913.pdf

GORDON, T. R. Resistance to pitch canker disease, caused by *Fusarium subglutinans* f. sp. pini, in Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Pathology*, vol 47, (1998), pp. 706–711.

GUNATILAKA, A.L. *Natural products from plant associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence*. 2006. *Journal of Natural Products*, 69(3), 509-526. doi:10.1021/ np058128n.

JOHNSON MC, et al. *Insect Feeding Deterrents in Endophyte-Infected Tall Fescue*. 1985. *Appl Environ Microbiol*. 49. Pp. 568-571.

JANKOWIAK, R. “Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings”. *Annals of Forest Science* 63, (2006), pp.801–808.

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE LOS TEJIDOS II. *La cámara de Neubauer*. [blog]. 2018. [Consulta: 26 de noviembre de 2021] Disponible en: <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>

MALINOWSKI, D.P., et al. *Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes*. 2005. *Plant and Soil*, 267(1–2), 1–12.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P. *In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum**. *Silva Fennica*, (2012). 46(3), 303–316. [consultado el 24 de julio de 2021] Disponible en: <https://doi.org/10.14214/sf.42>

MCCORMICK, M. K., et al. *Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. Molecular Ecology.* 2012. 21(6), pp. 1511–1523. disponible en <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05468.x>

MCNEE, W. R., et al. “Incidence of the pitch canker pathogen and associated insects in intact and chipped Monterey pine branches”. 2002. *Canadian Entomologist*, 134(1), pp. 47–58.

MELÉNDEZ GONZÁLEZ, C. Potencial aleloquímico del endófito *Edenia gomezpompae* sobre diferentes comunidades de hongos endófitos de plantas tropicales. 2008 Tesis de Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp. 1-113

MITCHELL, R.G., et al. “Future outlook for *Pinus patula* in South Africa in the presence of the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *Southern Forests: A Journal of Forest Science*”. n°74. 2012. (South Africa) pp. 203-210.

NIRENBERG, H. I., & O'DONNELL, K. “New *Fusarium* Species and Combinations within the *Gibberellafujikuroi* Species Complex. *Mycologia*”. 1998. [En línea] 90(3), p.434. [Consultado el 21 de julio de 2021] Disponible en: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/5170-Texto%20del%20art%C3%ADculo-17796-2-10-20170913.pdf>

OELMÜLLER, R., et al. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*, (2009) .49(1), 1–17. [Consulta: 21 de julio de 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0009-y>

PÉREZ, J. et al. “Seguimiento y gestión de las masas de *Pinus radiata* Don en la comarca de el Bierzo (León)”. *Cuadernos de La Sociedad Española de Ciencias Forestales*. [En línea] , 2004. (España) 253 249–253. [Consulta: 24 de julio de 2021] Disponible en: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/5170-Texto%20del%20art%C3%ADculo-17796-2-10-20170913.pdf>

ROBIN, C.; & HEINIGER, U.; “Chestnut blight in Europe: Diversity of *Cryphonectria* 66 parasítica, hypovirulence and biocontrol.” *Forest Snow and Landscape Research* n°76 (2001) (Europa), pp. 361–367.

RODRIGUEZ, R. J., et al. “Fungal endophytes: diversity and functional roles”. *Diversity and ecological roles. The new Phytologist*, n° 182(2) (2009), pp314-330.

AEGERTER, B. J., et al. “Susceptibility of Douglas fir (*Pseudotsugamenziesii*) to pitch canker, caused by *Gibberellacircinata* (anamorph=*Fusarium circinatum*)”. *PlantPathology*, [En línea]. 2006. 55(2), 231–237.[Consulta: 22 de Julio de 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01351.x>

SANCHEZ R., et al. “Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina”.(2013). (Ciudad de México) vol.16 no.2 pp. 1-5

SERRANO, Y., et al. *Survival of Fusarium circinatum in soil and Pinus radiata needle and branch segments*. *PlantPathology*, n°10(11).[En línea]. 2016. (España/Madrid), pp1-7. [Consultado el 12 de Julio de 2021]. Disponible en:http://sostenible.palencia.uva.es/system/files/publicaciones/serrano_et_al-2016-plant_pathology_0.pdf

SIVAN, A., et al. “Biological-control of *Fusarium* crown rot of 82 tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions”, n° 71 *Plant Disease*. (1987) pp. 587–592.

SORIA, S. et al. “Endophytic bacteria from *Pinus*. As biocontrol agents of *Fusarium circinatum* NIRENBERG & O’DONNELL” *Chilean journal of agricultural research* vol72(2).[En línea] 2012.(Uruguay/Montevideo), pp 281-283[Consulta: 25 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Raquel-Alonso>

STORER, A.J., et al. “The epidemiology of pitch canker of Monterrey pine in California”. *Forest Science*, n°48 (2002) (Estados Unidos), pp. 694-700.

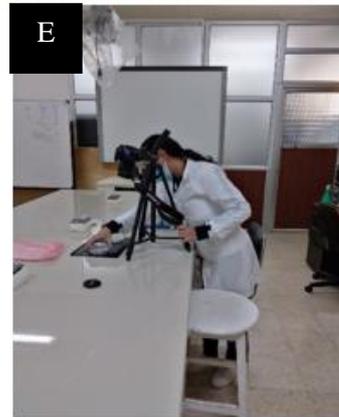
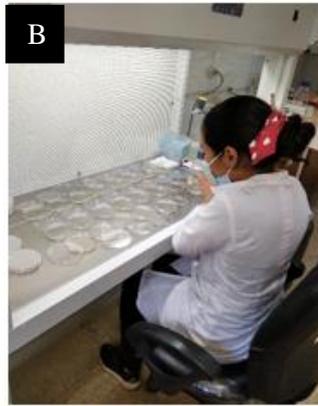
WILLIAMSON, D. “Interacción hospedador-patógeno y evasión inmunitaria”. *The British Society for Immunology*. [En línea] s/f. (Reino Unido), pp, 1-5. [consulta: 18 de noviembre de 2021]. Disponible en: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Host%20Pathogen%20interactions%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Host%20Pathogen%20interactions%20(1).pdf)


Cristian Castillo



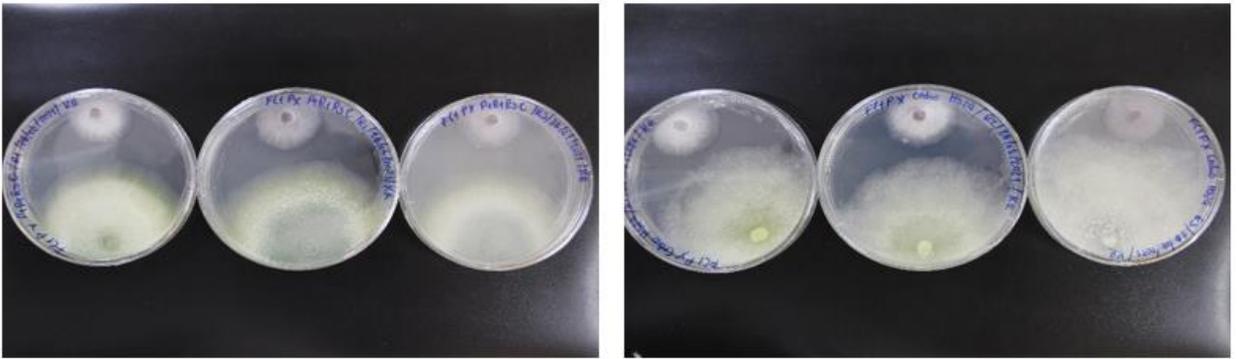
ANEXOS

ANEXO A: LABORES REALIZADAS EN LA FASE DE LABORATORIO.

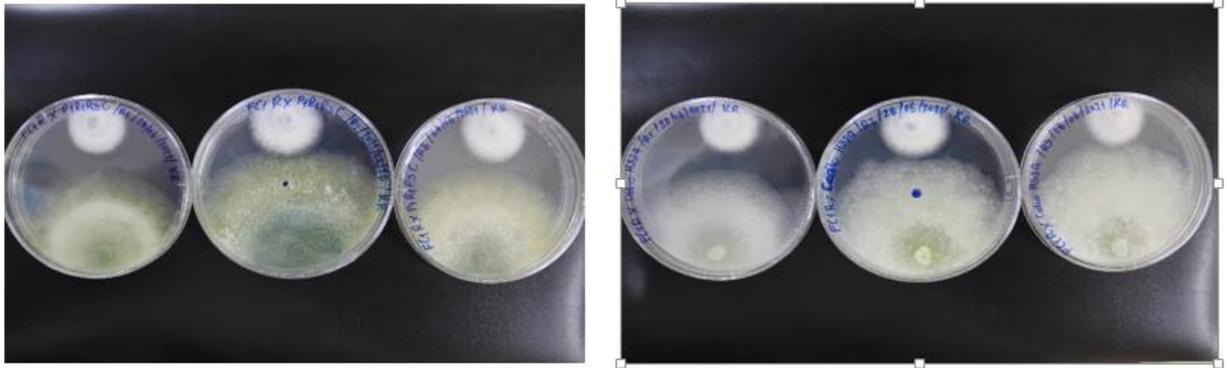


Preparación de medio (A), dispensión de medio en cámara de flujo laminar Biobase (B),siembra pura de cepas antagonistas y patógenos (C), medición diametral en cultivo dual (D) y toma de fotografías (E)

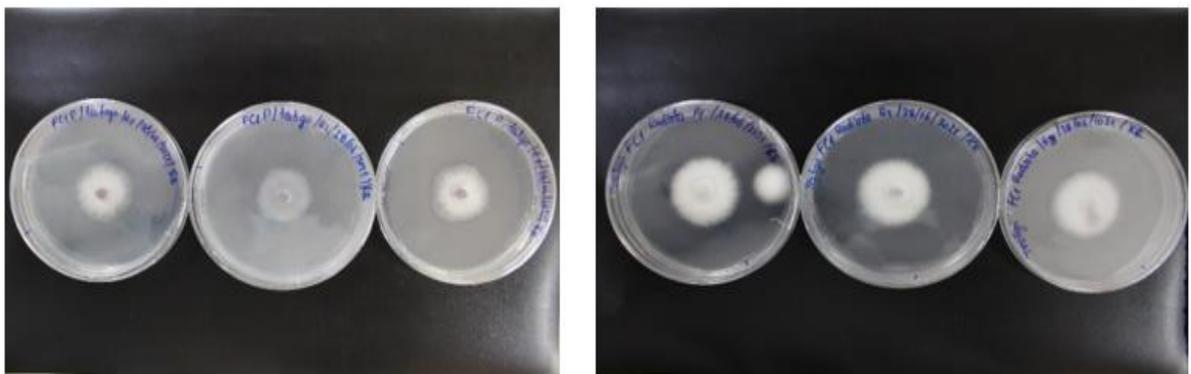
ANEXO B:SIEMBRA DUAL DE HONGOS ENDOFITOS FRENTE *AF.circinatum*



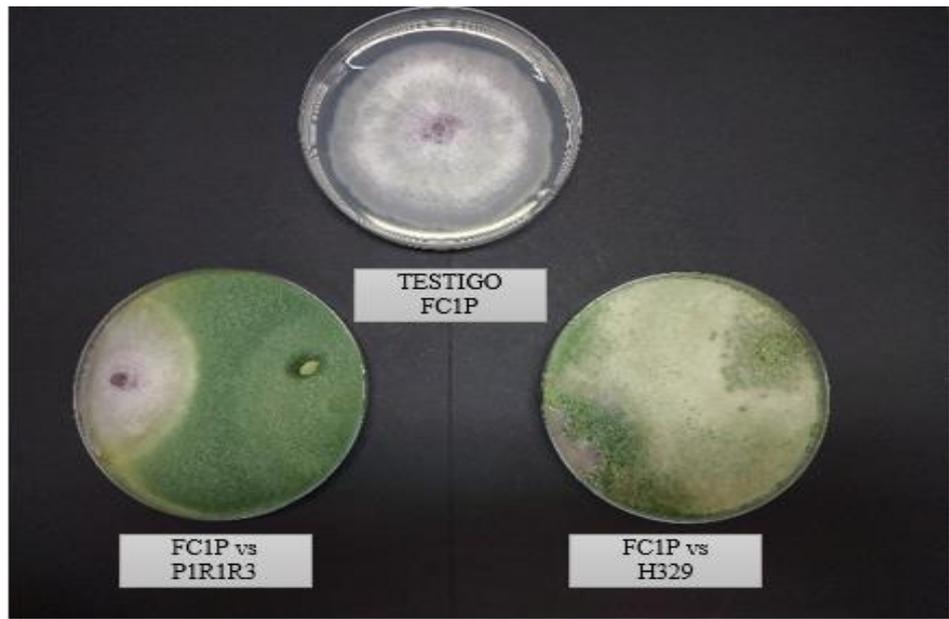
Fusarium circinatum (extremo superior)vs *Trichoderma* (extremo inferior)de *P.patula*



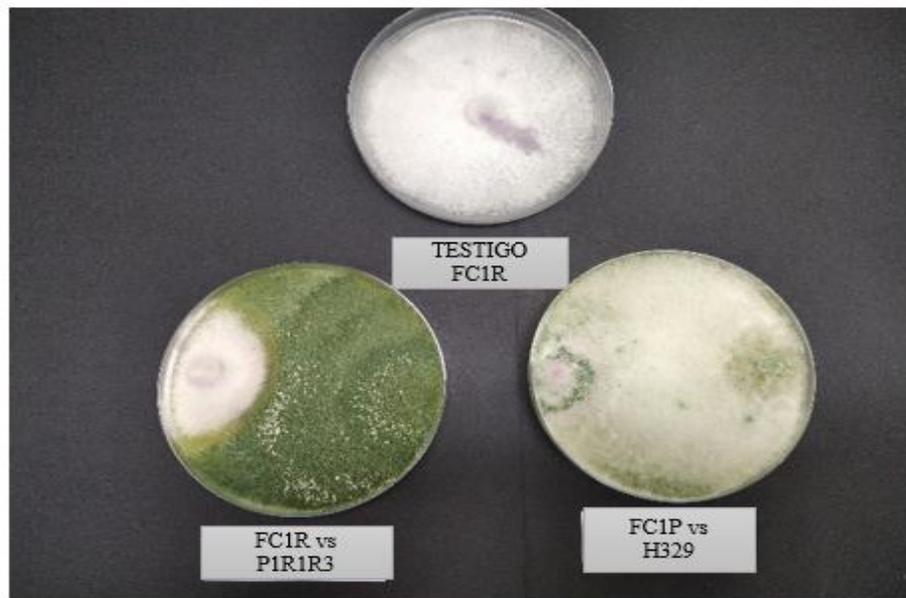
Fusarium circinatum (extremo superior)vs *Trichoderma* (extremo inferior) de *P.radiata*



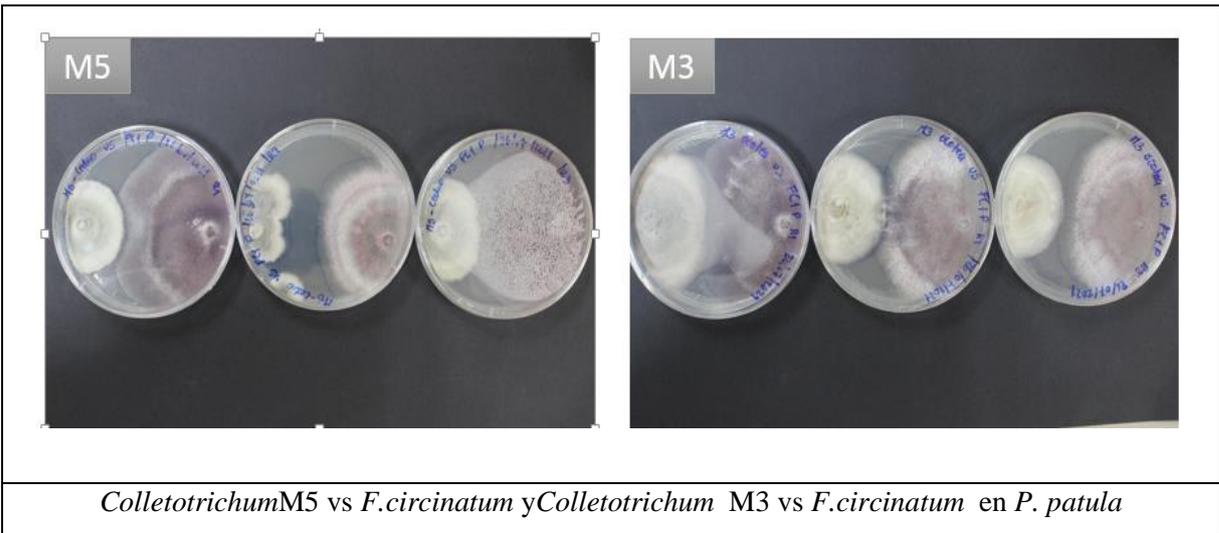
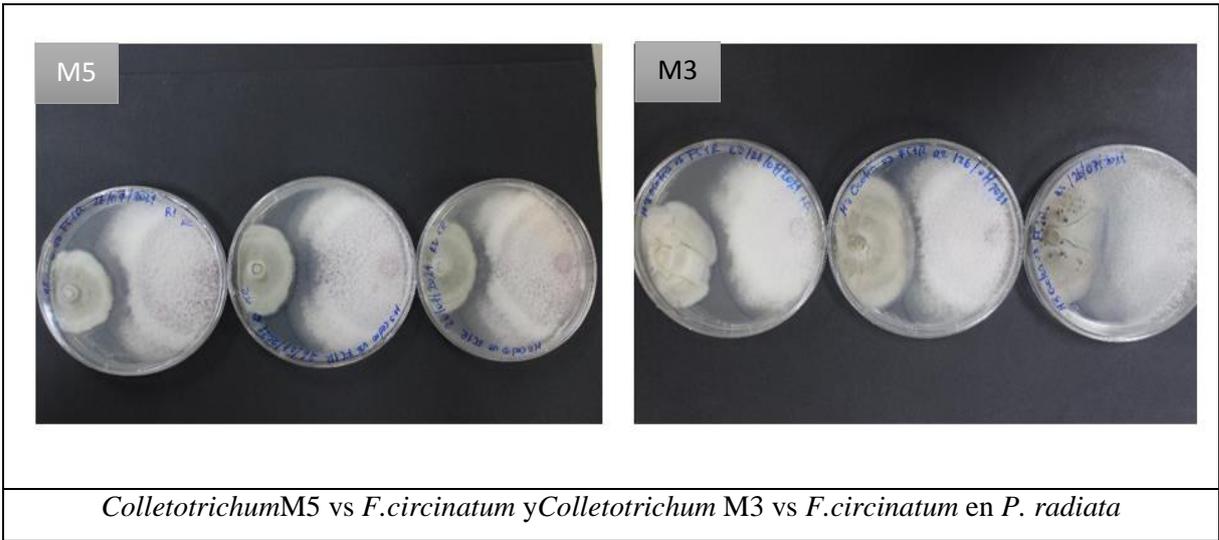
Fusarium circinatum(tratamiento testigo)



Enfrentamiento de *Trichoderma* vs *F. circinatum* en *P. patula*



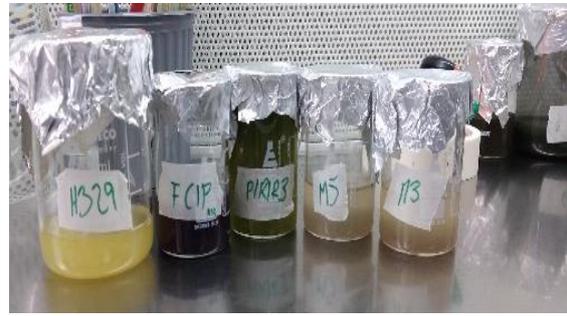
Siembra de *Trichoderma* y *Fusarium* *Pinus radiata*



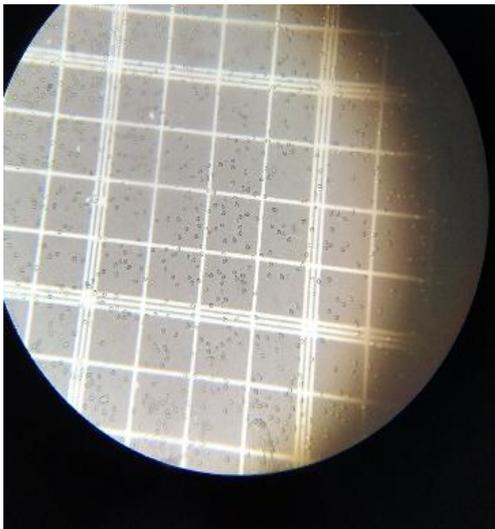
ANEXO C: PREPARACIÓN DE INÓCULO



Se raspò el micelio y esporas en suspension



Inòculo de cada uno de los tratamientos



Camara de Neubauer (esporas)



Conteo de esporas en microscopio

ANEXO D: LABORES REALIZADAS EN VIVERO

		
Inoculación con hongos endófitos al sustrato	Inoculación de <i>F. circinatum</i> por método de inyección	Medición de la altura

ANEXO E: REACCIÓN A LA INOCULACIÓN

Reacción de *Pinus patula* a los 15, 30 y 45 días





Plantas de *Pinus radiata* a los 15, 30 y 45 días

ANEXO F: TOMA DE DATOS DEL PESO DE LA PLANTULA Y DE LA RAIZ



Pesaje de la planta



Raíces secas infectadas con *F. circinatum*

ANEXO G: REAISLAMIENTO DE RAÍZ INFECTADAS CON *Fusarium circinatum*

	
Repique de raíces de <i>Pinus radiata</i> infectadas con <i>Fusarium circinatum</i>	Repique con raíces de <i>Pinus patula</i> infectadas con <i>Fusarium circinatum</i>

ANEXO H: ANALISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Trichoderma* EN *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Enfrentamiento	2	0.014671	0.007335	29.76	0.000768 ***
Error	6	0.001479	0.000246		

Códigos de significancia: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Realizado por: Rojas, K.,2022.

ANEXO I: ANALISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Trichoderma* EN *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Enfrentamiento	2	0.001292	0.0006462	2.258	0.186
Error	6	0.001717	0.0002861		

Códigos de significancia: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Realizado por: Rojas, K.,2022.

ANEXO J: ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL
Colletotrichum EN *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Enfrentamiento	3	0.001474	0.0004912	3.125	0.0878 .
Error	8	0.001258	0.0001572		

Códigos de significancias: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1

Realizado por: Rojas, K., 2022.

ANEXO K: ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL
Colletotrichum EN *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Enfrentamiento	3	0.0005146	0.0001715	1.544	0.277
Error	8	0.0008888	0.0001111		

Códigos de significancia: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1

Realizado por: Rojas, K., 2022.

ANEXO L: ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA EN *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	338,9	48,41	14,921	1,18e-10 ***
Tiempo	1	81,4	81,38	25,081	6,23e-06 ***
Factor: (repetición)	2	2,0	1,01	0,311	0,734
Tratamiento: tiempo	7	244,4	34,91	10,759	2,12e-08 ***
Error	54	175,2	3,24		

Códigos de significancia: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1

Realizado por: Rojas, K., 2022.

ANEXO M: ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA EN *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	974,6	139,23	21,44	2,14e-13 ***
Tiempo	1	292,1	292,07	4,987	1,33e-08 ***
Factor: (repetición)	2	21,3	10,67	1,644	0,203
Tratamiento: tiempo	7	531,6	75,95	11,698	6,89e-09 ***
Error	53	344,1	6,49		

Códigos de significancia: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1

Realizado por: Rojas, K., 2022.

ANEXO N: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL TAMAÑO DE LA RAIZ EN *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	69,39	9,913	1,433	0,268
Factor(repetición)	2	25,30	12,648	1,828	0,197
error	14	96,87	6,919		

Códigos de significancia: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1

Realizado por: Rojas, K., 2022.

ANEXO O: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL TAMAÑO DE LA RAIZ EN *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	4,865	0,695	0,310	0,9374
Factor(repetición)	2	18,941	9,470	4,227	0,0366 *
Error	14	31,369	2,241		

Códigos de significancia: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '^' 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO P: ANÁLISIS DE VARIANXA DEL PESO FRESCO DE LA PLANTA EN *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	0,9360	0,13372	1,402	0,279
Factor(repetición)	2	0,0106	0,00528	0,055	0,946
error	14	1,3356	0,09540		

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO Q. ANÁLISIS DE VARIANXA DEL PESO FRESCO DE LA PLANTA EN *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	16,38	2,3405	13,36	3,17e-05 ***
Factor(repetición)	2	3,99	1,9978	11,41	0,00115 **
error	14	2,45	0,1751		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 ' 0,1 ' 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO R. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DE LA RAIZ en *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	0,00423	0,00006	0,960	0,495
Factor(repetición)	2	0,00136	0,00069	1,095	0,362
error	14	0,00883	0,00063		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 ' 0,1 ' 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXOS. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DE LA RAIZ en *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	0,02219	0,00317	6,529	0,0015 **
Factor(repetición)	2	0,00802	0,00401	8,264	0,00427 **
error	14	0,00679	0,00048		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 ' 0,1 ' 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO T. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DEL TALLO en *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	0,00673	0,000962	1,101	0,414
Factor(repetición)	2	0,00069	0,000345	0,395	0,681
Error	14	0,01223	0,000874		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 ' 0,1 ' 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO U. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO DEL TALLO en *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	0,07626	0,01089	3,597	0,01985 *
Factor(repetición)	2	0,05783	0,02891	9,545	0,00243 **
error	14	0,04241	0,00302		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 . 0,1 ^ 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO V. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INCIDENCIA EN *P. patula*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	55170	7881	25,99	3,63e-15 ***
Tiempo	1	3701	37501	123,710	1,39e-15 ***
Factor(repetición)	2	54	27	0,089	0,915
Tratamiento: tiempo	7	22603	3229	10,652	2,46e-08 ***
error	54	16370	303		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 . 0,1 ^ 1

Realizado por: Rojas, K.2022

ANEXO W. ANÁLISIS DE VARIANZA DL PORCENTAJE DE INCIDENCIA EN *P. radiata*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>f)
Tratamiento	7	68129	9733	28,91	4,11e-16 ***
Tiempo	1	45839	45839	136,16	< 2e-16 ***
Factor(repetición)	2	0	0	0	1
Tratamiento: tiempo	7	27541	3934	11,69	6,11e-09 ***
error	54	18179	337		

Códigos de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 . 0,1 ^ 1

Realizado por: Rojas, K.2022



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26/05/2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A
Nombres – Apellidos: Kattia Lisbeth Rojas Gaviria
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Ingeniería Forestal
Título a optar: Ingeniera Forestal
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz


Ing. Cristhian Castillo



0808-DBRA-UTP-2022