



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

**EFEECTO DE ESPECIES DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO
DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL CANCER DE TRONCO DE
Gmelina arborea Roxb. (MELINA) EN PEDRO VICENTE
MALDONADO**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO FORESTAL

AUTOR:

KEVIN ANDRÉS BENALCÁZAR QUIÑÓNEZ

Riobamba – Ecuador

2023



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

**EFECTO DE ESPECIES DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO
DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL CANCER DE TRONCO DE
Gmelina arborea Roxb. (MELINA) EN PEDRO VICENTE
MALDONADO**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO FORESTAL

AUTOR: KEVIN ANDRÉS BENALCÁZAR QUIÑÓNEZ

DIRECTOR: Ing. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO PhD.

Riobamba – Ecuador

2023


© 2023, Kevin Andrés Benalcázar Quiñónez

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, Kevin Andrés Benalcázar Quiñónez, 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 autor 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, 29 de noviembre de 2023.



Kevin Andrés Benalcázar Quiñónez

0850219122

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

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **EFECTO DE ESPECIES DE *Trichoderma* EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL CANCER DE TRONCO DE *Gmelina arborea* Roxb. (MELINA) EN PEDRO VICENTE MALDONADO**, realizado por el señor: **KEVIN ANDRÉS BENALCÁZAR QUIÑÓNEZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del 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. Rosa del Pilar Castro Gómez PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-11-29
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero PhD. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-11-29
Ing. Carlos Francisco Carpio Coba MSc. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-11-29

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a Dios por haberme dado la sabiduría y la capacidad de culminar con este proceso académico, a mi madre por ser el pilar fundamental en mi vida, por todo su amor y apoyo incondicional en este arduo proceso formativo para poder cumplir con una de mis metas.

Kevin

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por renovar mis fuerzas a diario en este proceso formativo, por mantenerme con vida y lleno de salud en todo momento. A mi madre por su incondicional apoyo desde el primer día, de igual manera a mis hermanos por su apoyo durante este proceso.

A la parte administrativa de la empresa SERAGROFOREST S.A. por abrirme las puertas para poder ejecutar este trabajo investigativo, en especial al Ingeniero Mauricio Tapia por la confianza brindada. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y docentes de la Facultad de Recursos Naturales específicamente de la carrera de Forestal por haberme formado académicamente.

De manera muy especial al Ing. Pablo Álvarez PhD, por haber impartido todos sus conocimientos para culminar el presente trabajo investigativo de la mejor manera. Al ing. Álvaro Rivera por el aprecio brindado y por todas las enseñanzas impartidas en el laboratorio de Fitopatología.

Kevin

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
1.1	Planteamiento del problema	3
1.2	Objetivos.....	3
1.2.1	<i>Objetivo General</i>	3
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	3
1.3	Justificación.....	3
1.4	Hipótesis	4
1.4.1	<i>Nula</i>	4
1.4.2	<i>Alternante</i>	4

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1	Referencias teóricas.....	5
2.1.1	<i>Cáncer de tronco</i>	5
2.1.2	<i>Agentes fúngicos asociados al cáncer de trono de Melina</i>	6
2.1.2.1	<i>Fusarium sp.</i>	6
2.1.2.2	<i>Ceratocystis sp.</i>	7
2.1.2.3	<i>Hongos asociados al cáncer de trono de Melina</i>	9

2.1.3	<i>Gmelina arborea</i>	10
2.1.3.1	<i>Taxonomía</i>	10
2.1.3.2	<i>Generalidades</i>	10
2.1.3.3	<i>Condiciones edafoclimáticas</i>	11
2.1.3.4	<i>Descripción botánica</i>	11
2.1.4	<i>Métodos de caracterización de microorganismos fúngicos</i>	12
2.1.4.1	<i>Caracterización cultural</i>	12
2.1.4.2	<i>Caracterización morfológica</i>	13
2.1.4.3	<i>Caracterización molecular</i>	14
2.1.5	<i>Microorganismos antagonistas</i>	15
2.1.6	<i>Trichoderma spp.</i>	15
2.1.6.1	<i>Generalidades</i>	15
2.1.6.2	<i>Taxonomía</i>	16
2.1.6.3	<i>Mecanismos de acción</i>	16

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLOGICO	19
3.1	Materiales y métodos	19
3.1.1	<i>Caracterización del lugar</i>	19
3.1.1.1	<i>Localización de campo</i>	19
3.1.1.2	<i>Localización de laboratorio</i>	20
3.1.2	<i>Materiales y equipos</i>	21
3.1.2.1	<i>De campo</i>	21
3.1.2.2	<i>De laboratorio</i>	21
3.1.2.3	<i>De escritorio</i>	23
3.2	Metodología	23
3.2.1	<i>Fase de campo</i>	23
3.2.1.1	<i>Incidencia de la enfermedad</i>	23

3.2.1.2	<i>Severidad de la enfermedad</i>	23
3.2.1.3	<i>Recolección de muestras</i>	24
3.2.2	<i>Fase de laboratorio</i>	26
3.2.2.1	<i>Aislamiento de microorganismos en medio de cultivo PDA</i>	26
3.2.2.2	<i>Purificación de microbiota asociada al cáncer de tronco de Gmelina arborea</i>	27
3.2.2.3	<i>Conservación de aislados puros de microorganismos asociados al cáncer de tronco de Gmelina arborea</i>	28
3.2.2.4	<i>Caracterización cultural</i>	28
3.2.2.5	<i>Caracterización morfológica</i>	28
3.2.2.6	<i>Caracterización molecular</i>	28
3.2.2.7	<i>Caracterización patogénica</i>	32
3.2.2.8	<i>Re-aislamiento de aislados</i>	33
3.2.2.9	<i>Diseño y análisis estadístico</i>	34
3.2.2.10	<i>Reactivación de especies de Trichoderma</i>	34
3.2.2.11	<i>Siembra dual</i>	34
3.2.2.12	<i>Variables evaluadas</i>	35
3.2.2.13	<i>Análisis de datos</i>	36

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	38
4.1	Incidencia y severidad de la enfermedad cáncer de tronco	38
4.1.1	<i>Incidencia de la enfermedad</i>	38
4.1.2	<i>Severidad de la enfermedad</i>	39
4.1.2.1	<i>Descripción de la sintomatología</i>	40
4.1.3	<i>Caracterización cultural, morfológica y molecular</i>	42
4.1.4	<i>Evaluación cualitativa de los síntomas causados por Fusarium solani</i>	48
4.1.5	<i>Evaluación cualitativa de los síntomas causados por Nectria pseudotrichia</i>	50
4.1.6	<i>Re-aislamiento</i>	53

4.1.7	<i>Tasa de crecimiento micelial de Fusarium solani en confrontación con Trichoderma spp.</i>	54
4.1.8	<i>Tasa de crecimiento micelial de Nectria pseudotrichia en confrontación con Trichoderma spp.</i>	56
4.1.9	<i>Tasa de crecimiento micelial de Trichoderma spp. en confrontación con cepas de fusarium solani</i>	56
4.1.10	<i>Tasa de crecimiento micelial de Trichoderma spp. en confrontación con cepas de Nectria pseudotrichia</i>	58
4.1.11	<i>Porcentaje de inhibición de la confrontación de Trichoderma spp. vs Fusarium solani al séptimo día de la siembra dual</i>	59
4.1.12	<i>Porcentaje de inhibición de la confrontación de Trichoderma spp. vs Nectria pseudotrichia al séptimo día de la siembra dual</i>	61
4.1.13	<i>Capacidad antagónica de Trichoderma spp. sobre Fusarium solani</i>	63
4.1.14	<i>Capacidad antagónica de Trichoderma spp. sobre Nectria pseudotrichia</i>	64
4.2	Discusión	64

CAPITULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
5.1	Conclusiones	69
5.2	Recomendaciones	70

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1: Escala para la calificación del grado de severidad de la pudrición del tronco de <i>G. arborea</i>	5
Tabla 2-2: Clasificación taxonómica de <i>Fusarium</i>	7
Tabla 2-3: Clasificación taxonómica de <i>Ceratocystis</i> sp.	8
Tabla 2-4: Clasificación taxonómica de <i>Gmelina arborea</i>	10
Tabla 2-5: Características morfológicas de consideración.....	13
Tabla 2-6: Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i>	16
Tabla 3-1: Información de aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	22
Tabla 3-2: Escala de notas de cinco clases propuesta por Salas et al., (2015) para evaluar la severidad de la enfermedad de pudrición del fuste en <i>G. arborea</i>	24
Tabla 3-3: Información de las muestras recolectadas	25
Tabla 3-4: Protocolo de extracción de ADN.....	29
Tabla 3-5: Primers utilizados para aislados de <i>Nectria</i>	30
Tabla 3-6: Primers utilizados para hongos del género <i>Fusarium</i>	30
Tabla 3-7: Escala propuesta para evaluar daño a nivel vascular de pudrición en <i>G. arborea</i>	33
Tabla 3-8: Tratamientos para inoculación de plantas de melina.....	34
Tabla 3-9: Escala de estimación de micoparasitismo	35
Tabla 3-10: Tratamientos evaluados	36
Tabla 4-1: Incidencia de la enfermedad en el Predio Pizará.....	38
Tabla 4-2: Severidad de la enfermedad en los sectores del predio Pizará	40
Tabla 4-3: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Fusarium solani</i>	43
Tabla 4-4: Características culturales de los morfotipos asociados a <i>Nectria pseudotrichia</i>	45
Tabla 4-5: Identificación molecular mediante análisis BLASTn de las cepas del género <i>Fusarium</i> y <i>Nectria</i> alineadas de la base de datos del NCBI.....	47
Tabla 4-6: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial M012A	55
Tabla 4-7: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial M026B	55

Tabla 4-8: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial M005B	56
Tabla 4-9: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M012A	57
Tabla 4-10: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M018A	57
Tabla 4-11: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M026B.....	58
Tabla 4-12: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M015A	59
Tabla 4-13: Prueba de Tukey al 5% de porcentaje de inhibición micelial en M012A.....	60
Tabla 4-14: Prueba de Tukey al 5% de porcentaje de inhibición micelial en M026B.....	61
Tabla 4-15: Prueba de Tukey al 5% de porcentaje de inhibición micelial en M005B.....	62
Tabla 4-16: Capacidad antagonista según escala de Bell et al.....	63
Tabla 4-17: Capacidad antagonista según escala de Bell et al.....	64

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1: Corte longitudinal y transversal en árboles de melina enfermos por <i>Ceratocystis</i> evidenciando daños vasculares.	9
Ilustración 2-2: Planta de <i>G. arborea</i> y sus partes	12
Ilustración 2-3: Micoparasitismo por <i>Trichoderma hyphae</i> , enrollamiento alrededor de las hifas.	17
Ilustración 3-1: Localización de rodales muestreados.....	19
Ilustración 3-2: Ubicación del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales-ESPOCH.....	20
Ilustración 3-3: Obtención de muestras.....	26
Ilustración 3-4: Obtención de prismas.....	27
Ilustración 4-1: Incidencia de la enfermedad por rodales.....	39
Ilustración 4-2: Incidencia de la enfermedad por sectores	39
Ilustración 4-3: Síntomas de la enfermedad cáncer de tronco en árboles de melina.	41
Ilustración 4-4: Cortes transversales en la base de los árboles de melina (aproximadamente 5 cm) enfermos con cáncer de tronco.	41
Ilustración 4-5: Cortes transversales en el fuste de los árboles de melina enfermos (entre 80 cm y 150 cm).....	42
Ilustración 4-6: Características culturales de <i>fusarium solani</i> , cultivado en medio PDA.	44
Ilustración 4-7: Características morfológicas de <i>Fusarium solani</i> , cultivado en medio PDA. .	44
Ilustración 4-8: Características culturales de <i>Nectria pseudotrichia</i> cultivado en medio PDA.	46
Ilustración 4-9: Sintomatología externa en plantas inoculadas con <i>Fusarium solani</i>	48
Ilustración 4-10: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas sin herida con <i>Fusarium solani</i>	49
Ilustración 4-11: Severidad presente en plantas inoculadas sin herida con <i>Fusarium solani</i> ...	49
Ilustración 4-12: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas con herida con <i>Fusarium solani</i>	50
Ilustración 4-13: Severidad presente en plantas inoculadas con herida con <i>Fusarium solani</i> ..	50
Ilustración 4-14: Sintomatología externa en plantas inoculadas con <i>Nectria pseudotrichia</i>	51

Ilustración 4-15: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas sin herida con <i>Nectria pseudotrichia</i>	52
Ilustración 4-16: Severidad presente en plantas inoculadas sin herida con <i>Nectria pseudotrichia</i>	52
Ilustración 4-17: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas sin herida con <i>Nectria pseudotrichia</i>	53
Ilustración 4-18: Severidad presente en plantas inoculadas con herida con <i>Nectria pseudotrichia</i>	53
Ilustración 4-19: Características culturales y morfológicas de <i>Fusarium solani</i> y <i>Nectria pseudotrichia</i>	54
Ilustración 4-20: Porcentaje de inhibición de la confrontación de <i>Trichoderma</i> spp. vs M012A.....	60
Ilustración 4-21: Porcentaje de inhibición de la confrontación de <i>Trichoderma</i> spp. vs M026B	61
Ilustración 4-22: Porcentaje de inhibición de la confrontación de <i>Trichoderma</i> spp. vs M005B.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

ANEXO B: AISLAMIENTO

ANEXO C: PREPARACIÓN DEL MEDIO SNA

ANEXO D: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS FÍSICA)

ANEXO E: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS QUÍMICA)

ANEXO F: PCR

ANEXO G: ELECTROFORESIS

ANEXO H: SIEMBRA DUAL

ANEXO I: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Fusarium solani* (M018A)

ANEXO J: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Fusarium solani* (M012A)

ANEXO K: CONFRONTAMIENTO DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. CON *Fusarium solani*
(M026B)

ANEXO L: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Ceratocystis fimbriata*
(M005B)

ANEXO M: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Ceratocystis fimbriata*
(M015A)

ANEXO N: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M012A

ANEXO O: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M018A

ANEXO P: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M026B

ANEXO Q: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M005B

ANEXO R: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M015A

ANEXO S: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma*
spp. vs M012A

ANEXO T: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma*
spp. vs M018A

ANEXO U: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma*
spp. vs M026B

ANEXO V: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M005B

ANEXO W: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M015A

ANEXO X: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M012A

ANEXO Y: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M018A

ANEXO Z: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M026B

ANEXO AA: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M005B

ANEXO AB: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M015A

RESUMEN

Se desconoce el agente causal del cáncer de tronco en plantaciones de melina en Ecuador. Sin embargo, esta enfermedad está afectando el rendimiento de las plantaciones de melina de la empresa Endesa S.A. en el predio Pizará, que se encuentra en el cantón Pedro Vicente Maldonado. por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de seis especies de *Trichoderma* en el crecimiento de la microbiota asociada al cáncer de tronco de melina (*Gmelina arborea* Roxb.) en Pedro Vicente Maldonado. La metodología empleada tuvo una fase de campo y otra de laboratorio, donde se realizó el análisis de incidencia y severidad de la enfermedad a dos parcelas por cada rodal a muestrear, se obtuvieron las muestras de fustes leñosos de árboles sintomáticos, se procedió al aislamiento de los microorganismos a partir de las muestras recolectadas, se procedió a la caracterización cultural, morfológica, molecular y patogénica para comprobar su patogenicidad en plantas de melina. Posteriormente se realizaron confrontaciones entre agentes patógenos (*Fusarium solani* y *Nectria pseudotria*) y agentes biológicos (especies de *Trichoderma*) para evaluar los mecanismos de acción de las diferentes especies de *Trichoderma*. Mediante esta metodología se identificó a *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrichia* como agentes patógenos asociados al cáncer de tronco en plantaciones de melina, así como también a *Trichoderma resei* como el mejor antagonista para ambos patógenos en las variables de competencia por espacio y nutrientes, porcentaje de inhibición y micoparasitismo. Se concluye que existen diversos niveles de antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a cepas de *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrichia*, agentes causantes de la enfermedad denominada cáncer de tronco en plantaciones de melina del predio resumen Pizará perteneciente a la empresa Endesa S.A.

Palabras clave: <ANTAGONISMO>, <CÁNCER DE TRONCO>, <CARACTERIZACIÓN>, <CONTROL BIOLÓGICO>, <INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO>, <PATOGENICIDAD>.




ABSTRACT

The causal agent of trunk cancer in Melina plantations in Ecuador is unknown. However, this disease is affecting the performance of the Melina plantations of the company Endesa S.A. on the Pizará property, which is located in the Pedro Vicente Maldonado canton. Therefore, the objective of the present investigation was to evaluate the effect of six *Trichoderma* species on the growth of the microbiota associated with Melina trunk cancer (*Gmelina arborea* Roxb.) in Pedro Vicente Maldonado. The methodology used had a field phase and a laboratory phase, where disease incidence and severity were analyzed in two plots for each stand to be sampled. Samples of woody stems of symptomatic trees were obtained, and the isolation of the microorganisms from the collected samples, the cultural, morphological, molecular, and pathogenic characterization was carried out to verify their pathogenicity in Melina plants. Subsequently, confrontations were carried out between pathogenic agents (*Fusarium solani* and *Nectria pseudotrichia*) and biological agents (*Trichoderma* species) to evaluate the mechanisms of action of the different *Trichoderma* species. *Fusarium solani* and *Nectria pseudotrichia* were identified as pathogenic agents associated with trunk cancer in melina plantations, as well as *Trichoderma resei* as the best antagonist for both pathogens in the variables of competition for space and nutrients, percentage of inhibition, and mycoparasitism. It is concluded that there are various levels of antagonism of *Trichoderma* spp. against strains of *Fusarium solani* and *Nectria pseudotrichia*. These agents caused the disease called trunk cancer in Melina plantations on the Pizará property of Endesa S.A.

Keywords: <ANTAGONISM>, <TRUNK CANCER>, <CHARACTERIZATION>, <BIOLOGICAL CONTROL>, <GROWTH INHIBITION>, <PATHOGENICITY>.

Riobamba, December 10th, 2023



Ph.D. Dennys Tenclanda López
ID number: 0603342189

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país que ha presentado un auge económicamente en el sector forestal debido a la producción de especies exóticas como lo es la *Gmelina arborea*, especie que se distribuye en países tropicales a lo largo del mundo, considerando un rango altitudinal comprendido entre los 0 y 900 msnm, con precipitaciones medias anuales que oscilan de 1000 a 4500 mm, se considera de rápido crecimiento al alcanzar un turno de rotación a los 12 años (Jiménez, 2016, p. 29).

La introducción de *G. melina* en gran parte del mundo se debe a que es en una especie muy solicitada en los mercados forestales (Ruiz Blandon et al., 2020: p.95). En 2003 se estimaba la existencia de 700.000 ha de plantaciones, lotes y sitios agroforestales de melina en Asia, África, Pacífico Sur y América Latina (Dvorak, 2004, p.111). En Ecuador, esta especie representa un rubro económico de gran importancia; en 2015, de las 52.495 ha de superficie plantada con especies forestales, el 21,9% correspondió a melina (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2016, p.4).

Las plantaciones de Melina se han visto afectadas principalmente por hongos, quienes causan las enfermedades a través de infecciones producidas por dichos agentes patógenos. A lo largo de América tropical la enfermedad que predomina en Melina se conoce como “Cáncer de tronco”, que llega a producir la muerte en pie de los árboles infectados, lo cual genera pérdidas económicas representativas en zonas rurales principalmente donde constituye una fuente de empleo (Arguedas et al., 2018: p.2).

Actualmente la enfermedad cáncer de tronco se distribuye en casi todas las plantaciones de Melina en el trópico húmedo ecuatoriano, no obstante, no se determina claramente su etiología, ni mecanismos eficientes de control para dicha enfermedad.

En Latinoamérica, donde melina es exótica, varios estudios (Arguedas et al., 2012; Coy-Rodríguez et al., 2018; Méndez-Álvarez et al., 2020; Meza et al., 2020; Salas et al., 2016) han reportado la presencia de organismos patógenos, que causan problemas en diversas partes de la planta de melina. Mientras que en Ecuador se ha investigado (Belezaca et al., 2021a, Belezaca et al., 2021b; Belezaca y Solano, 2022; Canchignia y Tercero, 2020) el rol organismos fúngicos como *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. en la patogénesis de melina. Frente a este escenario existen ensayos (Canchignia y Tercero, 2020; Chavarría y Carmona, 2016), enfocados en la inhibición del crecimiento micelial de hongos patógenos, como *Fusarium* sp., en melina a través de *Trichoderma* sp. como agentes biológicos de control.

Trichoderma spp. constituye un mecanismo de control biológico eficiente de agentes fungosos por lo que es usado en aplicaciones agrícolas relacionadas con enfermedades de las plantas, así como también al crecimiento de las mismas (Zin y Badaluddin, 2020: p.168). Se conocen alrededor de 300 especies de *Trichoderma*, resaltado por su efectividad en la supresión de agentes patógenos, facilitando su adaptación a diferentes tipos de suelos forestales. (Martínez,2013: pp.1-11).

Esta investigación tuvo como objetivo principal de evaluar el efecto de seis especies de *Trichoderma* en el crecimiento de la Microbiota asociada al cáncer de tronco de *Gmelina arborea* Roxb. (Melina) en Pedro Vicente Maldonado. Los objetivos específicos planteados fueron: caracterizar los hongos asociados al cáncer de tronco en plantaciones de melina en el predio Pitzarà de la empresa Endesa, y medir el efecto de alternativas biológicas in vitro para el manejo de hongos asociados al cáncer de tronco en plantaciones de melina en el predio Pitzarà de la empresa Endesa.

Este estudio se desarrolló de manera exploratoria, en donde las muestras analizadas provienen de rodales de distintos sectores del Predio Pitzarà con edad comprendida entre 1 y 2 años y para la selección de rodales se tomó en cuenta la incidencia de la enfermedad histórica registrada por la empresa en su intervención fitosanitaria, para la selección de las muestras se consideró la presencia de síntomas ocasionados por la enfermedad, tales como, rebrotes, manchas necróticas en el fuste y amarillamiento.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 Planteamiento del problema

Se desconoce el agente etiológico de control a la enfermedad denominada cáncer de tronco en melina en el Ecuador y a su vez existe escasa información respecto al tema. El cáncer de tronco está afectando en las plantaciones de melina de la empresa Endesa S.A. en el predio Pizará ubicado en el cantón Pedro Vicente Maldonado, por tal razón existe la necesidad de identificar al agente causal del cáncer de tronco en plantaciones forestales de *Gmelina arborea* Roxb., para la toma de decisiones de manejo en lo que respecta al control.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo General*

Evaluar el efecto de seis especies de *Trichoderma* en el crecimiento de la Microbiota asociada al cáncer de tronco de *Gmelina arborea* Roxb. (Melina) en Pedro Vicente Maldonado.

1.2.2 *Objetivos específicos*

Caracterizar los hongos asociados al cáncer de tronco en plantaciones de melina en el predio Pizará de la empresa Endesa.

Medir el efecto de alternativas biológicas in vitro para el manejo de hongos asociados al cáncer de tronco en plantaciones de melina en el predio Pizará de la empresa Endesa.

1.3 Justificación

La melina es una especie arbórea maderable con alto interés en la industria nacional e internacional especialmente para la producción de pulpa de papel, debido a sus características de rápido crecimiento y adaptabilidad a diferentes tipos de climas, adicionalmente debido al resalte en las características de la madera le ha permitido convertirse en una de las maderas más importantes en el Ecuador, debido a que entre albura y duramen existe variación en sus colores, más no en la calidad de la madera, se ha generado una alta demanda para la elaboración de pallets.

Por tal razón es necesario evaluar a nivel *in vitro* cepas de *Trichoderma* como alternativa biológica potencial para el manejo de la enfermedad denominada cáncer de tronco. Para ello es de vitalidad la identificación a nivel de especie de los microorganismos asociados a la enfermedad mediante el aislamiento y caracterización morfológica, cultural y molecular en plantaciones de melina.

1.4 Hipótesis

1.4.1 Nula

La diversidad de hongos caracterizados asociados al cáncer de tronco en melina en los tres sectores del predio Pizará de la empresa Endesa no difieren

1.4.2 Alternante

La diversidad de hongos caracterizados asociados al cáncer de tronco en melina en los tres sectores del predio Pizará de la empresa Endesa difieren

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Referencias teóricas

2.1.1 *Cáncer de tronco*

Los árboles enfermos de *G. arborea*, presentan una sintomatología caracterizada por corteza resquebrajada y ennegrecida en áreas extensas y alargadas; desarrollo del hongo en la corteza, el cual invade el fuste donde se producen rebrotes y exudados; los árboles se marchitan, llegando a secarse; y finalmente, la muerte descendente del árbol (Meza et al., 2020: p.16; Arguedas, 2012, p.7). Salas et al. (2016: p.10), propusieron una escala diseñada para categorizar el nivel de gravedad de la descomposición en el tronco de los árboles de melina, y los detalles de esta escala se encuentran en la Tabla 1-2., permitiendo comprender cómo los síntomas inician, con marchitez y pérdida foliar, hasta finalizar con pudrición.

Tabla 2-1: Escala para la calificación del grado de severidad de la pudrición del tronco de *G. arborea*.

Grado de severidad	Síntomas
1	Árbol sano, no hay evidencia de síntomas visibles.
2	Marchitez foliar evidente; el fuste puede tener pequeñas heridas necrosadas y con exudación negra en sitios diferentes a donde hubo podas; puede iniciar la aparición de rebrotes. No todos los síntomas se expresan.
3	El árbol está visiblemente enfermo. Hay lesiones tipo cancro en la corteza con indicios de pudrición, exposición y abultamiento de la corteza, exudación prominente; pérdida de más de un 50 % del área foliar en un patrón progresivo; rebrotes desarrollados.
4	Afectación total del individuo; ausencia total de follaje; hay pérdida y desprendimiento evidente de ramas; aún se observan rebrotes en algunos sectores del tronco; la pudrición alcanza un 75 % del tronco, donde la zona cancerosa (cancro) se manifiesta con claridad.
5	Árbol completamente seco, podrido; la madera ya perdió completamente su valor comercial.

Fuente: Salas et al., 2016: p.10.

2.1.2 Agentes fúngicos asociados al cáncer de tronco de Melina

Alrededor del 90% de las enfermedades en árboles se debe a una infección producida por hongos; los principales patógenos forestales corresponde a los Ascomycetes (Prospero et al., 2021: p.2). La mayoría de las plantaciones de melina, se presenta una enfermedad de origen fúngico que causa marchitez en el sistema vascular y deterioro en el tronco, afectando a algunos árboles de melina. En varias partes de América tropical se la conoce como “enfermedad de Nectria”, “muerte súbita de melina” o “cáncer de tronco de melina”; la muerte, en pie, de los árboles de melina ocasiona serias pérdidas económicas en zonas rurales, donde constituye una fuente de empleo (Belezaca et al., 2021a: p.311; Arguedas et al., 2018: p.2).

Alrededor de 36 agentes causales (registrados) limitan el desarrollo de *G. arborea*, catalogando como principal a *Nectria* sp. (Meza et al., 2020: p.10). *Nectria* sp., genera cancro o cáncer, caracterizado por una corteza resquebrajada y ennegrecida, invasión del fuste, marchitez, rebrotes en la parte inferior del fuste y exudaciones oscuras, finalizando con la muerte del árbol (Consejo Forestal ACAHN, 2014, p.13). También se ha descrito, como agente causal de la enfermedad, a *Ceratocystis fimbriata*, sin embargo, se considera que *Fusarium* spp. está implicado en la patogénesis, debido a su frecuente aislamiento en árboles de melina enfermos (Belezaca et al., 2021b: p.32).

2.1.2.1 *Fusarium* sp.

Taxonomía:

El género *Fusarium* está compuesto por más de 1.500 especies, perteneciente a la familia Nectriaceae, es uno de los grupos de hongos fitopatógenos más importantes, en la Tabla 2-2 se detalla su clasificación taxonómica. Afecta a una gran diversidad de cultivos, es patógeno humano y genera ciertas micotoxinas que tienen efectos nocivos en el ganado y seres humanos (Summerell, 2019, p.2; Arie, 2019, p.275).

Tabla 2-2: Clasificación taxonómica de *Fusarium*.

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>

Fuente: Zhang y Ma, 2017, p.180.

Signos y síntomas:

Las especies de *Fusarium* inducen la muerte celular al infectar todas las partes de la planta huésped. Generan toxinas (fitotóxicas y micotóxicas), las cuales modulan la fisiología vegetal para favorecer su multiplicación y colonización (Gurdaswani y Ghag, 2020: p.7). Las plantas pueden estar más expuestas a la contaminación por las toxinas generadas por *Fusarium* spp., ya sea por la disminución de su sistema inmunológico, debido al estrés por falta de agua o mala absorción de nutrientes; o también porque, ciertas condiciones climáticas como la temperatura y humedad, influyen en el crecimiento de estos hongos y estimulan la producción toxinas (Moretti y Sarrocco, 2016: pp.163-164).

El hongo *Fusarium* spp. está involucrado en la aparente necrosis y síntomas leves de enfermedad, en árboles de melina (Belezaca et al., 2021: p.39). *Fusarium solani* es el principal agente patógeno del cancro en melina, caracterizándose por necrosis del floema lo que causa marchitez descendente (Chavarría y Carmona, 2016: p.24); *Fusarium oxysporum* ha sido aislado de árboles de melina, siendo el responsable de la aparición de cancro en el tallo (corteza) (Umana et al., 2018: p.9). Los síntomas de la enfermedad en árboles melina se evidencian en la albura y duramen. La región afectada se caracteriza por un color más oscuro, secreción ocasional de savia y olor rancio a fétido debido a la fermentación (Arguedas, 2012, p.7).

2.1.2.2 *Ceratocystis* sp.

Taxonomía:

Ceratocystis es un género de hongos, pertenecientes a la familia Ceratocystidaceae, que comprende 39 especies crípticas y especializadas en huéspedes, su clasificación taxonómica se

especifica en la 2-3. Afectan a una amplia variedad de huéspedes leñosos, generándoles marchitez y cancro (Holland et al., 2019: p.135).

Tabla 2-3: Clasificación taxonómica de *Ceratocystis* sp.

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Microascales
Familia	Ceratocystidaceae
Género	<i>Ceratocystis</i>

Fuente: Schoch et al.; 2020.

Signos y síntomas:

La diversidad de esporas, fuentes de inóculo y mecanismos de dispersión (insectos, viento, huésped, transmisión durante la poda y cosecha, entre otros), dificultan el entendimiento de los ciclos de la enfermedad de *Ceratocystis* (Holland et al., 2019: p.135). *C. fimbriata* y otros *Ceratocystis* spp. son propagados por insectos (Diptera y Coleoptera); estos insectos son atraídos por la savia en las heridas de los árboles de melina. Los hongos patógenos ingresan a través de las heridas de los árboles; una vez que *C. fimbriata* infecta, esporula en su superficie volviéndolas atractivas para los insectos. Las masas de esporas presentes en las heridas, son recogidas por los insectos y transferidas a heridas recientes en otros árboles de melina (Wingfield y Robison, 2004: pp.230-231).

La presencia de *Ceratocystis fimbriata* en tejido infectado de *G. melina* se ha asociado con la “muerte súbita de *G. melina*”. En etapas iniciales de la enfermedad, las hojas de ramas superiores pierden turgencia, acompañada de una leve clorosis. Luego, en una etapa más avanzada, los ápices de crecimiento de las ramas mueren paulatinamente por el bloqueo vascular (ver ilustración 2-1). La pérdida de energía fotosintética reduce el vigor de los árboles enfermos, quienes, como mecanismo de supervivencia, producen brotes en el tallo. Conforme el bloqueo vascular continua, y al no circular sustancias nutritivas, el árbol muere. Es difícil detectar los síntomas iniciales, pues las manifestaciones son evidentes una vez que el tejido vascular está irremediamente comprometido (Méndez-Álvarez et al., 2020: p.4; Belezaca y Solano, 2022: pp.11699-11700).



Ilustración 2-1: Corte longitudinal y transversal en árboles de melina enfermos por *Ceratocystis* evidenciando daños vasculares.

Fuente: Belezaca et al., 2021: p. 317.

2.1.2.3 Hongos asociados al cáncer de trono de Melina

En Costa Rica, la principal causa de enfermedad en las plantaciones de melina es atribuible a *Nectria* sp. Además, se han identificado otros hongos microorganismos que afectan distintas partes del árbol, como *Pseudocercospora rangita* y *Colletotritrum* sp. que impactan en las hojas, *Botryodiplodia* sp., *Corticium salmonicolor* y *Nectria* sp. que afectan el xilema, y *Fusarium* sp. y *Rosellinia* que se destacan en la raíz. sp. (Meza et al., 2020: p.15). Umana et al. (2018: pp.7-8), aislaron 20 hongos patógenos en *G. arborea*, donde *F. oxysporum*, *B. theobromae* y *Graphium penicilloides* fueron patógenos significativos de la corteza (tallo).

En el Departamento de Tolima, en Colombia, se observan indicios de cánceres, necrosis, descoloración en el núcleo y un deterioro parcial en el tejido vascular en algunas plantaciones de *Gmelina arborea*; por lo que, bajo dicho contexto, en la investigación de Coy-Rodríguez et al. (2018: p.350), se identificaron y establecieron que los agentes responsables de la pudrición de plántulas de melina fueron los hongos *Lasiodiplodia theobromae* y *Curvularia geniculata*.

Nwogwugwu y Batcho (2019: p.4), reportaron a *Athelia rolfsii* como patógeno responsable del marchitamiento y pudrición del cuello de las plantas de melina. Este hongo produjo una lesión marrón y la descomposición de los tejidos blandos en la base de las plántulas. Las lesiones se agrandaron, rodearon el tallo; y finalmente, provocó el colapso total de los tejidos.

Alternaria alternata ha sido descrito por Pramod et al. (2022: p.1), como un patógeno causante de mortalidad y descomposición de los árboles de melina. Este hongo es un patógeno agresivo que invade la parte más profunda de la madera en las ramas, degradando la lignina de las paredes

celulares de sus hospedadores. Provoca un patrón de pudrición blanda que forma cavidades por flexión en "L".

2.1.3 *Gmelina arborea*

G. arborea, comúnmente conocida como melina, esta especie arbórea es nativa de regiones tropicales y subtropicales de Asia (Dvorak, 2004, p.111); sin embargo, su presencia se registra en áreas tropicales de África, Australia, América, Indias Occidentales y varias islas del Océano Pacífico (Singh et al., 2021: p.1075).

2.1.3.1 *Taxonomía*

Es una especie de rápido crecimiento, catalogada como pionera de larga vida, que pertenece a la familia Lamiaceae, puede variar de tamaño desde moderado a grande; existen tres variedades de la especie, su diferencia radica mayormente por su distribución natural: *Gmelina arborea* var. *arborea*, *Gmelina arborea* var. *glaucescens* y *Gmelina arborea* var. *canencens* (Singh et al., 2021: p.1075); en la Tabla 2-4 se presenta la clasificación taxonómica de *G. arborea*.

Tabla 2-4: Clasificación taxonómica de *Gmelina* arborea.

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Angiospermas
Clase	Eudicotyledoneae
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Gmelina</i>
Especie	<i>Gmelina arborea</i>

Fuente: Pathala et al., 2015: p.127.

2.1.3.2 *Generalidades*

Este árbol caducifolio alcanza alturas de entre 15 y 20 m (Pathala et al., 2015: p.127). Tiene una acelerada capacidad de renovación y crecimiento, alta durabilidad y gran producción de celulosa de calidad (Ramírez et al., 2019: p.1207); por lo que su madera es de interés industrial para productos como pulpa de madera, en la construcción, hasta partes para muebles, incluyendo su utilidad en

programas de reforestación (Dvorak, 2004, p.111; Singh et al., 2021: p.1075). Además, su raíz, fruto, hoja, flor y corteza se usan con fines medicinales (Pathala et al., 2015: p.127), debido a sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antioxidantes (Khalid, Ansari y Sindhav, 2022: p.32).

La introducción de *G. melina* en gran parte del mundo se debe a que es en una especie muy solicitada en los mercados forestales (Ruiz Blandon et al., 2020: p.95). En 2003 se estimaba la existencia de 700.000 ha de plantaciones, lotes y sitios agroforestales de melina en Asia, África, Pacífico Sur y América Latina (Dvorak, 2004, p.111). En Ecuador representa un rubro económico de gran importancia debido a que, en 2015, de las 52.495 has de superficie plantada con especies forestales, el 21,9 % correspondió a melina (Ministerio de Agricultura, Ganadería Acuacultura y Pesca, 2016, p.4).

Estas plantaciones se ven amenazadas por plagas y enfermedades; en zonas donde *G. melina* es nativa se han registrado daños considerables producidos por plagas de insectos, mientras que en zonas donde es exótica se evidencia la presencia de patógenos fúngicos como *Ceratocystis fimbriata* que generan marchitez vascular y muerte de las plantas (Wingfield y Robison, 2004: p.227).

2.1.3.3 Condiciones edafoclimáticas

G. arborea crece en valles húmedos y fértiles, en altitudes que van hasta 1300 msnm. y precipitaciones de 750 a 4500 mm. Esta especie no prospera en suelos mal drenados y puede tolerar periodos de sequía de 2 hasta 8 meses al año, por lo que en suelos secos, arenosos o pobres permanece atrofiado y, durante la sequía, se reduce a una forma arbustiva (Chowdhary, 2021: p.269; Martínez-Zurimendi et al., 2015: p.416). Para su cultivo, la mejor temperatura climática es desde los 21 °C hasta 28 °C y en suelos con una profundidad mínima de 50 cm, bien drenados, ricos en bases y con niveles de pH entre 5 y 8 (Arora y Tamrakar, 2017: p.529).

2.1.3.4 Descripción botánica

En la Ilustración 2-2, se pueden apreciar la planta entera (a), hoja (b), flores (c), fruto (d) y semillas (e) de *G. arborea*. Su altura es de aproximadamente 40 m, con un diámetro de 140 cm y fuste claro de 9 a 15 m. La forma del árbol es regular a buena, con 6 a 9 m de tronco sin ramas, a menudo torcido y con una copa grande de ramas bajas. Su corteza es delgada y de color gris, que al envejecer presenta parches de color claro. Las hojas de esta especie son de tipo simple, se ubican en posición opuesta y tienen una forma que se asemeja a un corazón. Su longitud oscila entre 10 y 25 cm, mientras que su anchura varía de 5 a 18 cm. En cuanto a las flores, estas

presentan colores que pueden variar entre marrón y amarillo y tienen un tamaño que oscila entre 3 y 4 cm. Estas flores están dispuestas en grupos llamados cimbras, que tienen una longitud de 15 a 30 cm. Por último, el fruto de esta especie se presenta en forma de drupa y es de color amarillo. Su longitud es de aproximadamente 2,25 cm y puede contener de 1 a 4 semillas en su interior. (Arora y Tamrakar, 2017: p.528; Nayak et al., 2015: p.78; Rohit et al., 2012: p.61).

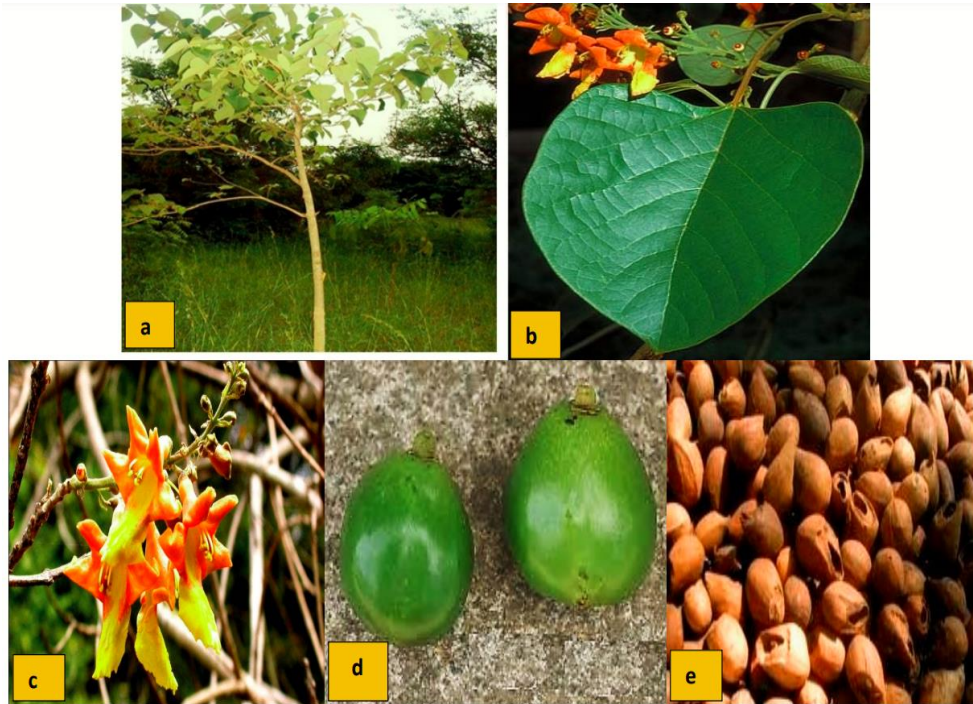


Ilustración 2-2: Planta de *G. arborea* y sus partes

Fuente: Rohit et al., 2012, p.64.

2.1.4 *Métodos de caracterización de microorganismos fúngicos*

2.1.4.1 *Caracterización cultural*

La caracterización cultural de los hongos se relaciona a las características que exhibe la colonia y la observación de algún cambio en ella. En la lista a continuación se pueden apreciar las principales características culturales que pueden tomarse en consideración:

- grado de crecimiento,
- color de la colonia y sus cambios,
- color y cambios al reverso de las colonias,
- cambios de color en el medio y dónde se producen,
- textura superficial,
- olor, en caso de existir,
- características del exudado del líquido (Sempere et al., 2004: pp.6-7).

2.1.4.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se basa en la descripción macroscópica y microscópica del hongo; esta segunda descripción requiere de una apreciación mediante el microscopio, para lo cual es necesario una tinción (Cañedo y Ames, 2004: p.33). Algunas de las características morfológicas más relevantes a considerar son detalladas en la Tabla 2-5.

Tabla 2-5: Características morfológicas de consideración.

Estructura	Característica
Hifas sumergidas	<ul style="list-style-type: none">• Color• Existencia o no de septos• Diámetro• Otros caracteres distintivos
Estructuras de fructificación	<ul style="list-style-type: none">• Grado de desarrollo• Medición de partes fundamentales• Disposición de las esporas
Órganos de fructificación maduros	<ul style="list-style-type: none">• Disposición libre• Disposición en el substrato• Disposición en la superficie• Disposición en el micelio aéreo• Existencia de estructura de esporulación
Órganos de fructificación	<ul style="list-style-type: none">• Color• Tamaño• Forma• Medición de partes esenciales• Presencia de esporas
Esporas	<ul style="list-style-type: none">• Color• Forma• Tamaño• Tabicación• Marcas superficiales

Fuente: Sempere et al., 2004, p.6.

La caracterización morfológica, en la identificación de especies de hongos, es usada rutinariamente para la clasificación de hongos a nivel ordinal o familiar; sin embargo, no siempre funcionan bien para clasificaciones a nivel de especies ya que muchas de estas características pueden alterarse por la hibridación, especiación críptica y evolución convergente (Raja et al., 2017: p.757).

2.1.4.3 Caracterización molecular

La determinación de la presencia de hongos implica la utilización de técnicas moleculares, que abarcan diversos enfoques, como los fundamentados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el uso de sondas de ADN/ARN, métodos de amplificación isotérmica, secuenciación de próxima generación basada en ARN-Seq, entre otras alternativas (Aslam et al., 2017: p.495).

Los métodos basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) son fáciles y rápidos de ejecutar, permiten manipular y obtener datos del ADN a través de la amplificación de segmentos pequeños y específicos del genoma; de tal modo que, in vitro, se obtienen múltiples copias de una región específica del ADN total (Sidrim et al., 2010: p.447). La PCR consta de 30 a 35 ciclos, y cada uno a la vez de 3 pasos: desnaturalización, recocido y extensión. La amplificación es exponencial, luego de varios ciclos se habrán acumulado suficientes copias de la secuencia de ADN para su detección (Roumani, 2022, p.20).

La PCR anidada, la PCR multiplex y la PCR en tiempo real representan enfoques diferentes pero relacionados de la técnica de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sidrim et al., 2010: p.447). La tecnología PCR cuantitativa en tiempo real ha sido usada para medir la biomasa fúngica en muchas interacciones planta-hongo, especialmente en aquellas donde la cantidad de hongo es baja. El procesamiento y análisis de muchas muestras es más rápida y precisa en comparación con los ensayos en placa (Klosterman, 2012, p.122).

Por otro lado, los métodos basados en sonda de ADN/ARN, son independientes de la secuenciación, usan una sonda para diagnosticar las enfermedades en las plantas causadas por microorganismos y permiten identificar la secuencia homóloga en el ADN objetivo. Las sondas son secuencias de ADN más cortas y de cadena sencilla que se marcan con moléculas informadoras quimioluminiscentes o isótopos radiomarcados (Aslam et al., 2017: pp.496-497).

La amplificación isotérmica mediada por bucle permite aumentar, unas pocas copias del ADN objetivo, con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas; resultando en la acumulación de 10^9 a 10^{10} copias del objetivo en menos de una hora.

Esta metodología se fundamenta en la generación de ADN de cadena de bucle en ciclo continuo, con la intervención de la enzima polimerasa de ADN Bst, cebadores específicos y la plantilla de ADN objetivo; incluyendo los pasos de producción de material de partida, amplificación cíclica y reciclaje (Tsui et al., 2011: p.184-186).

2.1.5 *Microorganismos antagonistas*

Los organismos antagonistas o competidores pueden ser usados como agentes biológicos para controlar organismos patógenos. El control biológico pretende ser autosostenible y efectivo para mantener la población de plagas por debajo de los umbrales aceptables (Prospero et al., 2021: p.3). Los antagonistas fúngicos desempeñan un papel importante en el control de patógenos y enfermedades en las plantas debido a que tienen una tasa de reproducción alta, tiempo de generación corto y son objetivos específicos. Muchas especies de hongos poseen mecanismos que les permiten proteger eficientemente a las plantas de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Thambugala et al., 2020: pp.1-3).

Las propiedades de los agentes biológicos de control incluyen la producción de antibióticos, enzimas líticas, enzimas antioxidantes, sideróforos e inducción de resistencia del huésped; algunos microorganismos con este potencial son *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Fusarium oxysporum* y otras bacterias (Purohit et al., 2023: p.435).

2.1.6 *Trichoderma* spp.

2.1.6.1 *Generalidades*

El género *Trichoderma* abarca una categoría de hongos multicelulares que se caracterizan por su reproducción asexual y su versatilidad funcional, y son hallados en una diversidad de entornos ecológicos. Las cepas pertenecientes a este género comparten rasgos morfológicos típicos, como la pigmentación verde vibrante en sus esporas, un rápido ritmo de crecimiento y una ramificación recurrente (Zin y Badaluddin, 2020: p.169).

Trichoderma spp. constituye un mecanismo de control biológico por lo que es usado en aplicaciones agrícolas relacionadas con enfermedades de las plantas, crecimiento de las plantas, descomposición y biorremediación (Zin y Badaluddin, 2020: p.168). Es uno de los microorganismos más utilizados y estudiados como agente biológico de control debido a su capacidad de parasitismo, antibiosis, producción de metabolitos secundarios e inducción del sistema de defensa de las plantas. *Trichoderma* se ha utilizado en la agricultura como parte de bioformulaciones

innovadoras, ya sea sola o en combinación con otros organismos beneficiosos para las plantas (Guzmán-Guzmán et al., 2023: p.1).

2.1.6.2 Taxonomía

El género *Trichoderma*, pertenece a la familia Hypocreaceae, se clasifica como un hongo saprófito cosmopolita, que a menudo vive como endófito de plantas leñosas, la clasificación taxonómica se detalla en la tabla 2-6.

Tabla 2-6: Clasificación taxonómica de *Trichoderma*.

Taxonomía	
Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Hypocrea/Trichoderma</i>

Fuente: Khan et al., 2020: p.11.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

2.1.6.3 Mecanismos de acción

Trichoderma spp., como bioagente, resulta eficaz en contra de una amplia gama de patógenos foliares y del suelo; sus mecanismos de biocontrol pueden ser directos, si existe interacción con el patógeno a través de micoparasitismo, competencia o antibiosis, o indirectos con la mejora la defensa de la planta (Guzmán-Guzmán et al., 2023: pp.3-4).

Micoparasitismo:

El micoparasitismo implica el ataque directo de un hongo a otro. Este complejo proceso involucra eventos secuenciales, incluido el reconocimiento, ataque y posterior penetración y muerte de la pared celular del hongo del huésped, debido, principalmente, a enzimas quitinolíticas y glucanolíticas. *Trichoderma* spp. puede ejercer un biocontrol directo al parasitar una variedad de hongos, detectar otros hongos y crecer hacia ellos. Las quitinasas degradan las paredes celulares de los hongos, liberan oligómeros que inducen exoquitinasas, dando comienzo el ataque (Benítez

et al., 2004: p.256; Sánchez-Montesinos et al., 2021: p.2). En la ilustración 2-3 se puede observar el micoparasitismo de *Trichoderma*, caracterizado por el enrollamiento de las hifas alrededor de los fitopatógenos.

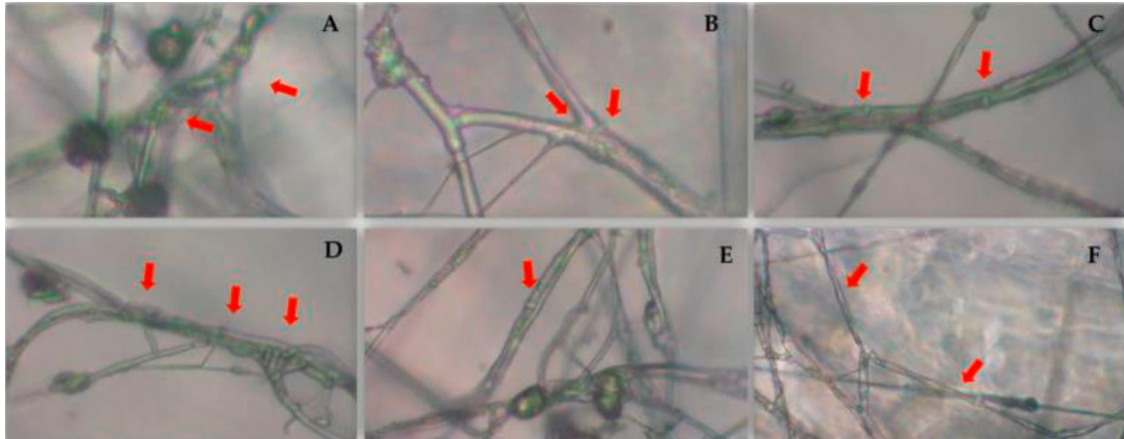


Ilustración 2-3: Micoparasitismo por *Trichoderma* hyphae, enrollamiento alrededor de las hifas. (A–E), formación de gancho (C-E), envoltura (B-D) e hifalísis (F).

Fuente: Sánchez-Montesinos et al., 2021: p.8.

Trichoderma spp. penetran la pared de la célula huésped formando una estructura similar a un gancho, paralelamente crecen a lo largo de las hifas del huésped, donde secretan mecánica y enzimáticamente enzimas que degraden la pared. Este proceso involucra la producción de compuestos biológicamente activos que podrían matar a los patógenos, como las enzimas y los metabolitos secundarios (Zin y Badaluddin, 2020: p.172).

Competencia por nutrientes y espacio:

Los hongos del género *Trichoderma* se caracterizan por su rápido crecimiento, considerándose como competidores agresivos. Pueden colonizar rápidamente los sustratos (hábitat común) y excluir de espacio y nutrientes a los patógenos de crecimiento más lento. Esto depende de algunas propiedades como el grado de colonización del huésped y su adaptación a las condiciones ambientales. *Trichoderma* posee estrategias efectivas para la competencia por nichos y nutrientes (Oszust et al., 2020: p.2; Tyśkiewicz et al., 2022: pp.8-9).

Existe una amplia gama de sustratos que los hongos del género *Trichoderma* pueden utilizar como única fuente de carbono y energía, además de una capacidad mucho mejor para movilizar y absorber nutrientes del suelo en comparación con otros microorganismos. Uno de los factores clave para el antagonismo de *Trichoderma* contra hongos patógenos, como el *Fusarium*, se debe a la competencia por hierro; pues *Trichoderma* los priva de fuentes de dicho metal, inhibiendo el crecimiento y la actividad patogénica. También se puede dar la competencia por sustratos de

carbono simples y complejos, sumado a la acción inhibidora de algunas enzimas (Tyśkiewicz et al., 2022: p.9).

Antibiosis:

Este mecanismo involucra la producción y excreción de metabolitos secundarios que pueden limitar o inhibir el crecimiento de patógenos. Las diversas especies de *Trichoderma* son una fábrica de metabolitos secundarios pues existen más de 180 tipos diferentes de compuestos identificados (Guzmán-Guzmán et al., 2023: p.5).

Las moléculas antimicrobianas son metabolitos secundarios, que resultan tóxicos para el crecimiento de otros microorganismos o procesos metabólicos (Lahlali et al., 2022: p.8). Durante las interacciones, estos hongos producen enzimas (glucanasa, quitanasa y proteasa) y vías de señalización (proteína G heterotrimérica, MAP quinasa y vía cAMP). Estas últimas, están involucradas en la secreción de metabolitos antifúngicos y en la formación de estructuras de infección; así como en el enrollamiento del micelio de *Trichoderma* sobre hongos patógenos, inhibiendo su proliferación (Mukhopadhyay y Kumar, 2020: p.1).

La acción combinada de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* spp., tienen potencial antifúngico e incrementan la resistencia de las plantas al ataque de patógenos. Entre dichos metabolitos se ha detallado la producción de ácido harziánico, alameticinas, tricolina, peptaiboles, antibióticos, 6-pentil-a-pirona, masoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico y otros (Benítez et al., 2004: p.255). Por ejemplo, el metabolito secundario 6-PP de *Trichoderma* spp., reduce el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* promueve el crecimiento de las plantas e induce resistencia sistémica, posiblemente al actuar como una auxina (Khan et al., 2020: p.11).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLOGICO

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Caracterización del lugar

3.1.1.1 Localización de campo

La fase de campo se realizó en el predio Pizará de la empresa Endesa, ubicado en el cantón Pedro Vicente Maldonado, provincia de Pichincha. Se ejecutó en dos rodales por cada sector como se muestra en la Ilustración 3-1.

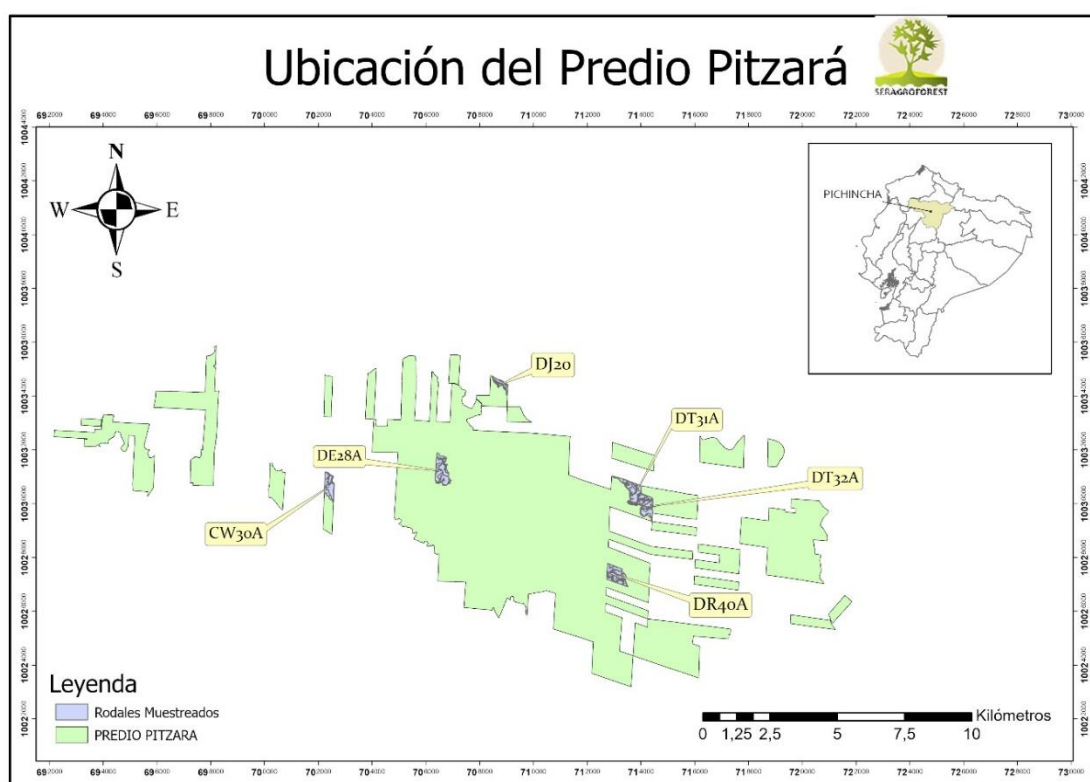


Ilustración 3-1: Localización de rodales muestreados.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Ubicación geográfica

Altitud: 285 msnm

Latitud: 0.29364

Longitud: -79.25761

Características climatológicas

Temperatura media anual: 24-26 °C

Precipitación media anual: 2000-4000 mm (Centro de Interpretación Meteorológica “Botrosa”).

3.1.1.2 Localización de laboratorio

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicado en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo (Ilustración 3-2).

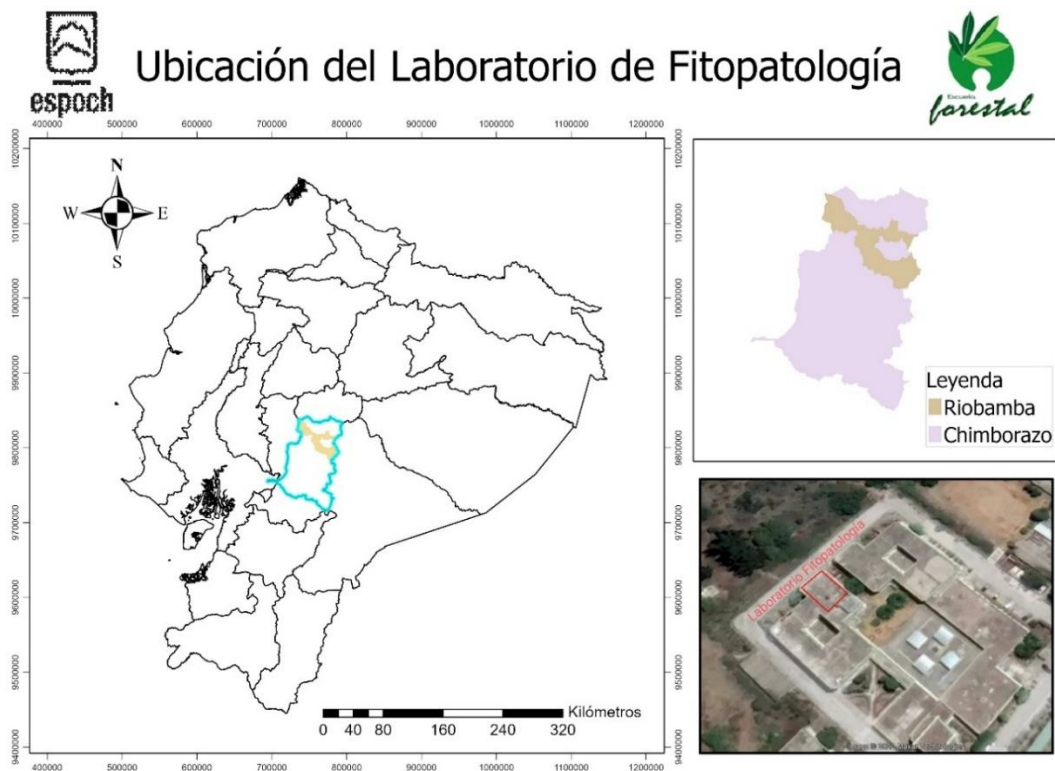


Ilustración 3-2: Ubicación del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales-ESPOCH.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Ubicación geográfica

Altitud: 2622 msnm

Latitud: -1,65

Longitud: -78,65

Características climatológicas

Temperatura media anual: 13,8°C

Precipitación media anual: 571,8 mm

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

3.1.2 Materiales y equipos

3.1.2.1 De campo

Materiales

Fundas Ziploc, rotulador, cooler, papel Kraft, motosierra

Equipos

GPS (Avenza Maps)

3.1.2.2 De laboratorio

Materiales

Cajas Petri (100 x 15 mm, 60 x 15 mm), microtubos eppendorf (1,5 mL), cajas para microtubos, láminas porta objetos, láminas cubre objetos, caja para lámina porta y cubre objetos, pinzas, recipientes de vidrio (1000 mL, 500 mL), papel toalla, cinta adhesiva, rotulador, jeringas (5 mL), probetas plásticas (1000 mL), gubias, mechero de bunsen, palillos, sorbetes, fosforera, puntas de micropipeta (10 µL, 100 µL y 1 mL), morteros, pistilos, cucharas plásticas.

Equipos

Autoclave (BIOBASE BKQ-B100II), cámara de flujo laminar Biobase, secador de vidrio (SELECTA 200038), refrigeradora (Durex), ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450), microondas (Panasonic 900w), incubadora, microscopio óptico AmscopeB100-MS, cámara fotográfica (CANNON), adaptador de cámara fotográfica a microscopio (CANON SLR/DSLR),

mechero de bunsen, vortex (QILINBEIER QL901), centrifuga (EPPENDORF 5424), bioespectrofotómetro (EPPENDORF Basic), termociclador (EPPENDORF Vapo.protect), cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB710), fuente de poder para electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB300) y transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A).

Reactivos

Papa Dextrosa Agar (PDA), hipoclorito de sodio (1 %), alcohol (70%), agua destilada estéril, agua ultra pura estéril, chloramphenicol, Avena-Agar (AV), nitrógeno líquido, lactoglicerol, cloroformo alcohol isoamílico (24:1), isopropanol frio, master Mix, 2X (Go Taq® Green), DNA Ladder Bench Top 100 pb (PROMEGA), agua ultrapura estéril, Kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard® Genomic DNA), LE Agarosa (Clever Scientific CSL-AG 100), 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen). primers (EXXTEND), Nuclei Acid Staining Solution (UniSafe Dye) y Tris-Borate-EDTA Buffer (SIGMA).

Material biológico

Aislados de *Trichoderma* (Tabla 3-1), aislados de muestras de corteza de melina (*Gmelina arborea*)

Tabla 3-1: Información de aislados de *Trichoderma* spp.

CÓDIGO	ESPECIE	LUGAR DE RECOLECCIÓN	TIPO DE CULTIVO	MÉTODO DE AISLAMIENTO	MÉTODO DE CONSERVACIÓN
E	<i>T. breve</i>	El cascajo	Melón (M1)	Siembra por dilución	Método Castellani
H	<i>T. lentiforme</i>	El cascajo	Melón (M1)	Siembra por dilución	Método Castellani
M	<i>T. harzianum</i>	El cascajo	Melón (M1)	Siembra por dilución	Método Castellani
R	<i>T. andinense</i>	La fortuna	Café (var. Típica)	Siembra por dilución	Método Castellani
O	<i>T. longibrachiatum</i>	Media luna	Maíz amarillo (M1)	Siembra por dilución	Método Castellani
Y	<i>T. resei</i>	Caimito viejo	Hoja Kale (M1)	Siembra por dilución	Método Castellani

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

3.1.2.3 *De escritorio*

Materiales

Computadora, impresora, hojas bond, borrador, lápiz, libreta de campo

Equipos

Portátil, impresora

3.2 Metodología

3.2.1 *Fase de campo*

3.2.1.1 *Incidencia de la enfermedad*

Para determinar el efecto de incidencia de la enfermedad se delimitaron dos parcelas circulares con un área de 1000 m² por cada rodal. En cada parcela se realizó un censo de todos los árboles, con el propósito de establecer el número total de árboles, además árboles sintomáticos y aparentemente sanos, para expresar el porcentaje de incidencia según Ayala (2008):

$$\%I = \frac{\text{Número de árboles enfermos}}{\text{Número total de árboles}} \times 100$$

3.2.1.2 *Severidad de la enfermedad*

El grado de severidad se determinó en base a la escala de notas compuesta por cinco clases propuesta por Salas et al. (2015), se evaluó en función a las diferencias visibles en la estructura de los árboles analizando el fuste, las ramas y las hojas de los árboles. (Tabla 3-2).

Tabla 3-2: Escala de notas de cinco clases propuesta por Salas et al., (2015) para evaluar la severidad de la enfermedad de pudrición del fuste en *G. arborea*.

Severidad (Criterio)	Síntomas
1	Árbol aparentemente sano, no hay evidencia de síntomas visibles.
2	Amarillamiento inicial de la copa (marchitez foliar evidente); el fuste puede tener pequeñas heridas necrosadas y con exudación negra en sitios diferentes a donde hubo podas; puede iniciar la aparición de rebrotes. No todos los síntomas se expresan.
3	El árbol está visiblemente enfermo. Hay lesiones tipo cancro en la corteza con indicios de pudrición, exposición y abultamiento de la corteza, exudación prominente; pérdida de más de un 50% del área foliar en un patrón progresivo; rebrotes desarrollados.
4	Afectación total del individuo; ausencia total de follaje; hay pérdida y desprendimiento evidente de ramas; aún se observan rebrotes en algunos sectores del tronco; la pudrición externa aparente alcanza un 75% del tronco, donde la zona cancerosa (cancro) se manifiesta con claridad
5	Árbol completamente seco, podrido; la madera ya perdió completamente su valor comercial.

Fuente: Salas et al., 2015

3.2.1.3 Recolección de muestras

Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron de tres sectores productores de *G. arborea* ubicados en el cantón Pedro Vicente Maldonado. Estos sectores se denominan sector 1, sector 2 y sector 3 del predio Pizará, como se indica en la Tabla 3-3. Se seleccionaron rodales de plantaciones multiclonales para el muestro, utilizando un método de muestreo no probabilístico por conveniencia. En cada rodal, se recolectaron un total de 6 muestras de árboles de uno y dos años de edad que presentaban síntomas de la enfermedad. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la aparición de abundantes exudaciones gomosas de color pardo rojizo en la parte inferior del fuste después de realizar podas, como se describió en Tercero (2020).

Tabla 3-3: Información de las muestras recolectadas

Código	Lugar de recolección	Rodal	Sector	Año	Coordenadas geográficas
M001	Pedro Vicente Maldonado	DR40A	2	2020	0°14'52.7"N 79°04'58.9"W
M002	Pedro Vicente Maldonado	DR40A	2	2020	0°14'52.7"N 79°04'58.9"W
M003	Pedro Vicente Maldonado	DR40A	2	2020	0°14'49.7"N 79°04'56.5"W
M004	Pedro Vicente Maldonado	DR40A	2	2020	0°14'49.1"N 79°04'56.5"W
M005	Pedro Vicente Maldonado	DR40A	2	2020	0°14'49.1"N 79°04'56.5"W
M006	Pedro Vicente Maldonado	DR40A	2	2020	0°14'56.0"N 79°05'06.9"W
M007	Pedro Vicente Maldonado	DJ20	2	2021	0°18'40.6"N 79°07'27.0"W
M008	Pedro Vicente Maldonado	DJ20	2	2021	0°18'40.6"N 79°07'27.0"W
M009	Pedro Vicente Maldonado	DJ20	2	2021	0°18'40.6"N 79°07'27.0"W
M010	Pedro Vicente Maldonado	DJ20	2	2021	0°18'45.7"N 79°07'28.7"W
M011	Pedro Vicente Maldonado	DJ20	2	2021	0°18'45.7"N 79°07'28.7"W
M012	Pedro Vicente Maldonado	DJ20	2	2021	0°18'45.7"N 79°07'28.7"W
M013	Pedro Vicente Maldonado	DE28A	1	2020	0°17'15.2"N 79°08'41.6"W
M014	Pedro Vicente Maldonado	DE28A	1	2020	0°17'15.2"N 79°08'41.6"W
M015	Pedro Vicente Maldonado	DE28A	1	2020	0°17'15.2"N 79°08'41.6"W
M016	Pedro Vicente Maldonado	DE28A	1	2020	0°17'15.2"N 79°08'41.6"W
M017	Pedro Vicente Maldonado	DE28A	1	2020	0°17'15.2"N 79°08'41.6"W
M018	Pedro Vicente Maldonado	DE28A	1	2020	0°17'15.2"N 79°08'41.6"W
M019	Pedro Vicente Maldonado	CW30A	1	2021	0°16'28.6"N 79°10'51.8"W
M020	Pedro Vicente Maldonado	CW30A	1	2021	0°16'28.6"N 79°10'51.8"W
M021	Pedro Vicente Maldonado	CW30A	1	2021	0°16'28.6"N 79°10'51.8"W
M022	Pedro Vicente Maldonado	CW30A	1	2021	0°16'28.6"N 79°10'51.8"W
M023	Pedro Vicente Maldonado	CW30A	1	2021	0°16'28.6"N 79°10'51.8"W
M024	Pedro Vicente Maldonado	CW30A	1	2021	0°16'28.6"N 79°10'51.8"W
M025	Pedro Vicente Maldonado	DT31A	3	2021	0°16'27.7"N 79°04'37.1"W
M026	Pedro Vicente Maldonado	DT31A	3	2021	0°16'27.7"N 79°04'37.1"W
M027	Pedro Vicente Maldonado	DT31A	3	2021	0°16'31.8"N 79°04'41.8"W
M028	Pedro Vicente Maldonado	DT31A	3	2021	0°16'31.8"N 79°04'41.8"W
M029	Pedro Vicente Maldonado	DT31A	3	2021	0°16'38.5"N 79°04'48.0"W
M030	Pedro Vicente Maldonado	DT32A	3	2021	0°16'29.8"N 79°04'40.9"W
M031	Pedro Vicente Maldonado	DT32A	3	2021	0°16'20.2"N 79°04'37.4"W
M032	Pedro Vicente Maldonado	DT32A	3	2021	0°16'20.9"N 79°04'38.4"W
M033	Pedro Vicente Maldonado	DT32A	3	2021	0°16'20.9"N 79°04'38.4"W
M034	Pedro Vicente Maldonado	DT32A	3	2021	0°16'21.4"N 79°04'24.7"W
M035	Pedro Vicente Maldonado	DT32A	3	2021	0°16'21.4"N 79°04'24.7"W

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

La obtención de las muestras se realizó con el uso de una motosierra, se procedió a apear los árboles que presentaban síntomas de la enfermedad obteniendo trozas entre 8 cm y 10 cm de longitud donde se apreciaba la sintomatología de necrosis y de donde se realizarían los respectivos aislamientos (Ilustración 3-3). Adicionalmente las muestras fueron etiquetadas y colocadas en un cooler para transportarlas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para su procesamiento.



Ilustración 3-3: Obtención de muestras
Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

3.2.2 Fase de laboratorio

3.2.2.1 Aislamiento de microorganismos en medio de cultivo PDA

Las muestras de corteza de melina con los síntomas de la enfermedad recolectadas, fueron lavadas con agua corriente para eliminar impurezas presentes en el material, se realizaron cortes en forma de prismas de 2 cm³ (Ilustración 3-4) con el uso de una cierra circular, mediante el uso una gubia se procedió a la separación de los tejidos vasculares de aproximadamente 7 mm provenientes de cada prisma.



Ilustración 3-4: Obtención de prismas

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cada sección fue desinfectada con alcohol al 70 % por 30 s, hipoclorito de sodio al 1 % por 1 min y posteriormente se realizaron 2 enjuagues con agua destilada, cada uno con una duración de 45 s, los fragmentos fueron secados con papel toalla estéril. Una vez desinfectados los fragmentos fueron sembrados de manera equidistante en cajas Petri (3 por caja Petri), con la ayuda de pinzas desinfectadas previamente, en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) + cloranfenicol. (ANEXO B), estas cajas fueron etiquetadas y selladas con papel plástico. Se incubaron a $26\pm 2^{\circ}$ C por un periodo de seis a doce días.

3.2.2.2 *Purificación de microbiota asociada al cáncer de tronco de Gmelina arborea*

Una vez que aislados los microorganismos del tronco de las plantas de melina, se prosiguió a obtener cultivos completamente puros. Para lograrlo, se transfirieron las colonias a cajas Petri de dimensiones reducidas que contenían un medio específico llamado PDA + Cloranfenicol. Este proceso implicó tomar una porción del micelio presente en las colonias y, posteriormente, etiquetar y sellar herméticamente las cajas con papel plástico. Luego, se procedió a incubar estas cajas a una temperatura de 26 °C durante un período de 15 días, hasta obtener cultivos que estuvieran completamente libres de contaminación.

3.2.2.3 *Conservación de aislados puros de microorganismos asociados al cáncer de tronco de *Gmelina arborea**

La preservación de aislamientos en estado puro se llevó a cabo mediante la creación de discos de micelio a partir de un cultivo esporulado. Estos discos de micelio se colocaron en microtubos de 1,5 mL que contenían una solución salina al 0,8%, y luego se sometieron a un proceso de esterilización. Finalmente, se procedió a almacenar estos microtubos en refrigeración.

3.2.2.4 *Caracterización cultural*

Se realizó la caracterización cultural mediante la descripción de la textura, forma, margen, crecimiento aéreo de los aislados, color de la colonia al anverso como al reverso en base a la escala Pantone descrita en (Pantone Coated Color Reference, 2012).

3.2.2.5 *Caracterización morfológica*

Para la caracterización morfológica, se siguió un procedimiento basado en la metodología descrita por Franco (2015, p.5), con algunas modificaciones. En este proceso, se inició preparando láminas portaobjetos con una pequeña gota de agua destilada. Luego, se aplicó la cinta adhesiva que contenía micelio sobre el portaobjetos, cuidando de evitar la formación de burbujas. Una vez que la lámina portaobjetos estuvo lista, se procedió a examinar las estructuras de los hongos utilizando un microscopio.

Se creó una base de datos que contenía detalles acerca de la formación de esporas, así como la forma y el color de los conidios. También se registró la presencia o ausencia de septos, pigmentos, fiálides, clamidosporas, ascas, basidios, esporangios, rizoides, conidióforos y conidios, siguiendo la metodología descrita por Espinoza (2021, p. 23).

3.2.2.6 *Caracterización molecular*

La obtención del ADN genómico se llevó a cabo mediante la preparación de cultivos puros de los hongos en un medio de cultivo denominado Avena-Agar + Cloranfenicol. Estos cultivos fueron incubados a una temperatura controlada de 26 °C \pm 2 °C durante un período de 7 días, hasta que se acumuló la cantidad adecuada de micelio para el proceso de extracción del ADN.

El micelio se recolectó dentro de una cabina de flujo laminar utilizando una cuchara plástica estéril. Posteriormente, se dispuso el micelio sobre un trozo de papel bond que se había esterilizado previamente, permitiendo que se secase durante aproximadamente 10 minutos. Luego, se envolvió y etiquetó, y se cubrió con papel de aluminio. Finalmente, se guardó en un sobre de manila que se colocó dentro de una funda ziploc y se almacenó en un ultracongelador a una temperatura de -20 °C hasta su posterior uso.

El ADN genómico fue extraído usando el kit PROMEGA Wizard® Genomic DNA siguiendo las recomendaciones del fabricante, que se detalla en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Protocolo de extracción de ADN

Lisis física		Se colocó el micelio dentro de un mortero esterilizado previamente y añadiendo nitrógeno líquido se procedió a macerar el micelio con la ayuda del pistilo de igual manera esterilizado, hasta obtener pequeñas partículas finas, el cual se colocó en el interior de un microtubo eppendorf de 2 mL estéril y etiquetado.
Clarificación		Se adicionaron 600 µL de solución de lisis de núcleos en los microtubos de 2 mL que contenían el micelio macerado. Después, los microtubos se colocaron en el vortex durante 3 segundos, seguidamente se incubaron en el termobloque a 65 °C durante 15 minutos. Durante este tiempo, se invirtieron los microtubos cada 5 minutos.
Precipitación de proteínas	de	Se colocaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas, y se llevó a vortex por 20 s, luego se centrifugaron a 14000 rpm por 10 min, provocando la formación de un pellet por la precipitación de proteínas, enseguida el sobrenadante fue trasladado a un nuevo microtubo y se agregaron 600 µL de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1), el cual se envió al vortex por 20 s, y se transfirió el sobrenadante el cuál contenía el ADN hacia un nuevo microtubo (2 mL).
Precipitación de proteínas	de	Se adicionó 600 µL de isopropanol frío, se invirtieron los tubos para mezclar la solución, se almacenaron los tubos en el freezer por 12 h, y luego se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min.
Lavado		Se observó si hubo la formación del pellet al fondo de los microtubos, se procedió a eliminar el sobrenadante cuidadosamente sin perder el pellet, posteriormente se realizaron dos lavados adicionando 600 µL de etanol 70 % frío y se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min.

Secado	Se procedió a retirar el etanol de los tubos y se dejó secar el pellet contenido en los tubos de manera horizontal sobre bandejas limpias cubiertas sobre papel toalla con la tapa abierta durante 12 h.
Rehidratación	Transcurridas las 12 h, se procedió a resuspender el pellet agregando 50 μ L de solución buffer (TE) y 2 μ L de RNasa en cada tubo, se procedió a incubar en el termobloque durante 3 h a 37 °C y se almacenaron los microtubos en el ultracongelador a -40 °C

Fuente: PROMEGA Wizard®, 2020.

PCR:

Se utilizó la metodología de ampliación de la cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores para hongos ITS4 e IT5 para hongos desconocidos (Tabla 3-5), mientras que para hongos pertenecientes al género *Fusarium* se usaron los iniciadores TEF1 y TEF2 descritos en la Tabla 3-6, para la respectiva identificación molecular de los morfotipos hallados.

Tabla 3-5: Primers utilizados para aislados de *Nectria*

Código	Secuencia
ITS-5 (Reverse)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS-4 (Forward)	5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

Fuente: Zhou et al., 2021: p.5; Prabhakaran et al., 2014: p.4

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Tabla 3-6: Primers utilizados para hongos del género *Fusarium*

Código	Secuencia
EF-1	5'-ATGGGTAAGGAAGGACAAGAC-3'
EF-2	5'GGAGAGTACCAGTGCATCATGTT-3'
EF1-728F	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'
EF1-986R	5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'

Fuente: O'Donnell et al. 1998: p. 2045; Carbone & Kohn, 1999, P.554

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Reactivos usados para la PCR:

- 6,25 μ L de Master Mix, 2X GoTaq® Green
- 1 μ L (1 pmol) primer Reverse
- 1 μ L (1 pmol) primer Forward

- 2,25 μL de agua ultra pura
- 2 μL (ng / μL) de ADN

Obteniendo un volumen de 12,5 μL .

Programa usado para la amplificación de PCR de aislados desconocidos:

Desnaturalización inicial 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de las condiciones, 95 °C durante 60 s (desnaturalización), 53 °C durante 60 s (anelamiento), 72 °C durante 60 s (extensión), y finalmente se realizó una última extensión a 72 °C durante 5 min, en el termociclador.

Programa usado para la amplificación de PCR de aislados desconocidos:

Desnaturalización inicial 94 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de las condiciones, 94 °C durante 45 s (desnaturalización), 52 °C durante 30 s (anelamiento) 72 °C durante 90 s (extensión), y finalmente se realizó una última extensión a 72 °C durante 6 min, en el termociclador.

Electroforesis:

Para verificar la amplificación de los productos de PCR, se llevó a cabo una técnica de electroforesis. Para este procedimiento, se preparó un gel utilizando 0,6 g de agarosa y 40 mL de Buffer Tris Borato EDTA (TBE), al cual se le añadieron 2 μL de un agente intercalante de ácidos nucleicos (Nuclei Acid Dye). Luego, se vertió el gel en una cuba de electroforesis (modelo FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710) y se colocaron peines para formar los pocillos. Después de 15 minutos, una vez que el gel se solidificó, se retiraron los peines y se agregaron 300 mL de Buffer Tris Borato EDTA al 10 %.

Se preparó una cinta de parafilm donde se depositaron 2 μL de buffer de carga (Buffer de Carga BlueJuiceTM 10X) y 2 μL de los productos obtenidos a través de la PCR. Estas muestras se dispusieron en los pocillos y se realizó una electroforesis a 60 voltios durante un periodo de 60 minutos. Luego de completar la electroforesis, el gel se colocó sobre un transluminador UV (modelo FISHER SCIENTIFIC 88A) para observar si se había logrado la amplificación del ADN.

Nota: en el primer pocillo se colocó una muestra de control (Ladder) y al final una muestra de agua, para confirmar que el AND realmente se amplificó.

Secuenciación:

Los productos de PCR una vez verificados por electroforesis fueron purificados y secuenciados usando la tecnología SANGER en la empresa MACROGEN KOREA. Las secuencias obtenidas fueron verificadas su calidad observando sus cromatogramas con el programa.

Análisis de muestras secuenciadas:

Mediante el programa Chromas, versión 2.6.6 de Technelysium Pty Ltd, se analizaron los electrofotogramas, seleccionando únicamente las partes de alta calidad. Posteriormente, las secuencias se exportaron en formato FASTA y se llevaron a cabo comparaciones utilizando la herramienta BLAST del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Estas comparaciones se basaron en porcentajes de identidad, porcentaje de cobertura y valores de e-value, contrastando las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos correspondientes.

3.2.2.7 Caracterización patogénica

Pruebas de patogenicidad en plántulas de *Gmelina arborea*:

Se emplearon cepas de *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrachia*, recolectadas de árboles enfermos en el predio Pitzar y previamente sometidas a análisis cultural, morfológico y molecular. Los aislados seleccionados se transfirieron a cajas Petri que contenían 15 mL de medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y se desarrollaron en incubadora durante 7 días a una temperatura de 26 C. Después de este periodo, se añadió 5 mL de agua destilada esterilizada y, al raspar suavemente la superficie de las colonias con un asa de Drigalski, se logró obtener una suspensión de esporas. Luego, se utilizó una cámara de Neubauer para contar las esporas y determinar su concentración, la cual fue ajustada posteriormente a una concentración de 1×10^6 mL de esporas.

La inoculación de las plantas se realizó empleando dos métodos diferentes: el método con herida y el método sin herida. En el caso de las cepas de *Fusarium solani*, en el método con herida se llevó a cabo un procedimiento que comenzó con la desinfección del área de inoculación utilizando algodón empapado en alcohol. Luego, se administraron 0,3 mL de la suspensión de esporas a una altura de 5 cm sobre el nivel del suelo mediante una jeringa de 3 mL. Por otro lado, en el enfoque sin herida, se aplicaron 0,3 mL de la suspensión de esporas en el fuste de la planta mediante rocío.

En el caso de las cepas de *Nectria pseudotrichia*, debido a la ausencia de esporas visibles al microscopio, se optó por realizar la inoculación utilizando discos de 5 mm de diámetro. En el método que involucra heridas, se efectuó una perforación en el fuste de las plantas para ubicar el disco, el cual se cubrió con algodón humedecido y luego se envolvió con cinta film. Este conjunto se mantuvo así durante un período de 3 semanas para conservar la humedad. Por otro lado, en el método sin heridas, se colocó el disco, que también estaba cubierto con algodón humedecido y envuelto en cinta film, sin necesidad de perforar el fuste.

Para las plantas de control, se utilizó agua destilada esterilizada en lugar de la suspensión del inóculo, luego de la inoculación las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas durante 75 días, y se evaluaron cada 15 días.

Se planteó una escala con el propósito de evaluar el grado de lesión a nivel vascular en las plantas inoculadas, como resultado de la acción de diversas cepas de patógenos. Esta escala se fundamentó en el avance necrótico que ocurre en el interior del sistema vascular de las plantas Tabla 3-7.

Tabla 3-7: Escala propuesta para evaluar daño a nivel vascular de pudrición en *G. arborea*

Severidad (Criterio)	Síntomas
1	Tejido vascular aparentemente sano, no hay evidencia de síntomas visibles.
2	Daño del tejido vascular con ligero avance necrótico, afectación del 25 %
3	Daño del tejido vascular moderado con una afectación del 50 %
4	Daño del tejido vascular severo con una afectación del 75 %
5	Afectación total del tejido vascular

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

3.2.2.8 *Re-aislamiento de aislados*

Para el re-aislamiento de aislados de *F. solani* y *Nectria pseudotrichia* a partir de plántulas inoculadas se utilizaron fragmentos del fuste de la hospedera, en medio de cultivo PDA y se incubaron a temperatura de 26 °C durante 7 días.

3.2.2.9 Diseño y análisis estadístico

Para la evaluación de la patogenicidad en plantas de melina se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), donde se empleó tres bloques con 10 tratamientos cada bloque, dando un total de 30 plantas de melina en todo el experimento.

Tabla 3-8: Tratamientos para inoculación de plantas de melina

Tratamientos	Método de inoculación	Descripción	Código
T1	Herida	<i>F. solani</i> (M012A)	M012A_H
T2	Herida	<i>F. solani</i> (M030A)	M030A_H
T3	Herida	<i>N. pseudotrichia</i> (M005B)	M005B_H
T4	Herida	<i>N. pseudotrichia</i> (M015A)	M015A_H
T5	Sin Herida	Agua destilada (H ₂ O)	H ₂ O_H
T6	Sin Herida	<i>F. solani</i> (M012A)	M012A_SH
T7	Sin Herida	<i>F. solani</i> (M030A)	M030A_SH
T8	Sin Herida	<i>N. pseudotrichia</i> (M005B)	M005B_SH
T9	Sin Herida	<i>N. pseudotrichia</i> (M015A)	M015A_SH
T10	Sin Herida	Agua destilada (H ₂ O)	H ₂ O_SH

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

3.2.2.10 Reactivación de especies de *Trichoderma*

Se tomaron los discos de micelio de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* sp. conservadas previamente, se dejaron secar en papel toalla esterilizado y posteriormente fueron sembrados en medio PDA, para su incubación a 26 °C.

3.2.2.11 Siembra dual

Se procedió a realizar confrontaciones mediante la técnica de siembra dual entre agentes patógenos (*Fusarium solani* y *Nectria pseudotrichia*), frente a *Trichoderma* spp. como antagonistas. Para lo cual se sembraron discos de micelios de 5 mm de diámetro, de patógenos y antagonistas, utilizando un sorbete estéril se realizaron los discos, luego con la ayuda de palillos previamente esterilizados fueron ubicados equidistantemente, considerando dejar 1 cm del borde para realizar las respectivas mediciones diametrales.

3.2.2.12 Variables evaluadas

Crecimiento radial del micelio en las confrontaciones patógeno vs antagonistas:

A partir de las 24 h se empezó a tomar datos del crecimiento micelial de los hongos (patógeno y antagonista), la cual se realizó hasta las 96 h de crecimiento, o hasta que el antagonista sobrepasara en crecimiento al agente patógeno y cubriera por completo la superficie del medio PDA, para lo cual el crecimiento radial del micelio fue medido de manera horizontal del hongo patógeno y del antagonista, para la medición se usó un calibrador digital, y su medida fue tomada en milímetros (mm).

Micoparasitismo:

Se utilizó la escala propuesta por Bell et al. (1982), detallada en (Tabla 3-9) para determinar la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 3-9: Escala de estimación de micoparasitismo

Clases	Valor (%)	Descripción
1	100	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio
2	92,05	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio.
3	50	<i>Trichoderma</i> y el patógeno crecen aproximadamente la mitad de la superficie y ninguno domina al otro.
4	7,95	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	0	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial:

Luego de la incubación durante 7 días de la siembra dual a 26 °C se procedió a evaluar la inhibición del crecimiento desde el borde del disco hasta el crecimiento del agente patógeno y se determinó mediante la siguiente fórmula utilizada por Ezziyyani et ál. (2004), el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

En donde:

- R1= radio mayor (radio del patógeno testigo)
- R2= radio menor (radio del patógeno en el enfrentamiento con el antagonista)

3.2.2.13 Análisis de datos

Diseño experimental:

En la investigación se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones, los tratamientos se detallan en la (Tabla 3-10). Los datos obtenidos fueron ordenados en hojas de cálculo de Microsoft Excel y se procesaron en el software estadístico R., utilizando el Test de Tukey al 5 % para la separación de medias.

Tabla 3-10: Tratamientos evaluados

Nº	SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN
1	T1	<i>T. breve</i> / <i>F. solani</i> M012A
2	T2	<i>T. lentiforme</i> / <i>F. solani</i> M012A
3	T3	<i>T. harzianum</i> / <i>F. solani</i> M012A
4	T4	<i>T. longibraciatum</i> / <i>F. solani</i> M012A
5	T5	<i>T. andinense</i> / <i>F. solani</i> M012A
6	T6	<i>T. resei</i> / <i>F. solani</i> M012A
7	T7	<i>Fusarium solani</i> M012A
8	T8	<i>T. breve</i> / <i>F. solani</i> M018A
9	T9	<i>T. lentiforme</i> / <i>F. solani</i> M018A
10	T10	<i>T. harzianum</i> / <i>F. solani</i> M018A
11	T11	<i>T. longibraciatum</i> / <i>F. solani</i> M018A
12	T12	<i>T. andinense</i> / <i>F. solani</i> M018A
13	T13	<i>T. resei</i> / <i>F. solani</i> M018A
14	T14	<i>Fusarium solani</i> M018A
15	T15	<i>T. breve</i> / <i>F. solani</i> M026B
16	T16	<i>T. lentiforme</i> / <i>F. solani</i> M026B
17	T17	<i>T. harzianum</i> / <i>F. solani</i> M026B
18	T18	<i>T. longibraciatum</i> / <i>F. solani</i> M026B
19	T19	<i>T. andinense</i> / <i>F. solani</i> M026B
20	T20	<i>T. resei</i> / <i>F. solani</i> M026B
21	T21	<i>Fusarium solani</i> M026B
22	T22	<i>T. breve</i> / <i>N. pseudotrichia</i> M005B

23	T23	<i>T. lentiforme/ N. pseudotrichia</i> M005B
24	T24	<i>T. harzianum/ N. pseudotrichia</i> M005B
25	T25	<i>T. longibraciatum/ N. pseudotrichia</i> M005B
26	T26	<i>T. andinense/ N. pseudotrichia</i> M005B
27	T27	<i>T. resei/ N. pseudotrichia</i> M005B
28	T28	<i>N. pseudotrichia</i> M005B
29	T29	<i>T. breve/ N. pseudotrichia</i> M015A
30	T30	<i>T. lentiforme/ N. pseudotrichia</i> M015A
31	T31	<i>T. harzianum/ N. pseudotrichia</i> M015A
32	T32	<i>T. longibraciatum/ N. pseudotrichia</i> M015A
33	T33	<i>T. andinense/ N. pseudotrichia</i> M015A
34	T34	<i>T. resei/ N. pseudotrichia</i> M015A
35	T35	<i>N. pseudotrichia</i> M015A

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Incidencia y severidad de la enfermedad cáncer de tronco

4.1.1 Incidencia de la enfermedad

En plantaciones de uno y dos años de edad pertenecientes al predio Pizará se identificó en promedio 8 árboles enfermos por parcela (1000 m²), lo que representa 8 árboles enfermos ha⁻¹ en una densidad promedio de 400 árboles ha⁻¹. La incidencia de la enfermedad representa el 18,88 % en los tres sectores evaluados del predio Pizará (Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Incidencia de la enfermedad en el Predio Pizará

Sector	Rodal	Año	Parcela	Nº Árboles por parcela	Árboles sanos	Árboles enfermos	Incidencia (%)
1	CW30A	2021	1	45	37	8	17,78
		2021	2	49	45	4	8,16
Promedio				47	41	6	12,97
2	DR40A	2020	1	27	23	4	14,81
		2020	2	27	17	10	37,04
	DJ20	2021	1	35	23	6	17,14
		2021	2	33	27	6	18,18
Promedio				31	22	7	21,79
3	DT31A	2021	1	42	32	10	23,81
		2021	2	38	25	13	34,21
	DT32A	2021	1	40	36	4	10,00
		2021	2	41	33	8	19,51
Promedio				40	32	8	21,88
Promedio Predio				40	32	8	18,88

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Los rodales DT31A y DR40A pertenecientes a los sectores 2 y 3 alcanzan los niveles más altos de incidencia de la enfermedad con 28,96 % (11 árboles ha⁻¹ enfermos) y 25,93 % (7 árboles ha⁻¹ enfermos) respectivamente, mientras que el rodal CW30A perteneciente al sector 1 alcanza el porcentaje de incidencia más bajo con 12,97 % (Ilustración 4-1).

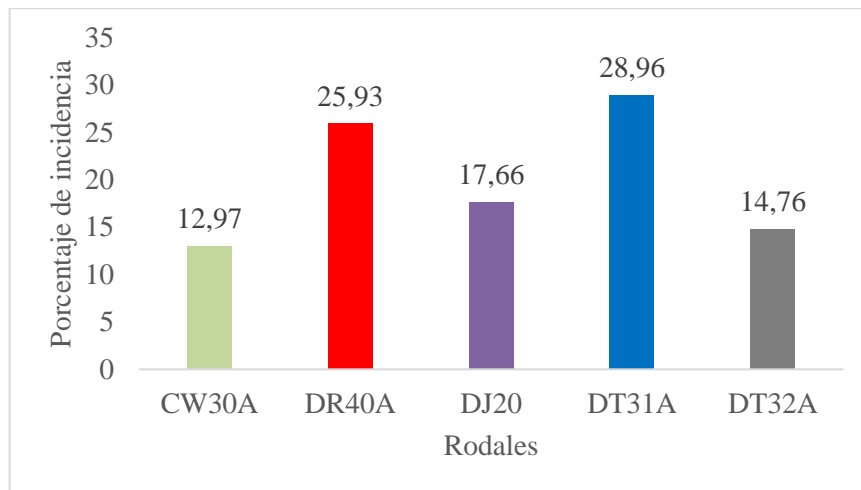


Ilustración 4-1: Incidencia de la enfermedad por rodales

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Los sectores 2 y 3 obtuvieron mayor porcentaje de incidencia con un 21,79 % (7 árboles ha⁻¹ enfermos) y 21,88 % (8 árboles ha⁻¹ enfermos) respectivamente. En contraste, el sector 1 mostró una incidencia del 12,97 % de incidencia lo que representa 6 árboles ha⁻¹ con síntomas de enfermedad como se representa en la Ilustración 4-2.

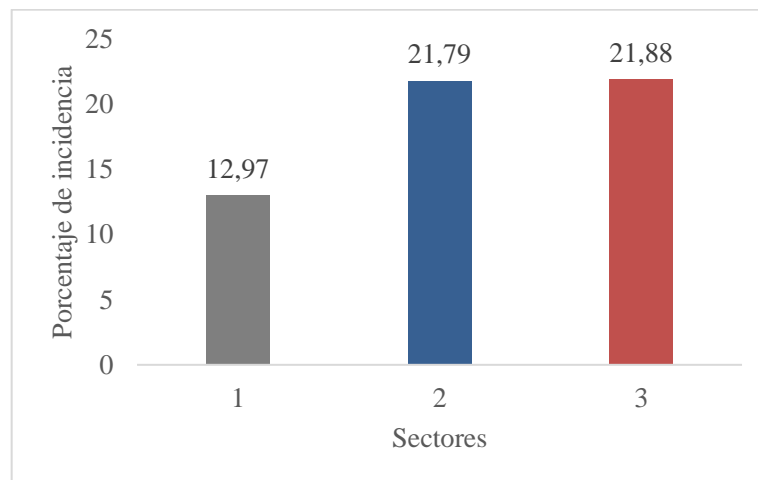


Ilustración 4-2: Incidencia de la enfermedad por sectores

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.2 Severidad de la enfermedad

En el predio Pizará, en el caso de las plantaciones de uno y dos años de edad en los sectores 1, 2 y 3, la mayoría de los árboles afectados presentaron síntomas que se clasificaron en la categoría 2. Esto implicó la presencia de 8 árboles con síntomas notables por hectárea (8 árboles ha⁻¹), caracterizados por la marchitez evidente foliar y la pérdida de turgencia en las hojas ubicadas en los extremos de las ramas superiores.

En cuanto a las categorías 3 y 4, que representan lesiones tipo cancro con signos de pudrición y una pérdida de más del 30% del área foliar en la categoría 3, así como la ausencia total de follaje en la categoría 4, se estimó la presencia de al menos 1 árbol por hectárea (1 árbol ha⁻¹), como se detalla en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2: Severidad de la enfermedad en los sectores del predio Pitzará

Sector	Rodal	Año	Parcela	N° de árboles por escala				
				1	2	3	4	5
1	CW30A	2021	1	39	6	0	0	0
	CW30A	2021	2	36	12	1	0	0
Promedio				38	9	1	0	0
2	DR40A	2020	1	23	4	0	0	0
	DR40A	2020	2	17	8	1	1	0
	DJ20	2021	1	23	12	0	0	0
	DJ20	2021	1	27	6	0	0	0
Promedio				23	8	0	0	0
3	DT31A	2021	1	32	10	0	0	0
	DT31A	2021	2	25	13	0	0	0
	DT32A	2021	1	36	4	0	0	0
	DT32A	2021	2	33	8	0	0	0
Promedio				32	9	0	0	0
Promedio predio				31	8	1	1	0

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.2.1 Descripción de la sintomatología

En los árboles de melina que presentaron sintomatología de enfermedad, se observaron una serie de manifestaciones iniciales. Estos síntomas incluyeron un amarillamiento pronunciado en la copa y una marcada pérdida de turgencia en las hojas ubicadas en la parte superior de las ramas, como se muestra en la ilustración 4-3A. Al comparar estos árboles con aquellos que aparentaban estar sanos, se pudo apreciar una clara disminución en el vigor de los árboles afectados. A medida que la severidad de la enfermedad avanzaba, se observaron signos adicionales, como el desarrollo de rebrotes alrededor del fuste, como se muestra en la Ilustración 4-3B, y la aparición de exudados necróticos, como se representa en la ilustración 4-3C. Esta progresión de síntomas condujo

eventualmente a la muerte del árbol cuando se alcanzó el máximo grado de severidad de la enfermedad.

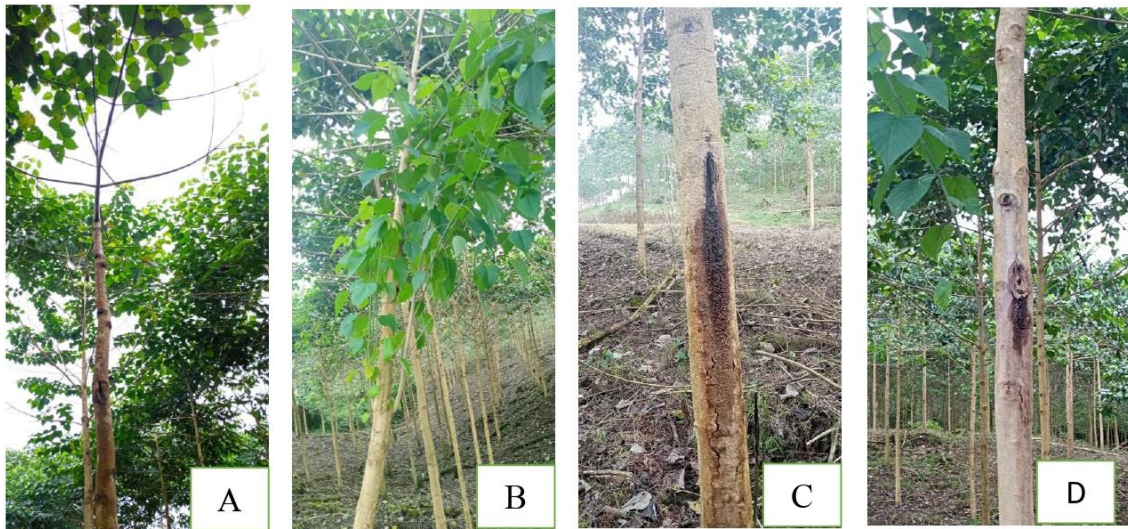


Ilustración 4-3: Síntomas de la enfermedad cáncer de tronco en árboles de melina.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Luego de llevar a cabo el proceso de tala de los árboles mediante cortes transversales, ubicados aproximadamente a 5 centímetros por encima del nivel del suelo, se procedió a una observación detallada de los tejidos vasculares. En términos generales, no se detectó la presencia de necrosis ni se evidenció el taponamiento de los conductos vasculares, como se documenta en la Ilustración 4-4.

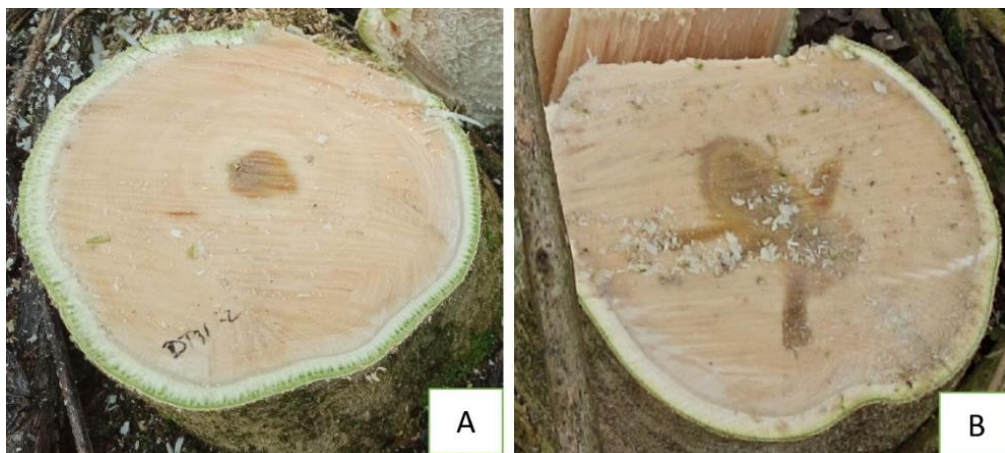


Ilustración 4-4: Cortes transversales en la base de los árboles de melina (aproximadamente 5 cm) enfermos con cáncer de tronco.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Sin embargo, al efectuar cortes transversales a diversas alturas (50, 100, 150 y 200 centímetros sobre el nivel del suelo), se pudieron observar con mayor claridad los efectos adversos que los

patógenos ejercieron sobre los tejidos vasculares. Dichos efectos incluyeron la formación de tejidos necróticos y la obstrucción de los vasos conductores, lo que resultó en una restricción significativa del flujo normal de soluciones nutritivas, tal como se representa en la Ilustración 4-5.

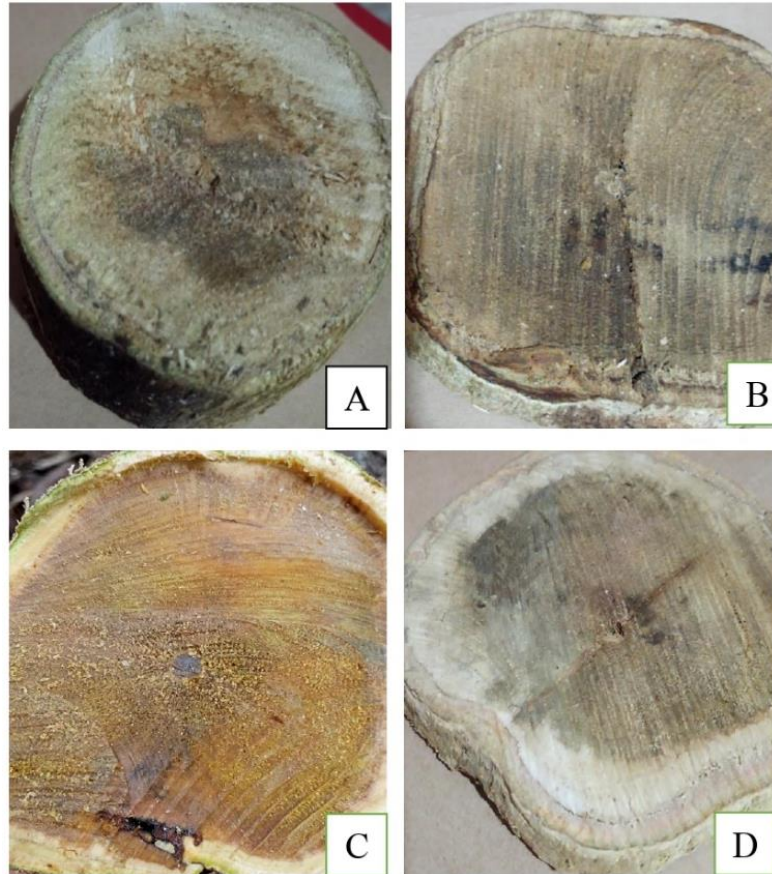


Ilustración 4-5: Cortes transversales en el fuste de los árboles de melina enfermos (entre 80 cm y 150 cm)

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.3 Caracterización cultural, morfológica y molecular

Morfotipo 1: *Fusarium solani*

Las colonias de *Fusarium solani* desarrolladas en medio de cultivo PDA incubadas en oscuridad a 26 °C durante 14 días. Presentaron una apariencia algodonosa de color blanco a gris en el anverso y marrón a gris en el reverso (Panthone) (Ilustración 4-6). Las colonias mostraron forma circular, elevación variada (elevada, Umbonada, rizada), el borde entero, y una superficie variada (concéntrica, lisa y radial) (Tabla 4-3).

Las estructuras morfológicas observadas de *Fusarium solani*, presentaron macroconidias con ligera curvatura en forma de gancho presentando de 3 a 7 septos hialinos (Ilustración 4-7A). Los microconidias presentan forma oval con 1 a 2 septos hialinos (Ilustración 4-7B), se presentaron clamidosporas con distribución dobles y en grupos (Ilustración 4-7C), finalmente se observó la presencia de fiálides simples alargadas con cabezas falsas (Ilustración 4-7D). El tamaño que presentaron las macroconidias fue de 10-12,5 μm de largo x 5 μm de ancho, mientras que las microconidias presentaron tamaño de 5,25-7,5 μm de largo x 2,75-3,75 μm .

La caracterización molecular en región espacios internos transcritos (ITS) presentó los siguientes datos; el análisis BLAST mostró un porcentaje de identidad del 100 % para la muestra M012A, con la accesión KY245947.1 que corresponde a la especie *Fusarium solani*. La muestra M026B presentó un porcentaje de identidad del 100 %, con la accesión MK903035.1 correspondiente a la especie *Fusarium solani*. La muestra M030A, presentó un porcentaje de identidad del 96,61 % con la accesión LC745751.1 perteneciente a la especie *Fusarium solani*. En región factor de elongación y traducción (728F) la muestra M018A presentó un porcentaje de identidad del 100 % con el acceso MH300508.1 (Tabla 4-5).

Tabla 4-3: Características culturales de los morfotipos asociados a *Fusarium solani*

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso	Tamaño de esporas (μm)	
							L	A
M012A	Circular	Elevada	Entero	Concéntrica	Blanco y gris	Marrón	12,5	5
M018A	Circular	Umbonada	Entero	Lisa	Blanco	Gris	12	5
M026B	Circular	Rizada	Entero	Radial	Gris	Marrón	10,5	5,8

Realizado por: Benalcázar Kevin, 20223.

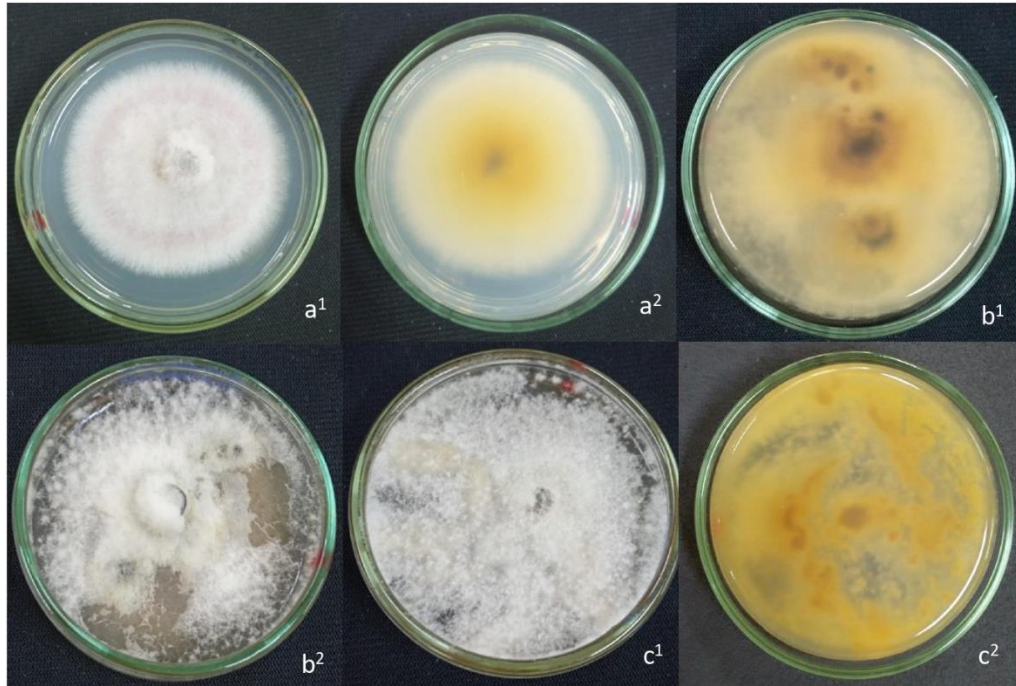


Ilustración 4-6: Características culturales de *Fusarium solani*, cultivado en medio PDA.
 Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

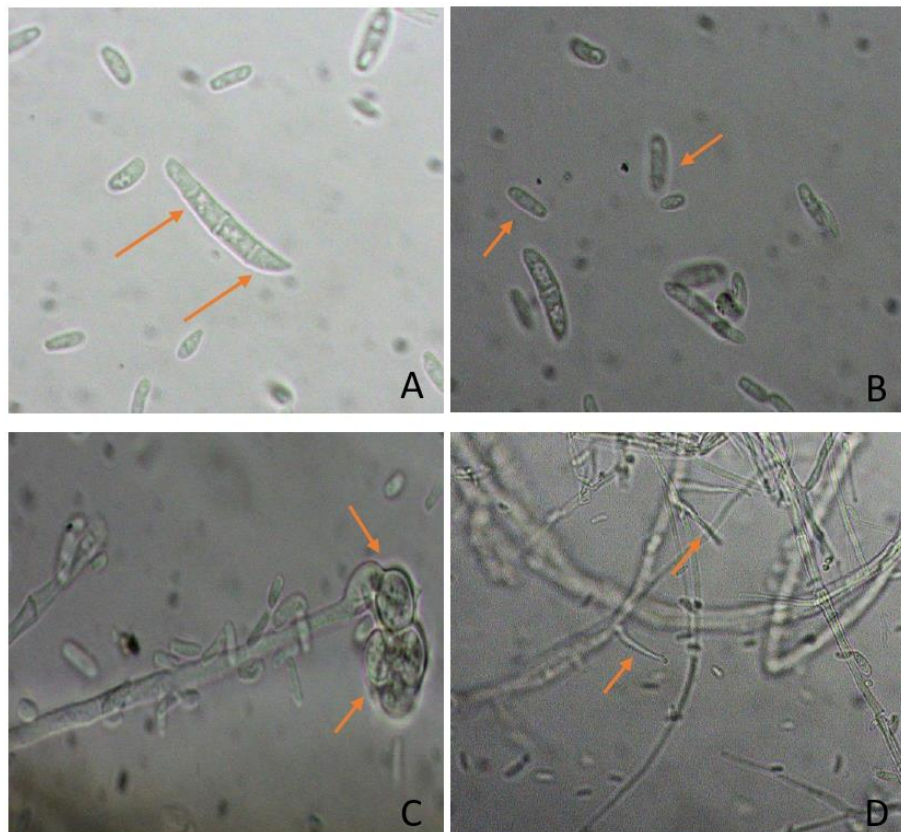


Ilustración 4-7: Características morfológicas de *Fusarium solani*, cultivado en medio PDA.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Morfotipo 2: *Nectria pseudotrichia*

Las colonias de *Nectria pseudotrichia* fueron cultivadas en medio de cultivo PDA y se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 26 °C durante un período de 14 días. Durante este tiempo, las colonias exhibieron una apariencia inicial de aspecto algodonoso de color blanco, que posteriormente se tornó gris en el anverso y marrón a negra en el reverso según la escala de colores de Panthone (Ilustración 4-8). Las colonias mostraron una forma circular, con una elevación en forma umbonada y rizada, el borde entero y por último la superficie concéntrica y lisa (Tabla 4-4).

En el análisis de caracterización molecular llevado a cabo en la región factor de traducción y elongación (TEF), se reveló un alto grado de similitud, con un 99.1% de identidad, entre la muestra M015A y la secuencia de acceso MF076592.1, que se corresponde con la especie *Nectria pseudotrichia*. Por otro lado, en el análisis de la región factor de traducción y elongación (728F) se confirmó la presencia de *Nectria pseudotrichia* en la muestra M005C, mostrando un nivel de identidad del 92% con la secuencia de acceso HM534878.1, como se detalla en la Tabla 4-5.

Tabla 4-4: Características culturales de los morfotipos asociados a *Nectria pseudotrichia*

Código	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color del anverso	Color del reverso
M005B	Circular	Umbonada	Entero	Concéntrica	gris	Negro
M015A	Circular	Rizada	Entero	Lisa	Blanco	Marrón

Realizado por: Benalcázar Kevin, 20223.

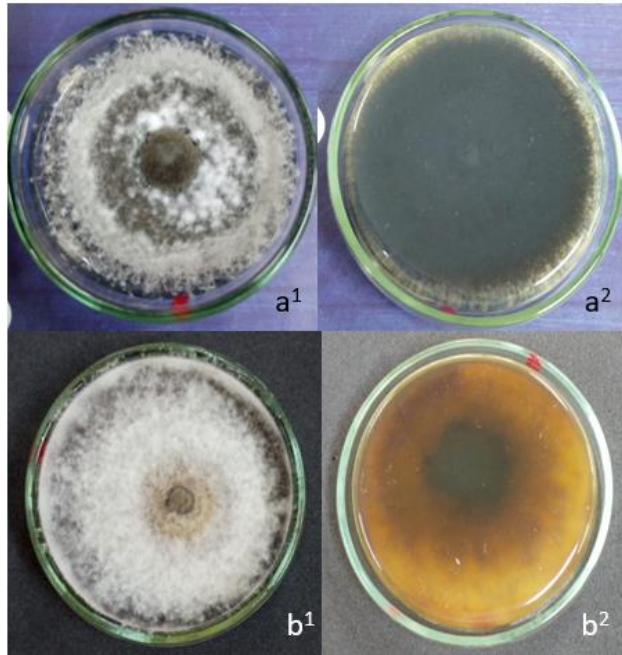


Ilustración 4-8: Características culturales de *Nectria pseudotrichia* cultivado en medio PDA.
Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Tabla 4-5: Identificación molecular mediante análisis BLASTn de las cepas del género *Fusarium* y *Nectria* alineadas de la base de datos del NCBI

Código	Género Identificado morfológicamente	Región	Tamaño de Nucleótidos pb	Especies identificadas	Porcentaje de identidad	Porcentaje de cobertura	E-value	Acceso	Origen geográfico
M018A	<i>Fusarium</i>	TEF	271	<i>Fusarium solani</i>	100 %	98,52%	5e-130	MH300508.1	Madrid
M005C	<i>Nectria</i>	TEF	298	<i>Nectria pseudotrichia</i>	92%	96,43%	3e-123	HM534878.1	Vienna
M012A	<i>Fusarium</i>	ITS	319	<i>Fusarium solani</i>	100 %	100 %	7e-164	KY245947.1	China
M026B	<i>Fusarium</i>	ITS	161	<i>Fusarium solani</i>	100 %	100 %	2e-76	MK903035.1	Malaysia
M030A	<i>Fusarium</i>	ITS	534	<i>Fusarium solani</i>	96,61 %	99 %	0	LC745751.1	Tailandia
M015A	<i>Nectria</i>	ITS	534	<i>Nectria pseudotrichia</i>	99,1 %	99 %	0	MF076592.1	Brazil

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.4 Evaluación cualitativa de los síntomas causados por *Fusarium solani*

Al realizar la inoculación de las plantas de *Gmelina arborea* de 4 meses de edad, los primeros síntomas se presentaron a los 7 días, se observó clorosis en las hojas, junto con la aparición de manchas necróticas en el tratamiento 6 (M012A_SH) mediante el método sin herida (Ilustración 4-9A). Por otro lado, en el método con herida, se notó al día 12 una lesión a nivel del fuste en el tratamiento 1 (M012A_H) (Ilustración 4-9B). Al día 20 posterior a la inoculación, se visualizó manchas necróticas a partir de los nudos en el fuste para el tratamiento 6, método sin herida (Ilustración 4-9C). Para el método con herida se mostraban lesiones a nivel del fuste para todos los tratamientos evaluados (M012A_H, M030A_H) (Ilustración 4-9D). Finalmente, al día 52 se visualizó la presencia de brotes epicórmico alrededor del fuste en el tratamiento M012A_SH (Ilustración 4-9E). El tratamiento control 5 (H₂O_H) correspondiente a inoculación con agua destilada con herida no presentó síntomas en las plantas inoculadas (Ilustración 4-9F).

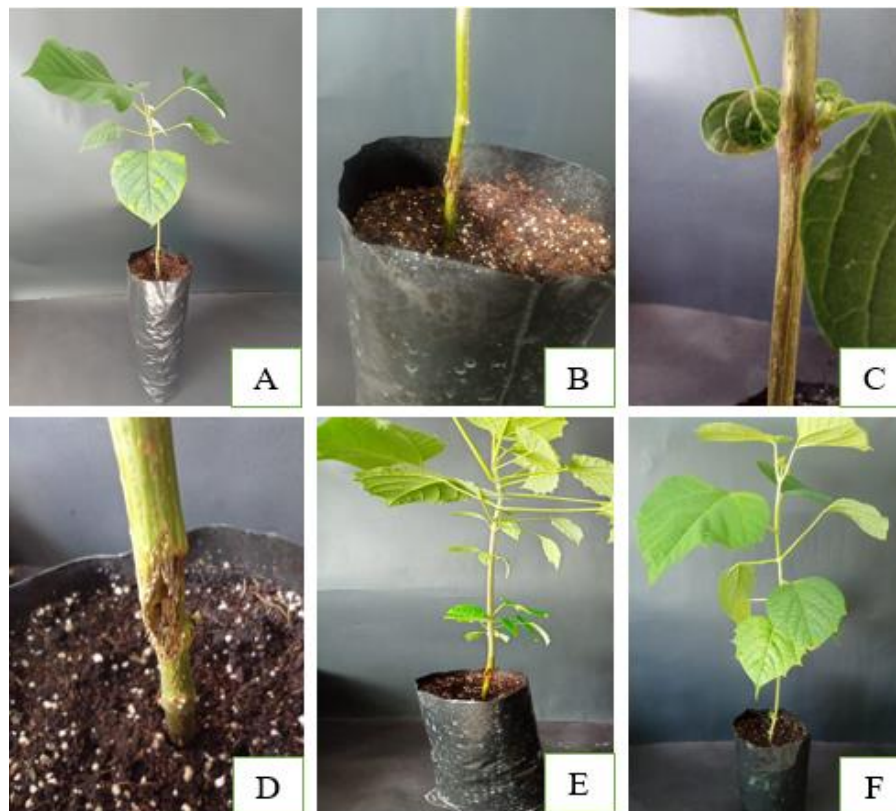


Ilustración 4-9: Sintomatología externa en plantas inoculadas con *Fusarium solani*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Al evaluar al día 75 el sistema vascular de las plantas inoculadas con *Fusarium solani*, se visualizó que la cepa M030A sin herida no presentó daño alguno, al igual que los tratamientos testigos inoculados con agua destiladas, considerados en categoría 1 (Ilustración 4-10A-B).

En contraste, la cepa M012A sin herida ocasionó daños en el sistema vascular de las plantas inoculadas, clasificándose en la categoría 2, con un grado de afectación inferior al 25%, como se representa en la Ilustración 4-10C. Por otro lado, en el método que involucró heridas, se observaron daños en el sistema vascular en todas las plantas inoculadas con la cepa M012A, situándose en la categoría 2, tal como se muestra en la Ilustración 4-12A. En contraste, la cepa M030A presentó una afectación vascular inferior al 50%, por lo que se clasificó en la categoría 3, según se detalla en la Ilustración 4-12B.

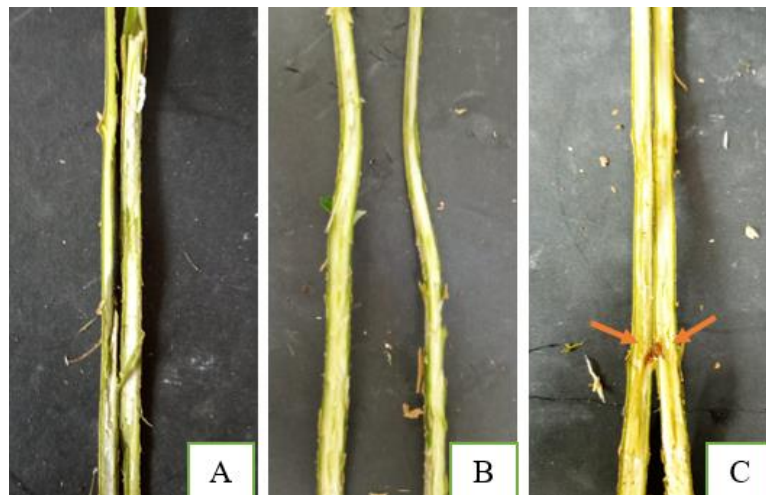


Ilustración 4-10: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas sin herida con *Fusarium solani*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

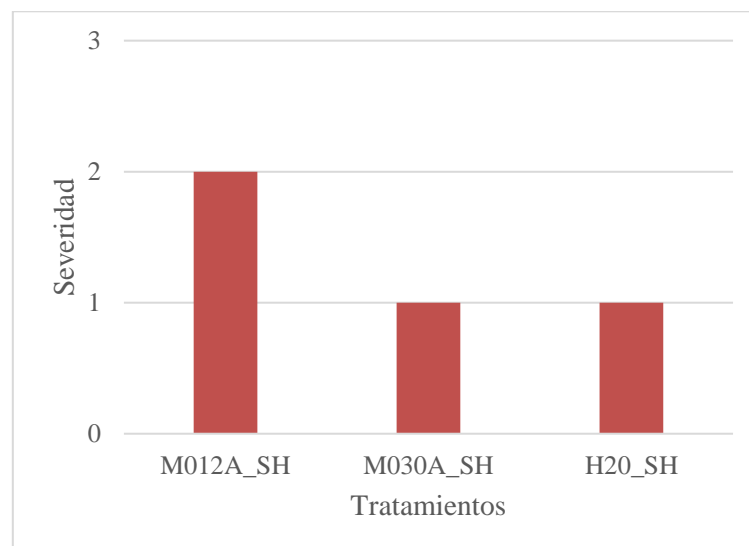


Ilustración 4-11: Severidad presente en plantas inoculadas sin herida con *Fusarium solani*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

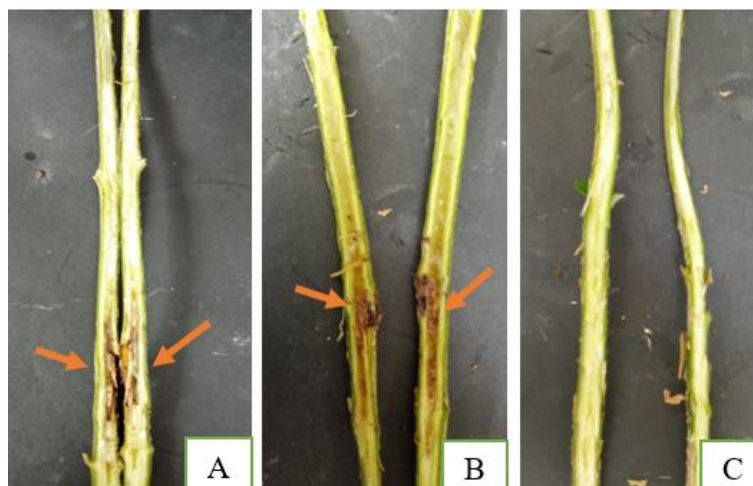


Ilustración 4-12: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas con herida con *Fusarium solani*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

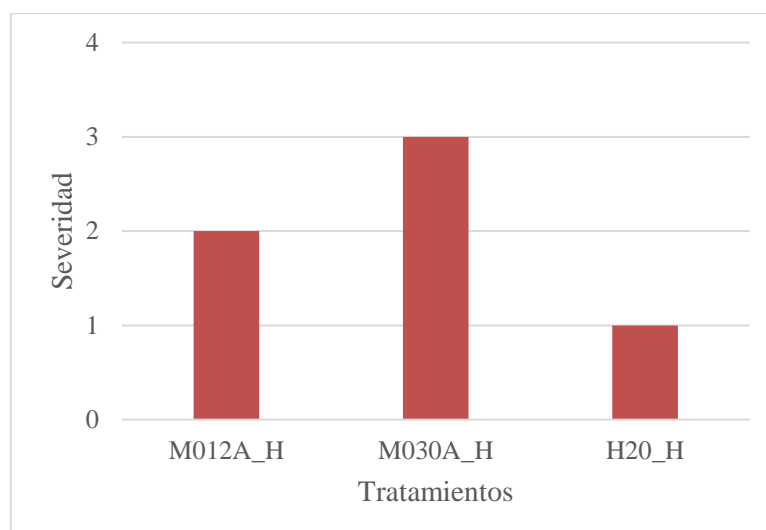


Ilustración 4-13: Severidad presente en plantas inoculadas con herida con *Fusarium solani*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.5 Evaluación cualitativa de los síntomas causados por *Nectria pseudotrichia*

La sintomatología presentada por las plantas de melina inoculadas con *Nectria pseudotrichia* empieza a los 7 días con daño foliar en los tratamientos 3 y 8 (M005B_H, M005B_SH) para el método con herida y sin herida (Ilustración 4-14A), al día 30 de la evaluación por el método con herida se puede visualizar lesiones a nivel del fuste en la parte inferior a la inoculación para los tratamientos 3 y 4 (M005B_H, M015A_H) (Ilustración 4-14B-C). Al día 45 de la evaluación los tratamientos 8 y 9 con método sin herida presentan manchas necróticas a nivel del fuste, así como también el tratamiento 4 con herida (Ilustración 4-14D). De igual manera la presencia de brotes

epicórmico se visualizó en los tratamientos con herida, así como también sin herida (Ilustración 4-14E), siendo el tratamiento M005B_H el mayor agresivo con marchitamiento foliar. El tratamiento control correspondiente a inoculación con agua destilada no presentó síntomas (Ilustración 4-14F).

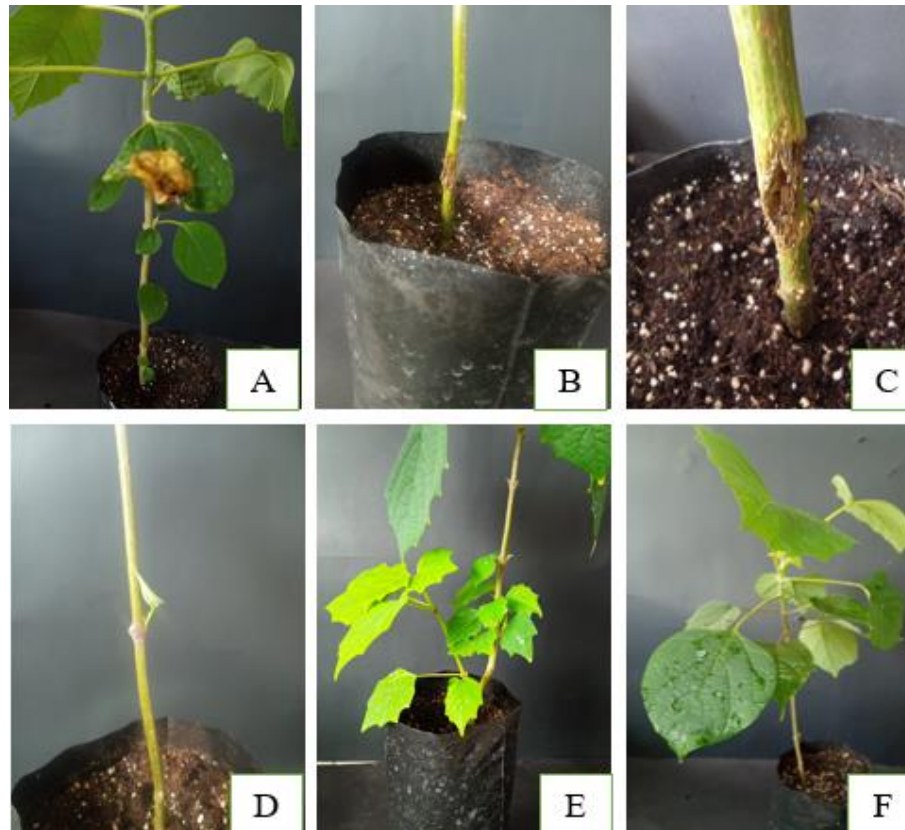


Ilustración 4-14: Sintomatología externa en plantas inoculadas con *Nectria pseudotrichia*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

En el contexto de la evaluación realizada a los 75 días después de la inoculación de las plantas con *Nectria pseudotrichia*, se observó lo siguiente en relación al sistema vascular: La cepa M005B sin herida no presentó ningún daño detectable en el sistema vascular y fue categorizada como "aparentemente sana" en la categoría 1, al igual que el grupo de control inoculado agua destilada (Ilustración 4-15A-B). En contraste, la cepa M015A mostró daños en el sistema vascular, alcanzando la categoría 2 en términos de severidad (Ilustración 4-15C).

En el método que involucró la aplicación de heridas, se detectaron daños en el sistema vascular en todas las plantas inoculadas con ambas cepas (M005B, M015A), y estas también se clasificaron en la categoría 2 (Ilustración 4-16A). El tratamiento control con agua destilada no presentó daño a nivel vascular (Ilustración 4-16B).

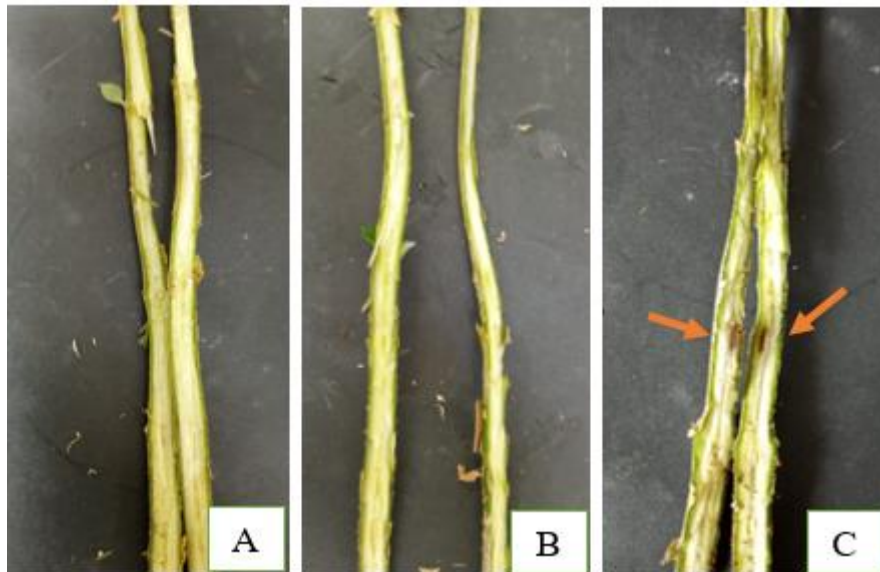


Ilustración 4-15: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas sin herida con *Nectria pseudotrichia*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

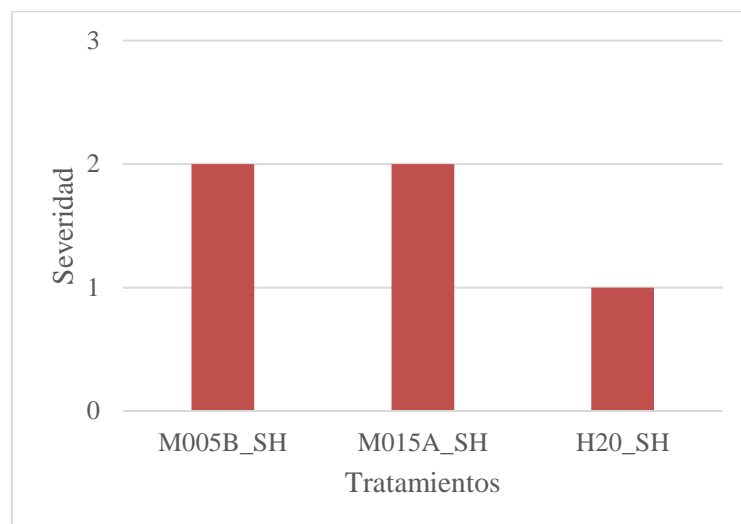


Ilustración 4-16: Severidad presente en plantas inoculadas sin herida con *Nectria pseudotrichia*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

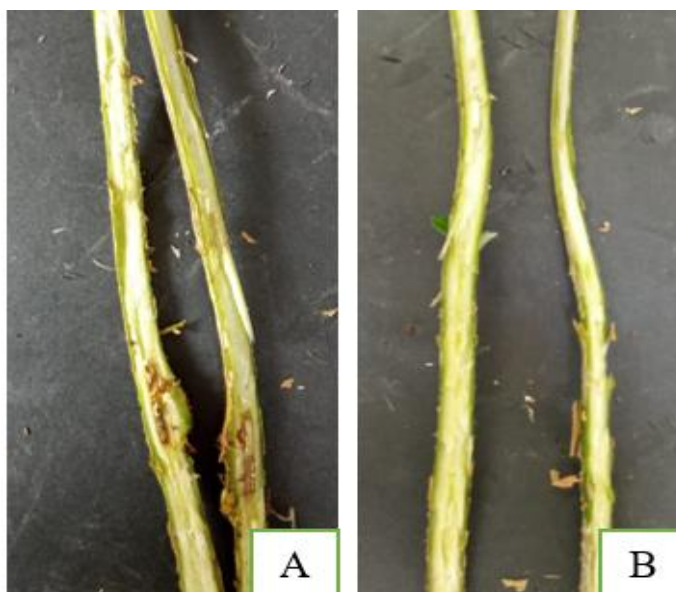


Ilustración 4-17: Daño a nivel vascular en plantas inoculadas sin herida con *Nectria pseudotrichia*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

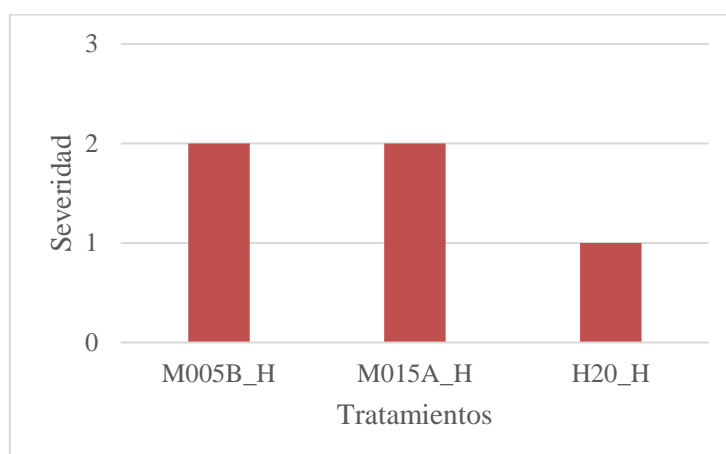


Ilustración 4-18: Severidad presente en plantas inoculadas con herida con *Nectria pseudotrichia*

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.6 Re-aislamiento

A partir de las plantas de melina que fueron inoculadas con diferentes cepas de *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrichia* mediante diversos métodos de inoculación y que posteriormente presentaron síntomas evidentes de marchitez y pudrición en el fuste, se procedió a realizar el aislamiento de hongos que mostraron características culturales y morfológicas (Ilustración 4-19) que se asemejaban a las de los hongos utilizados originalmente en el proceso de inoculación. Este procedimiento permitió cumplir con los postulados de Koch.

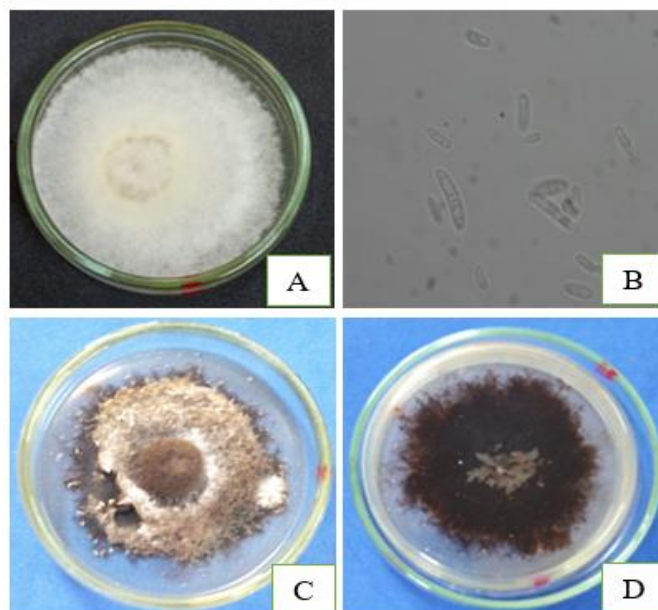


Ilustración 4-19: Características culturales y morfológicas de *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrichia*
 Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023

4.1.7 Tasa de crecimiento micelial de *Fusarium solani* en confrontación con *Trichoderma spp.*

Cepa M012A:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Fusarium solani* cepa M012A mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,0149 (ANEXO N). La prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-6). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. andinense* vs (M012A) con un promedio de 1,24 mm/día y el de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. resei* vs (M012A) con un promedio de 0,67 mm/día.

Tabla 4-6: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial M012A

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. andinense</i> vs (M012A)	1,25	a
<i>T. harzianum</i> vs (M012A)	1,10	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M012A)	1,07	ab
<i>T. lentiforme</i> vs (M012A)	0,99	ab
<i>T. breve</i> vs (M012A)	0,88	ab
<i>T. resei</i> vs (M012A)	0,67	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cepa M018A:

El análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial de *Fusarium solani* cepa M018A mostró que no existió efecto entre los tratamientos evaluados, con un valor de 0,725 (ANEXO O).

Cepa M026B:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Fusarium solani* cepa M012A mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,00289 (ANEXO P). La prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-7). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. andinense* vs (M026B) con un promedio de 1,72 mm/día y el de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. resei* vs (M026B) con un promedio de 0,87 mm/día.

Tabla 4-7: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial M026B

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. andinense</i> vs (M026B)	1,72	a
<i>T. breve</i> vs (M026B)	1,42	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M026B)	1,20	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M026B)	1,10	b
<i>T. lentiforme</i> vs (M026B)	0,98	b
<i>T. resei</i> vs (M026B)	0,87	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.8 Tasa de crecimiento micelial de *Nectria pseudotrichia* en confrontación con *Trichoderma* spp.

Cepa M005B:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Nectria pseudotrichia* cepa M005B mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,0215 (**ANEXO Q**). La prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-8). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. longibrachiatum* vs (M005B) con un promedio de 1,86 mm/día y el de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. resei* vs (M005B) con un promedio de 0,94 mm/día.

Tabla 4-8: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial M005B

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M026B)	1,86	a
<i>T. breve</i> vs (M026B)	1,22	ab
<i>T. andinense</i> vs (M026B)	1,12	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M026B)	1,07	b
<i>T. lentiforme</i> vs (M026B)	1,07	b
<i>T. resei</i> vs (M026B)	0,94	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cepa M015A:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Nectria pseudotrichia* cepa M015A mostró que no existió efecto entre los tratamientos evaluados, con un valor de 0,249 (**ANEXO R**).

4.1.9 Tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. en confrontación con cepas de *Fusarium solani*

Cepa M012A:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. en confrontación con *Fusarium solani* M012A mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,0234 (**ANEXO S**). La prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos

por seis tratamientos (Tabla 4-9). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. resei* vs (M012A) con un promedio de 17,73 mm/día y el de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. andinense* vs (M012A) con un promedio de 9,07 mm/día.

Tabla 4-9: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M012A

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M012A)	17,73	a
<i>T. lentiforme</i> vs (M012A)	14,89	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M012A)	13,93	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M012A)	12,65	ab
<i>T. breve</i> vs (M12A)	11,60	ab
<i>T. andinense</i> vs (M12A)	9,07	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cepa M018A:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Trichoderma* en confrontación con *Fusarium solani* M018A mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,000282 (ANEXO T). La prueba de Tukey al 5 % mostró seis grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-10). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. resei* vs (M018A) con un promedio de 17,92 mm/día y el de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. andinense* vs (M012A) con un promedio de 7,55 mm/día.

Tabla 4-10: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M018A

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M018A)	17,92	a
<i>T. breve</i> vs (M018A)	14,72	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M018A)	13,46	abc
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M018A)	11,58	bcd
<i>T. lentiforme</i> vs (M018A)	9,38	cd
<i>T. andinense</i> vs (M12A)	7,55	d

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cepa M026B:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. en confrontación con *Fusarium solani* M026B mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,0106 (**ANEXO U**). La prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-11). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. resei* vs (M026B) con un promedio de 18,48 mm/día y la de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. andinense* vs (M026B) con un promedio de 8,87 mm/día.

Tabla 4-11: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M026B

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M026B)	18,48	a
<i>T. lentiforme</i> vs (M026B)	16,11	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M026B)	14,13	ab
<i>T. breve</i> vs (M026B)	11,93	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M026B)	10,04	b
<i>T. andinense</i> vs (M026B)	8,87	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.10 Tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. en confrontación con cepas de *Nectria pseudotrichia*

Cepa M005B:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. en confrontación con *Nectria pseudotrichia* M015A mostró que no existió efecto entre los tratamientos evaluados, con un valor de 0,166 (**ANEXO V**).

Cepa M015A:

El análisis de varianza de la tasa del crecimiento micelial de cepas de *Trichoderma* en cepa de *Nectria pseudotrichia* M015A mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 9.52e-09 (**ANEXO W**). La prueba de Tukey al 5 % mostró dos grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-12). Se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento

micelial fue en *T. resei* vs (M026B) con un promedio de 18,42 mm/día y el de menor tasa de crecimiento micelial fue el tratamiento *T. andinense* vs (M026B) con un promedio de 8,23 mm/día.

Tabla 4-12: Prueba de Tukey al 5% de la tasa de crecimiento micelial en M015A

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M026B)	18,42	a
<i>T. lentiforme</i> vs (M026B)	10,06	b
<i>T. breve</i> vs (M026B)	9,71	b
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M026B)	9,40	b
<i>T. harzianum</i> vs (M026B)	8,33	b
<i>T. andinense</i> vs (M026B)	8,23	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.11 Porcentaje de inhibición de la confrontación de *Trichoderma* spp. vs *Fusarium solani* al séptimo día de la siembra dual

Cepa M012A:

El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cepa de *Fusarium solani* M012A vs *Trichoderma* spp. evaluadas al día 7 de la siembra dual mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,0166 (**ANEXO X**). La prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-13). Se observó que el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue en *T. resei* vs (M012A) con un promedio de 75,29 % y el de menor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue el tratamiento *T. andinense* vs (M012A) con un promedio de 54,16 %.

Tabla 4-13: Prueba de Tukey al 5% de porcentaje de inhibición micelial en M012A

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M012A)	75,29	a
<i>T. breve</i> vs (M012A)	67,69	ab
<i>T. lentiforme</i> vs (M012A)	63,33	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M012A)	60,36	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M12A)	59,35	ab
<i>T. andinense</i> vs (M12A)	54,16	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

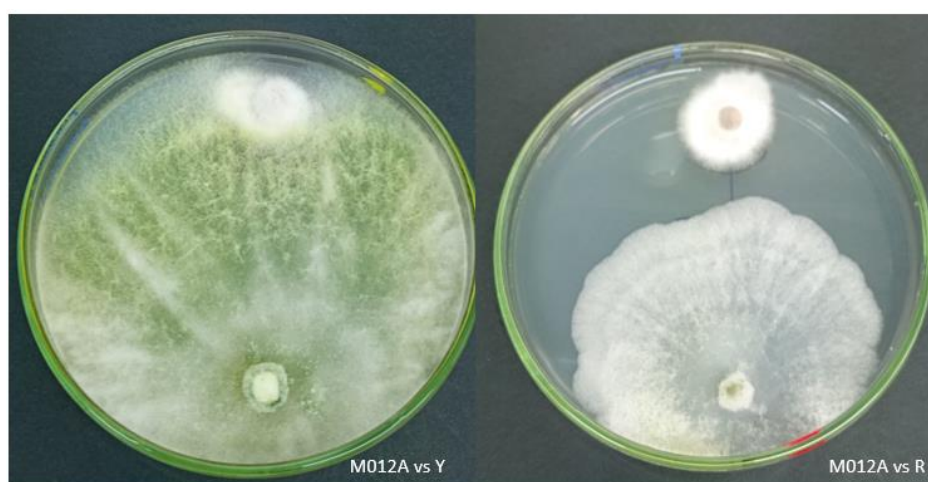


Ilustración 4-20: Porcentaje de inhibición de la confrontación de *Trichoderma* spp. vs M012A

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cepa M018A:

El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cepa *Fusarium solani* M026B vs *Trichoderma* spp. evaluadas al séptimo día de la siembra dual mostró que no existió efecto entre los tratamientos evaluados, con un valor de 0,852 (**ANEXO Y**).

Cepa M026B:

El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cepa de *Fusarium solani* M026B vs *Trichoderma* spp. evaluadas al séptimo día de la siembra dual mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos, con un valor de 0,00113 (**ANEXO Z**). La prueba de Tukey al 5 % mostró cuatro grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-14).

Se observó que el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue en *T. resei* vs (M026B) con un promedio de 71,89 % y el de menor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue el tratamiento *T. andinense* vs (M026B) con un promedio de 44,50 %.

Tabla 4-14: Prueba de Tukey al 5% de porcentaje de inhibición micelial en M026B

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M026B)	71,89	a
<i>T. Lentiforme</i> vs (M026B)	68,59	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M026B)	64,70	ab
<i>T. harzianum</i> vs (M026B)	61,24	ab
<i>T. breve</i> vs (M026B)	53,92	bc
<i>T. andinense</i> vs (M026B)	44,50	c

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

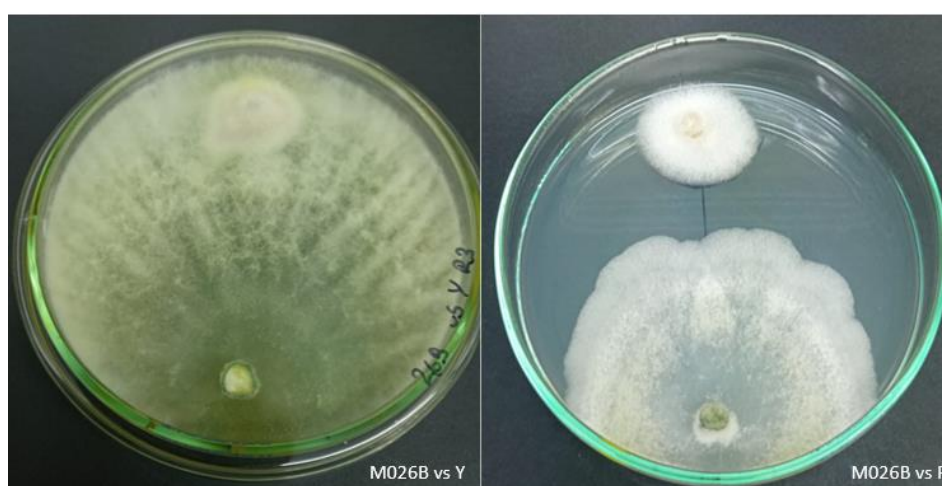


Ilustración 4-21: Porcentaje de inhibición de la confrontación de *Trichoderma* spp. vs M026B

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.12 Porcentaje de inhibición de la confrontación de *Trichoderma* spp. vs *Nectria pseudotrichia* al séptimo día de la siembra dual

Cepa M005B:

El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cepa de *Nectria pseudotrichia* M005B vs *Trichoderma* spp. evaluadas al séptimo día de la siembra dual, con un valor de 0,0416 (ANEXO AA) mostró que existió efecto significativo entre los tratamientos. La

prueba de Tukey al 5 % mostró tres grupos comprendidos por seis tratamientos (Tabla 4-15). Se observó que el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue en *T. resei* vs (M005B) con un promedio de 73,62 % y la de menor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue el tratamiento *T. longibrachiatum* vs (M005B) con un promedio de 47,54 %.

Tabla 4-15: Prueba de Tukey al 5% de porcentaje de inhibición micelial en M005B

Tratamientos	Media	Grupos
<i>T. resei</i> vs (M005B)	73,62	a
<i>T. harzianum</i> vs (M005B)	71,37	ab
<i>T. lentiforme</i> vs (M005B)	69,88	ab
<i>T. andinense</i> vs (M005B)	68,75	ab
<i>T. breve</i> vs (M005B)	65,78	ab
<i>T. longibrachiatum</i> vs (M005B)	47,54	b

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

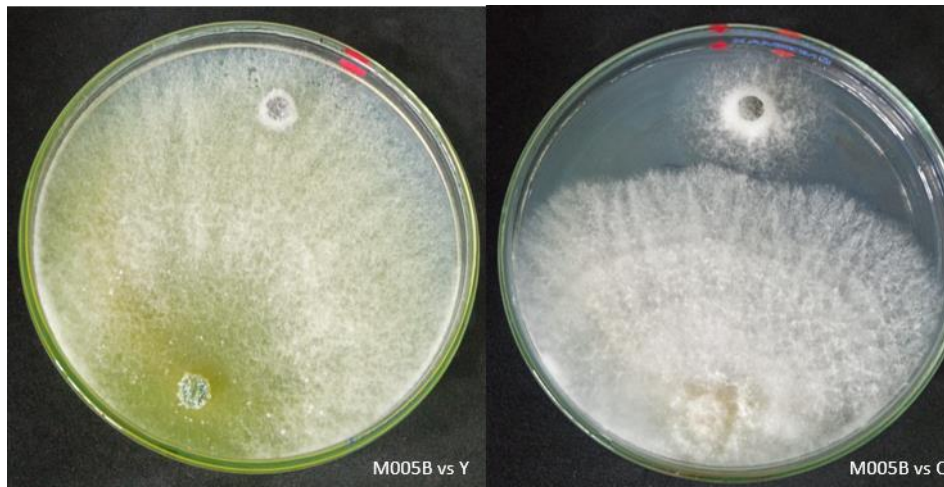


Ilustración 4-22: Porcentaje de inhibición de la confrontación de *Trichoderma* spp. vs M005B.

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

Cepa M015A:

El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de la cepa de *Nectria pseudotrichia* M015A vs *Trichoderma* spp. evaluadas al séptimo día de la siembra dual mostró que no existió efecto entre los tratamientos evaluados, con un valor de 0,274 (**ANEXO AB**).

4.1.13 Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium solani*

En la escala de evaluación de micoparasitismo (mecanismo de acción antagónica) alcanzado por las *Trichoderma* spp. al enfrentarse a *Fusarium solani*, los tratamientos: *T. resei* vs M012A, *T. resei* vs M018A y *T. resei* vs M026B lograron alcanzar la clase 1 de la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), Tabla 4-16, por crecer completamente sobre la colonia de las cepas patógeno *Fusarium solani* y cubrir toda la caja Petri, en un tercer nivel se tiene los tratamientos *T. andinense* vs M012A, *T. lentiforme* vs M018A, *T. andinense* vs M018A, *T. longibrachiatum* vs M026B y *T. andinense* vs M026B logrando crecer aproximadamente la mitad de la superficie sin existir dominancia.

Tabla 4-16: Capacidad antagonista según escala de Bell *et al.*

Cepas <i>Trichoderma</i>	Cepas <i>F. solani</i>	Antagonismo
<i>T. breve</i>	M012A	2
<i>T. harzianum</i>	M012A	2
<i>T. lentiforme</i>	M012A	2
<i>T. longibrachiatum</i>	M012A	2
<i>T. andinense</i>	M012A	3
<i>T. resei</i>	M012A	1
<i>T. breve</i>	M018A	2
<i>T. harzianum</i>	M018A	2
<i>T. lentiforme</i>	M018A	3
<i>T. longibrachiatum</i>	M018A	2
<i>T. andinense</i>	M018A	3
<i>T. resei</i>	M018A	1
<i>T. breve</i>	M026B	2
<i>T. harzianum</i>	M026B	2
<i>T. lentiforme</i>	M026B	1
<i>T. longibrachiatum</i>	M026B	3
<i>T. andinense</i>	M026B	3
<i>T. resei</i>	M026B	1

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.1.14 Capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Nectria pseudotrachia*

En la escala de evaluación de micoparasitismo alcanzado por las especies de *Trichoderma* al enfrentarse a *Nectria pseudotrachia*, los tratamientos: *T. resei* vs M005B y *T. resei* vs M015A lograron alcanzar la clase 1 de la escala propuesta por Bell et al. (1982), Tabla 4-17, por crecer completamente sobre la colonia de las cepas patógeno *Nectria pseudotrachia*; en un tercer nivel se tiene los tratamientos *T. andinense* vs M005B y *T. harzianum* vs M015A los cuales lograron una clase 3: logrando crecer aproximadamente la mitad de la superficie sin existir dominancia.

Tabla 4-17: Capacidad antagonista según escala de Bell et al.

Cepas <i>Trichoderma</i>	Cepas <i>F. solani</i>	Antagonismo
<i>T. breve</i>	M005B	2
<i>T. harzianum</i>	M005B	2
<i>T. lentiforme</i>	M005B	2
<i>T. longibrachiatum</i>	M005B	2
<i>T. andinense</i>	M005B	3
<i>T. resei</i>	M005B	1
<i>T. breve</i>	M015A	2
<i>T. harzianum</i>	M015A	3
<i>T. lentiforme</i>	M015A	2
<i>T. longibrachiatum</i>	M015A	2
<i>T. andinense</i>	M015A	2
<i>T. resei</i>	M015A	1

Realizado por: Benalcázar Kevin, 2023.

4.2 Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio determinaron un porcentaje de incidencia del 18, 88 % representando 8 árboles ha⁻¹ enfermos en una densidad promedio de 400 árboles ha⁻¹ en plantaciones de uno y dos años de edad en el Predio Pitzar. Estos resultados son similares a los obtenidos por Belezaca et al. (2021: p. 318) quién reporta un 17,9 % de incidencia en plantaciones de 2 años de edad, con un promedio de 10 árboles enfermos por hectárea a una densidad de 1080 árboles ha⁻¹. Otro estudio realizado por Arguedas et al. (2018: p. 6) en donde clasifica en 4 grupos la incidencia de la enfermedad, alcanzando un rango entre 17-35 % la incidencia en el tercer grupo, considerando plantaciones de dos a seis años de edad.

Para la severidad de la enfermedad se obtuvieron los siguientes resultados, la mayor parte de árboles enfermos en plantaciones de uno y dos años de edad, se ubicaron en la escala 2 representando el 80 % del total de los árboles enfermos, mientras que en las categorías 3 y 4 representa aproximadamente el 20 % de los árboles enfermos en cada categoría. Dichos resultados son similares a los obtenidos por Belezaca et al. (2021: p. 319) quien en su estudio determinó que la mayoría de los árboles enfermos que se encontraban en la plantación de 2 años se clasificaron principalmente en las categorías 2 y 4.

Los aislados fúngicos pertenecientes a *Fusarium solani* presentaron colonias con coloración blanca en el anverso y crema en el reverso, con forma circular, borde entero, micelio algodonoso, elevación y superficie variada, sus macroconidias relativamente en forma de gancho en la parte basal con 3-7 septos, sus microconidias se formaban como falsas cabezas en forma ovalada, se observó monofiálides alargadas. Dicha caracterización morfológica concuerda con lo descrito por Leslie y Summerell (2006, pp. 250-251) y Balmas et al. (2000: pp. 16-22). El tamaño de las macroconidias fue de 10-12,5 μm de largo x 5 μm de ancho y las microconidias de 5,25 μm de largo x 3,75 μm de ancho. Resultados que difieren con los obtenidos por López et al. (2019: pp. 10-11) quien obtuvo macroconidias con una media de 26, 01 μm de largo y microconidias con una longitud de 10 μm . De igual manera Rivas et al. (2018: p. 73) reportó macroconidias con una longitud de 22-29 μm y 4,3-6,5 μm de ancho, mientras que las microconidias presentaron una longitud de 6,78-8,44 μm y 2,43-3,12 μm de ancho.

Los aislados fúngicos pertenecientes a *Nectria pseudotrichia* presentaron colonias con coloración blanca y gris en el anverso con una coloración negra y marrón en el reverso, forma circular, borde entero, elevación Umbonada y rizada, y superficie concéntrica. Resultados que concuerdan con los obtenidos por Xiansheng et al. (2021) quien a partir de PDA obtuvo aislados con colonias color oscuro en el centro de la colonia y se fue aclarando gradualmente hasta el borde de las colonias en el anverso.

Los hallazgos derivados de esta investigación corroboran la capacidad patogénica de *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrichia* en plantas de melina., lo cual resulta congruente con lo reportado por (Chavarría y Carmona, 2016: p.24) quienes identificaron a *Fusarium solani* como el principal agente causal de la enfermedad de cáncer de tronco en plantaciones de melina en la región de Costa Rica. Por otro lado (Arguedas, 2007, p. 26) en su investigación sobre plagas y enfermedades forestales en Costa, identificó a *Nectria* sp. como un agente patógeno que afecta el fuste de árboles de Gmelina arborea, así como también se encontró presente en especies leñosas como *Schizolobium*

parahybum (pachaco), *Tectona grandis* (Teca) y *Terminalia amazonia* (roble). Los hongos pertenecientes al género *Nectria* son comúnmente encontrados en árboles y arbustos de hojas anchas en regiones de clima templado en el hemisferio norte. Estos hongos tienen la capacidad de inducir la formación de tumores o lesiones en el tejido de una amplia variedad de especies de árboles y arbustos, que abarcan más de 60 tipos diferentes. Entre las especies afectadas se encuentran el manzano, el peral, el álamo, el sazafrán y el nogal, según lo indicado por (Xiansheng et al. 2021). Sin embargo, existe una discrepancia con el estudio de Coy-Rodríguez et al, (2018: p.350), quienes identificaron a *Lasiodiplodia theobromae* y *Curvularia geniculata* como los hongos patógenos responsables de afectar a las plantas de melina en las plantaciones ubicadas en el Departamento de Tolima, Colombia.

En relación con la Tasa de crecimiento micelial (TCM) de *Trichoderma* spp. en confrontación con cepas de *Fusarium solani* el cual el mayor crecimiento micelial lo obtuvo *T. andinense* con promedios de: 1,24 mm/día frente a la cepa (M012A) y 1,72 mm/día para la cepa (M026B), por otro lado, *T. resei* presentó menor tasa de crecimiento micelial (TCM) con promedios de: 0,67 mm/día para cepa (M012A) y 0,87 mm/día para la cepa (M026B); mientras que para la tasa de crecimiento micelial de *Nectria pseudotrichia* en confrontación con *Trichoderma* spp. se observó que el tratamiento con mayor tasa de crecimiento micelial fue en *T. longibrachiatum* frente a la cepa (M005B) con un promedio de 1,86 mm/día y la de menor tasa de crecimiento micelial se presentó de igual manera con *T. resei* frente a la cepa (M005B) con un promedio de 0,94 mm/día. Siendo congruente con los datos obtenidos por Meléndez (2020) ya que *T. resei* fue dominante con su mayor capacidad inhibitoria capaz de controlar el crecimiento micelial de forma satisfactoria frente a diferentes cepas de *M. roreri*, *M. gloesporoides* y *C. lunata* con una TCM promedio de 1,03 mm/día, *Trichoderma* spp. es uno de microorganismos más utilizados como agente de control biológico debido a su capacidad de parasitismo, antibiosis, producción de metabolitos secundarios e inducción del sistema de defensa de las plantas. (Zin y Badaluddin, 2020: p.168); Por el contrario *T. andinense* y *T. longibrachiatum* no producen una mayor interacción o inhibición en el crecimiento micelial entre los demás evaluados, sin embargo, demostró ser capaz de controlar el crecimiento micelial del patógeno de manera satisfactoria.

Trichoderma resei logró el mejor promedio de inhibición con 73,64 % para cepas de *Fusarium solani*, mientras que un 73,62 % de inhibición para *Nectria pseudotrichia*. Estos resultados son congruentes con los resultados obtenidos por Mohamed y Haggag (2010, 509) quienes en su estudio obtuvieron una inhibición del 99,5 % del crecimiento de *Fusarium oxysporum* frente a *Trichoderma resei* empleando cepas mutantes obtenidas luego de siete subcultivos de *Trichoderma resei*. Esto indica que *Trichoderma resei* tiene un alto potencial como agente de

control biológico no solo para *Fusarium solani*, sino también para otros patógenos fúngicos asociados a diferentes enfermedades fitosanitarias. De la misma manera estos resultados difieren con los obtenidos por EL-NAGGAR et al. (2008; 143) quién indica que *Trichoderma resei* afectó el crecimiento de *Botrytis fabae* en un 40,2 %, siendo un rango inferior al 50 %. Estas diferencias pueden atribuirse a múltiples factores, como la especificidad del patógeno, las cepas y mutantes de *Trichoderma* utilizadas, así como las condiciones experimentales. Es importante tener en cuenta que la interacción entre los organismos beneficiosos y los patógenos es altamente dependiente de la especie de *Trichoderma* y el patógeno específico involucrado. Cada combinación de especies de *Trichoderma* y patógenos puede tener diferentes niveles de inhibición debido a las adaptaciones y características propias de cada organismo.

Los resultados de la evaluación de la actividad antagónica de las cepas de hongos aisladas de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatogénico *Fusarium solani*. Mostró que 3 de los 18 aislamientos inhibieron el crecimiento del hongo patógeno en clase 1 de la escala propuesta por Bell et al. (1982), Ethur (2006), en sus estudios, donde mendicantes aislados de *Trichoderma* spp. con potencial antagónico frente aislados de *Fusarium Solani* presentaron calificaciones menores a 2.0 en la misma escala en el control in vitro resultados que son similares a los obtenidos en el presente estudio, siendo solo la cepa de *T. resei* mostró acción satisfactoria frente a las diferentes cepas de *Fusarium solani* como son las cepas M012A, M018A y M026B. En el estudio de Santos (2008) también presentaron resultados similares en donde se evaluó la inhibición de la esporulación de *Fusarium Oxysporum* frente a seis diferentes aislados de *Trichoderma* spp. donde mostraron una excelente acción antagónica capaz de esporular sobre toda la superficie del medio, obteniendo un grado 1 en la escala de Bell et al. (1982).

En el caso de la evaluación de la actividad antagónica de las cepas de hongos aisladas de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatogénico *Nectria pseudotrichia*, se evidenció que 2 de los 12 aislamientos inhibieron el crecimiento del hongo siendo sola las cepas de *T. resei* quien logró alcanzar la clase 1 de la escala propuesta por Bell et al. (1982). Según Mezzomo (2014) en la prueba de confrontación directa de *Trichoderma* spp. y el compuesto Agrotich Plus® demostró ser eficiente en el biocontrol *Ceratocystis fimbriata* presentando puntuaciones menores a 2 en la escala propuesta por Bell et al. (1982), concluyendo que cada 7 de 10 aislados *Trichoderma* spp. ensayado se obtuvo una nota 1, Santos (2012) quien también concuerda con los datos obtenidos los cual podemos consolidar el potencial de inhibición de crecimiento micelial in vitro de géneros de *Trichoderma* spp contra géneros *Ceratocystis* spp. siendo *Trichoderma Asperellum* quien presentó mejores calificaciones promedios entre 1,10 y 1,15 en la escala propuesta por Bell et al. (1982) y Rodríguez (2010), respectivamente.

Trichoderma spp. se caracteriza por su capacidad de micoparasitismo, que implica la agresión directa de un hongo a otro. Este proceso complejo involucra una serie de etapas secuenciales, que incluyen el reconocimiento del hospedero, el ataque a su estructura y, finalmente, la penetración y descomposición de la pared celular del hongo huésped. Esto se debe en gran medida a la acción de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas producidas por *Trichoderma* spp. Además, *Trichoderma* spp. puede ejercer el biocontrol directo al parasitar una variedad de hongos, detectar la presencia de otros hongos y direccionar su crecimiento hacia ellos. (Benítez et al., 2004: p.256; Sánchez-Montesinos et al., 2021: p.2).

El presente estudio se considera pionero en la descripción de la especie *Nectria pseudotrichia* como patógeno en fustes de *Gmelina arborea* en Ecuador asociados a la enfermedad cáncer de tronco en conjunto con la especie *Fusarium solani*. En tal razón este estudio es el inicio para otras investigaciones sobre el manejo integrado, así como también estudios para minimizar los posibles daños y la afectación de la melina y la industria forestal en el Ecuador.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La enfermedad cáncer de tronco presentó un 18,88 % de incidencia en plantaciones de *Gmelina arborea* en los 3 sectores del predio Pizará, lo que representa a 8 árboles ha⁻¹ a una densidad de 400 árboles ha⁻¹, siendo los rodales DT31A y DR40A los que presentaron mayores porcentajes de incidencia con 28,96 % y 25,93 % respectivamente, La gran mayoría de los árboles enfermos, concretamente el 80%, fueron clasificados en la categoría 2, mientras que el 20% restante se ubicó en las categorías 3 y 4.

Se identificó a *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrachia* como hongos patógenos asociados al cáncer de tronco en *Gmelina arborea* (melina) en los sectores del predio Pizará evaluados en esta investigación.

Se encontró diversos niveles de antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a las cepas de *Fusarium solani* y *Nectria pseudotrachia*: En inhibición del crecimiento micelial, *T. resei* presentó mayor porcentaje de inhibición para *Fusarium solani* (M012A, M026B), así como también para *Nectria pseudotrachia* (M005B). Y para la variable micoparasitismo las especies que lograron la escala 1 fueron: *T. resei* para *Fusarium solani* (M012A, M018A) adicionalmente *T. lentiforme* para (M026B), de igual manera *T. resei* para *Nectria pseudotrachia* (M005B, M015A).

5.2 Recomendaciones

Realizar pruebas de patogenicidad en plántulas de *Gmelina arborea* en los diferentes clones identificados por la empresa con el fin de determinar la patogenicidad y agresividad de los hongos obtenidos en esta investigación asociados al cáncer de tronco.

Probar medios de cultivos y condiciones de incubación diferentes a los de esta investigación para lograr la producción de esporas de *Nectria pseudotrichia*.

GLOSARIO

Aislamiento: Proceso mediante el cual se obtiene un hongo u otro organismo en cultivo puro (Ulloa et al., 2006: p.14).

Agente causal: Un organismo presente en el entorno que, debido a sus características, puede generar inconvenientes de salud vegetal en el huésped (Massalimov et al., 2017: p.307).

Antagonismo: Es una relación entre dos organismos opuestos, en la que uno de los dos afecta la vida del otro, inhibe parcial o totalmente su crecimiento o incluso lo mata. (Ulloa et al., 2006: p.26).

Apeo: Corte de árboles vivos o muertos.

Árbol: Planta maderable y perenne mayor de 5 m de alto y que llega a alcanzar hasta más de 100 m de altura; normalmente es una Dicotiledonea (Marquez Dávila et al, 2021).

Brote epicórmico: Vástago o rama nacidos a partir de una yema proventicia, bien sobre el fuste, bien sobre ramas gruesas de un árbol, tras una poda o una puesta en luz.

Cepas: Constituyen la base fundamental para el crecimiento de cualquier tipo de hongo en un entorno de laboratorio (Mata y Salmones, 2021: p.29).

Clamidosporas: Conidios desarrollados dentro de la hifa (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Fiálide: Tipo de célula conidiógena, con forma de botella que producen conidios blásticos (fialoconidios o fialosporas) en sucesión basípeta a partir de un locus (monofiálide; con una abertura) o varios loci (polifiálide) sin que haya aumento de la longitud de la fiálide misma (Ulloa et al., 2006: p.236).

Hialino: Transparente o casi; translúcido; utilizado a menudo en el sentido de incoloro (D'Arcy et al., 2001: p.2).

Macroconidios: Conidio o espora de reproducción asexual, encorvado y sigmoide, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por ser multicelular (Ulloa et al., 2006: p.352).

Medio de Cultivo: Medio nutritivo preparado en el que se cultivan microorganismos o células vegetales (Marquez Dávila et al, 2021).

Micelio: Masa de hifas fúngicas (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Microconidios: Conidio pequeño, generalmente unicelular. En los hongos conidiales, los conidios se producen directamente a partir de los pedicelos; rara vez los viales son producidos por metulae y en algunos casos funcionan como esporas asexuales (Ulloa et al., 2006: p.376).

Necrosis: Muerte del tejido (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Patogénico: Capaz de ocasionar enfermedad (Ryan y Ray, 2017, pp. 80-125).

Septado: Espora o hifa con divisiones (Marquez Dávila et al, 2021).

Severidad: Es el porcentaje de la superficie del órgano enfermo, ya sea de hojas, tallos, raíces o frutos afectado por la enfermedad y varía entre 0 y 100 (Marquez Dávila et al, 2021).

Sintomatología: Parte de la patología vegetal que estudia los síntomas de las enfermedades, así como la etiología estudia sus causas (Pío Font Quer, 2010: p.1003).

BIBLIOGRAFÍA

ARGUEDAS, M. "Problemas fitosanitarios de la melina (*Gmelina arborea* (Roxb)) en Costa Rica". *Kurú: Revista Forestal* [en línea], 2012, Costa Rica, 1(2), pp. 1-9. [Consulta: 23 marzo 2023] Disponible en: <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/574>

ARGUEDAS, Marcela; et al. "*Gmelina arborea* “death disease” in fast-growth plantations: Effects of soil and climatic conditions on severity and incidence and its implications for wood quality". *Forest systems* [en línea], 2018, Costa Rica, 27 (1), p. 3. [Consulta: 23 marzo 2023]. ISSN 2171-5068. Disponible en: <https://doi.org/10.5424/fs/2018271-12236>

ARIE, T. "*Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies". *Journal of Pesticide Science* [en línea], 2019, Japón, 44 (4), pp. 275-281. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1348-589X. Disponible en: [10.1584/jpestics.J19-03](https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03)

ARORA, Charu; & TAMRAKAR, Vinita. "*Gmelina arborea*: chemical constituents, pharmacological activities and applications". *International Journal of Phytomedicine* [en línea], 2017, 9 (4), pp. 528-542. [Consulta: 15 marzo 2023]. Disponible en: [10.5138/09750185.2149](https://doi.org/10.5138/09750185.2149)

ASLAM, Sidra; et al. "Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review". *Journal of Plant Interactions* [en línea], Taylor & Francis, 2017, 12 (1), pp. 493-504. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1742-9145. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1397205>

ASLAM, Sidra; et al. "Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review". *Journal of Plant Interactions* [en línea], Taylor & Francis, 2017, 12 (1), pp. 493-504. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1742-9145. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1397205>

BALMAS, V.; SANTORI, A., & CORAZZA, L. "Le specie di *Fusarium* piú comuni in Italia". Suggestimenti per il loro riconoscimento. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale. *Patria Giornale di Patologia delle Piante*, vol.10, n°1 (2000), (Italia) pp. 1-60.

BELEZACA, Carlos; et al. "Problemas forestales e incidencias en el ser humano: experiencia de *Gmelina arborea* en Ecuador". *Revista de ciencias sociales* [en línea], 2021, Ecuador, 27 (3), pp. 309-325. [Consulta: 16 marzo 2021]. ISSN 1315-9518. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8081774>

BELEZACA, Carlos; et al. "Implications of *Fusarium* spp., in the etiology of rot of the stem of *Gmelina arborea* Roxb (melina) in the Humid Ecuadorian Tropics". *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación y Saberes* [en línea], 2021, Ecuador, 11 (2), pp. 31-41. [Consulta: 16 marzo 2023]. ISSN 1390-8146. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8487679>

BELEZACA, Carlos; & SOLANO, Edison. "*Ceratocystis fimbriata*: A risk for the *Gmelina arborea* Roxb. (melina) forests in Ecuador". *International Journal of Health Sciences* [en línea], 2022, Ecuador, 6 (3), pp. 11695-11710. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 2550-696X. Disponible en: <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS3.8811>

BENÍTEZ, Tahía; et al. "Mecanismos de biocontrol de cepas de *Trichoderma*". *International Microbiology* [en línea], 2004, 7 (4), pp. 249-260. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1139-6709. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1139-67092004000400003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

CAÑEDO, Verónica; & AMES, Teresa. "Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos". *Centro Internacional de la Papa* [en línea], 2004, Perú, pp. 1-62. [Consulta: 1 abril 2023]. ISBN 92-9060-238-4. Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

CHAVARRÍA, Marena; & CARMONA, Randall. "Efecto de microorganismos antagonistas en el control de la enfermedad denominada "Nectria" en la melina *Gmelina arborea* Roxb". *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* [en línea], 2016, Costa Rica, pp. 21-29. [Consulta: 24 marzo 2023]. ISSN 2215-2504. Disponible en: <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/2549>

CHOWDHARY, Yogita. "Chemical Composition of *Gmelina arborea*: A Review". *Asian Journal of Pharmaceutical Research* [en línea], 2021, India, 11(4), pp. 269-277. [Consulta: 15 marzo 2023]. ISSN 2231-5683. Disponible en: 10.52711/2231-5691.2021.00048

Consejo Forestal ACAHN. "Taller de intercambio de experiencias de manejo y control *Nectria* sp., por productores forestales en la región huetar norte de Costa Rica con énfasis en *Gmelina arborea*". *Fondo de Financiamiento forestal* [en línea], 2014, Costa Rica, pp. 1-15. [Consulta: 23 marzo 2023]. Disponible en: <https://onfcr.org/wp-content/uploads/media/uploads/documents/taller-nectria-sp..pdf>

COY-RODRÍGUEZ, Vivian Andrea; et al. "Identificación de hongos y bacterias asociados a fustes de melina (*Gmelina arborea* ROXB) en el departamento del Tolima, Colombia". *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* [en línea], 2018, Colombia, 42 (165), pp. 343-352. [Consulta: 23 marzo 2023]. ISSN 0370-3908. Disponible en: 10.18257/raccefyn.771

DVORAK, W.S. "World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges". *New Forests* [en línea], 2004, 28 (2/3), pp. 111-126. [Consulta: 15 marzo 2023]. ISSN 0169-4286. Disponible en: 10.1023/B:NEFO.0000040940.32574.22

EL-NAGGAR, Magdy, et al. "Mycoparasitism and antagonistic efficiency of *Trichoderma reesei* against *Botrytis* spp." *Contributii Botanice* [en línea], 2008, vol. 43, pp. 141-147. [Consulta: 02-julio 2023]. Disponible en: <http://real.mtak.hu/10917/1/1226688.pdf>.

ETHUR, LZ Dinámica poblacional y acción de *Trichoderma* en el control de fusariosis en plántulas de tomate y pepino. 2006. 155f. Tesis. (Doctorado en Agronomía). Universidad Federal de Santa María, Santa María, 2006.

GURDASWANI, Vartika; & GHAG, Siddhesh. "Chapter 2 - Toxins from *Fusarium* species and their role in animal and plant diseases". *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* [en línea], 2020, pp. 7-27. [Consulta: 22 marzo 2023]. ISBN 978-0-12-821006-2. Disponible en: 10.1016/B978-0-12-821006-2.00002-9

GUZMÁN-GUZMÁN, Paulina; et al. "*Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review". *Plants* [en línea], 2023, 12 (3), pp. 432. [Consulta: 1 abril 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/plants12030432>

HOLLAND, L.A; et al. "Taxonomic revision and multi-locus phylogeny of the North American clade of *Ceratocystis*". *Fungal Systematics and Evolution* [en línea], 2019, Estados Unidos de Norte América, 3, pp. 135-156. [Consulta: 24 marzo 2023]. ISSN 2589-3823. Disponible en: 10.3114/fuse.2019.03.07

KHALID, Almutazbellah; et al. "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of *Gmelina arborea* Roxb. Leaf Extracts". *Journal of Asian Multicultural Research for Medical and Health Science Study* [en línea], 2022, India, 3 (3), pp. 32-40. [Consulta: 31 marzo 2023]. ISSN 2708-972X. Disponible en: 10.47616/jamrmhss.v3i3.314

KHAN, Raja Asad Ali; et al. "Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi". *Microorganisms* [en línea], 2020, 8 (6), p. 817. [Consulta: 16 marzo 2023]. ISSN 2076-2607. Disponible en: [10.3390/microorganisms8060817](https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817)

KLOSTERMAN, Steven. "*Real-Time PCR for the Quantification of Fungi In Planta*". *Plant Fungal Pathogens* [en línea], 2012, 835, pp. 121-132. [Consulta: 1 abril 2023]. ISBN 978-1-61779-500-8. Disponible en: [10.1007/978-1-61779-501-5_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_8)

LAHLALI, Rachid; et al. "Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective". *Microorganisms* [en línea], 2022, 10 (3), p. 596. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 2076-2607. Disponible en: [10.3390/microorganisms10030596](https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596)

LOPEZ-BAUTISTA, Viridiana; et al. " Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*". *Mexican Journal of Phytopathology* [en línea]. 2019. México, 38 (1), pp. 1-28 [Consulta: 22 junio 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v38n1/2007-8080-rmfi-38-01-79.pdf>

MACÍAS, Mariela. Determinación del agente causal de la enfermedad de marchitez vascular y pudrición del fuste de *Gmelina arborea* Roxb. en el Trópico Húmedo Ecuatoriano [En línea] (Trabajo de titulación) . UTEQ. Escuela de Forestal. (Quevedo-Ecuador). 2019. p. 37 [Consulta: 2023-09-15]. Disponible en: <https://biblioteca.esPOCH.edu.ec/Tutoriales/Norma%20ISO%20690.pdf>

MARTÍNEZ-ZURIMENDI, Pablo; et al. "Índice de sitio y producción maderable en plantaciones forestales de *Gmelina arborea* en Tabasco, México". *Revista fitotecnica mexicana* [en línea]. 2015, México, 38 (4), pp. 415-425. [Consulta: 31 marzo 2023]. ISSN 0187-7380. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-73802015000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es

MARQUEZ DÁVILA, Kadir J.; VEGA JARA, Liliana; & ALVAREZ BENAUTE, Luisa M. Glosario de términos agronómicos. Huánuco, Perú: Biblioteca Nacional del Perú N° 2021-02993, 2021.

MÉNDEZ-ÁLVAREZ, Dawa; et al. "First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt on *Gmelina arborea* in Costa Rica". *Forest Pathology* [en línea], 2020, Costa Rica, 50 (5), p. e12628. [Consulta: 23 marzo 2023]. ISSN 1439-0329. Disponible en: [10.1111/efp.12628](https://doi.org/10.1111/efp.12628)

MENESES ROJAS, Guiselle. Estudio de aislamientos del hongo fitopatógeno del café *Ceratocystis fimbriata*. [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Instituto tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica. 2008. p. 32. [Consulta: 24-06-23]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/60988968.pdf>

MEZA, Víctor; et al. "Incidencia y Severidad de La Pudrición del Tronco en plantaciones de *Gmelina arborea* (Melina), Costa Rica". INISEFOR [en línea], 2020, Costa Rica. [Consulta: 16 marzo 2023]. ISBN 978-9930-9709-0-4. Disponible en: <https://www.fonafifo.go.cr/media/3083/severidad-e-incidencia-de-la-pudrición-del-tronco-en-gmelina-arborea.pdf>

MEZZOMO, Ricardo. "Ceratocystis fimbriata Ellis & halsted en especies forestal en rio grande do sul: comportamiento y control biológico". 2014. [Consulta: 23 Julio 2023]. ISSN 1390-8146. Disponible en: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/8734/MEZZOMO%2c%20RICARDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Ministerio de Agricultura, Ganadería Acuacultura y Pesca. "Programa de Incentivos para la Reforestación con fines comerciales" [en línea], 2016. Disponible en: <https://fliphtml5.com/wtae/lgui/basic>

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, Wafaa Mohamed. "Mutagenesis and inter-specific protoplast fusion between *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei* for biocontrol improvement" [en línea], American Journal of Scientific and Industrial Research, 2010, vol. 1, no 3, pp. 504-515. [Consulta: 02 julio 2023]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-008-9900-5>.

MORETTI, A.; et al. "Encyclopedia of Food and Health" [en línea], Oxford: Academic Press, 2016, pp. 162-168. [Consulta: 22 marzo 2023]. ISBN 978-0-12-384953-3. Disponible en: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00341-X

MOYA, Roger; & TOMAZELLO, Mario. "Variation in the wood anatomical structure of *Gmelina arborea* (Verbenaceae) trees at different ecological conditions in Costa Rica". *Revista de biología tropical* [en línea], 2008, Costa Rica, 56 (2), pp. 689-704. [Consulta: 1 abril 2023]. Disponible en: 10.15517/rbt.v56i2.5617

MUKHOPADHYAY, Ria; & KUMAR, Deepak. "Trichoderma: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential". *Egyptian Journal of Biological Pest Control* [en línea], 2020, 30 (1), p. 133. [Consulta: 16 marzo 2023]. ISSN 2536-9342. Disponible en: 10.1186/s41938-020-00333-x

NAYAK, Bhabani; et al. "traditional use, toxicity study and phytochemical screening of *Gmelina arborea* roxb fruits". *International Journal of Phytopharmacy Research* [en línea]. 2015, 6 (2), pp. 78-82. [Consulta: 31 marzo 2023]. ISSN 2249-7544. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/320273173>

NWOGWUGWU, Joy; & BATCHO, Anicet. "Antifungal potentials of some botanicals on *Sclerotium rolfsii* schum., the causal pathogen of damping-off of *Gmelina arborea* Roxb. in Ibadan, Southwestern Nigeria". *Journal of Plant Diseases and Protection* [en línea], 2019, Nigeria, 126 (6), pp. 543-551. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1861-3829. Disponible en: 10.1007/s41348-019-00267-z

OSZUST, Karolina; et al. "How Do Trichoderma Genus Fungi Win a Nutritional Competition Battle against Soft Fruit Pathogens? A Report on Niche Overlap Nutritional Potentiates". *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], 2020, 2 (12), p. 4235. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1422-0067. Disponible en: 10.3390/ijms21124235

PATHALA, Deepthi; et al. "A Review on Gambhari (*Gmelina arborea* Roxb.)". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [en línea], 2015, 4 (2), pp. 127-132. [Consulta: 15 marzo 2023]. ISSN 2349-8234. Disponible en: <https://www.phytojournal.com/archives/2015.v4.i2.597/a-review-on-gambhari-gmelina-arborea-roxb>

PÍO FONT QUER. Diccionario de Botánica. 2a Ed. Balderas, México D.F.: Ediciones Península S.A., 2010. ISBN: 968186283X, pp.1-1124

PRAMOD, Sivan; et al. "Dieback of *Gmelina arborea* Trees and Structural Alterations Induced in the Wood Cell Walls by *Alternaria alternata*". *FORESTIST* [en línea], 2022, 1 (72), pp. 2-9. [Consulta: 1 abril 2023]. Disponible en: 10.5152/forestist.2020.21023

PROSPERO, Simone; et al. "Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality?". *Forest Ecology and Management* [en línea], 2021, 496, p. 119377. [Consulta: 24 marzo 2023]. ISSN 0378-1127. Disponible en: 10.1016/j.foreco.2021.119377

PUROHIT, Arnab; et al. "Biological control of Fusarium wilt in legumes". *Plant Stress Mitigators* [en línea], 2023, pp. 435-454. [Consulta: 22 marzo 2023]. ISBN 978-0-323-89871-3. Disponible en: 10.1016/B978-0-323-89871-3.00019-7

PUROHIT, Arnab; et al. "Biological control of Fusarium wilt in legumes". *Plant Stress Mitigators* [en línea], 2023, pp. 435-454. [Consulta: 22 marzo 2023]. ISBN 978-0-323-89871-3. Disponible en: 10.1016/B978-0-323-89871-3.00019-7

RAJA, Huzefa; et al. "Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community". *Journal of Natural Products* [en línea], 2017, 80 (3), pp. 756-770. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 0163-3864. Disponible en: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085

RAMÍREZ, Genovevo; et al. "Potential Areas for Growing *Gmelina arborea* Roxb., under Rainfed Conditions in Tabasco, Mexico". *Agricultural Sciences* [en línea], 2019, México, 10 (9), pp. 1206-1216. [Consulta: 31 marzo 2023]. ISSN 2156-8561. Disponible en: 10.4236/as.2019.109090

RIVAS, Tomas; et al. "Identificaction and characterization of *Fusarium* spp. from Muskmelon in Northwest Mexico". *Biotecnia* [en línea], 2018, México, XX (3), pp. 71-75. [Consulta: 22 junio 2023].

Ryan, K y Ray, C. "Sherris. Microbiología médica", McGraw Hill [en línea] (2017). 6(1) [Consulta: 25 de mayo 2023]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162978735>

RODRIGUES, J. "*Trichoderma* spp. asociado con niveles de fertilización NPK en el patosistema *Sclerotinia sclerotiorum* – frijol común". 2010. 84f. Disertación (Maestría en Agronomía), Universidad Federal de Santa María, Santa María, 2010.

ROHIT, K.; et al. "Phytochemical and pharmacological profile of *Gmelina arborea*: an overview". *International Research Journal of Pharmacy* [en línea], 2012, 3 (2), pp. 61-64. [Consulta: 31 marzo 2023]. ISSN 2230-8407. Disponible en: https://www.irjponline.com/admin/php/uploads/840_pdf.pdf

ROUMANI, Foteini. "*Fast molecular methods for the detection of spoilage fungi (in food products)*". Universidad Santiago de Compostela [en línea], 2022, España.

[Consulta: 1 abril 2023]. Disponible en: <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/29951>.
Accepted: 2023-01-19T11:32:31Z

RUIZ BLANDON, Bayron; et al. "Valoración dasométrica y producción de biomasa en *Gmelina arborea* Roxb. ex Sm. establecida en plantaciones puras y mixtas". *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* [en línea], 2020, México, 11 (59), pp 94-117. [Consulta: 31 marzo 2023]. ISSN 2448-6671. Disponible en: 10.29298/rmcf.v11i59.644

SALAS, Alexis; et al. "Evaluación de la severidad de la pudrición del tronco en *Gmelina arborea* Roxb". *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* [en línea], 2016, Costa Rica, pp. 01-10. [Consulta: 22 marzo 2023]. ISSN 2215-2504. Disponible en: doi:10.18845/rfmk.v0i0.2547

SÁNCHEZ-MONTESINOS, Brenda; et al. "Biological control of fungal diseases by *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and its compatibility with fungicides". *Journal of Fungi* [en línea], 2021, 7 (8), p. 598. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 2309-608X. Disponible en: 10.3390/jof7080598

SANTOS, C; et al. "Influencia de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*". *Scientia Plena*, [Sal], v. 8, núm. 4, pág. 1-5, 2012. 1038, 2011.

SANTOS, H. "*Trichoderma* spp. como promotores del crecimiento vegetal y como antagonista de *Fusarium oxysporum*". 2008. 94f. Disertación (Maestría en Agronomía). Universidad Federal de Brasilia, Brasilia, 2008.

SCHOCH, Conrad; et al. "NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools". *Database* [en línea], 2020, 2020, pp. 1-21. [Consulta: 24 marzo 2023]. ISSN 1758-0463. Disponible en: 10.1093/database/baaa062

SEMPERE, F.; et al. "Caracterización morfológica y cultural de *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Sacc". *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal* [en línea]. 2004, (162), pp. 101-105. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1131-8988. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1010361>

SIDRIM, José; et al. "Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review". *Canadian Journal of Microbiology* [en línea], 2010, 56 (6), pp. 445-458. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 0008-4166. Disponible en: 10.1139/W10-030

SINGH, Poonam; et al. "Tree improvement, breeding and biotechnology of *Gmelina arborea* Roxb". *Indian Forester* [en línea], 2021, India, 147 (11), pp. 1075-1082. [Consulta: 16 marzo 2023]. ISSN: 2321-094X. Disponible en: [10.36808/if/2021/v147i11/154156](https://doi.org/10.36808/if/2021/v147i11/154156)

SUMMERELL, Brett. "Resolving *Fusarium*: current status of the genus". *Annual Review of Phytopathology* [en línea], 2019, 57 (1), pp. 323-339. [Consulta: 16 marzo 2023]. Disponible en: [10.1146/annurev-phyto-082718-100204](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204)

SYAZWAN, S; et al. " Survey, Identification, and Pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata* Complex Associated with Wilt Disease on *Acacia mangium* in Malaysia". *Forests* [En línea], 2021, (Malasia) 1782 (12), pp. 1-18. [Consulta: 24 agosto 2023]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4907/12/12/1782>

THAMBUGALA, Kasun; et al. "Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en línea], 2020, 10, pp. 1-19. [Consulta: 1 abril 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7734056/>

TSUI, Clement; et al. "Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment". *IMA Fungus* [en línea], 2011, 2 (2), pp. 177-189. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 2210-6359. Disponible en: [10.5598/imafungus.2011.02.02.09](https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.09)

TYŚKIEWICZ, Renata; et al. "*Trichoderma*: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth". *International Journal of Molecular Sciences* [en línea], 2022, 23 (4), p. 2329. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1422-0067. Disponible en: [10.3390/ijms23042329](https://doi.org/10.3390/ijms23042329)

UMANA, Etim; et al. "*Gmelina Arborea* Roxb: Associated Mycoflora and Diseases in Cross River State, Nigeria". *Global Journal Inc* [en línea], 2018, Nigeria, 15 (14), pp. 1-11. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN: 2249-4626. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/326546928>

VARGAS, Marleny. "Fusarium sotaní: ¿agente causal del complejo pudrición del cogollo?". *Palmas* [en línea], 1992, 13 (1), pp. 59-67. [Consulta: 22 septiembre 2023]. Disponible en: <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/331/331>

WINGFIELD, M.; & ROBISON, D. "Diseases and insect pests of *Gmelina arborea*: real threats and real opportunities". *New Forests* [en línea], 2004, 28 (2), pp. 227-243. [Consulta: 1 abril 2023]. ISSN 1573-5095. Disponible en: 10.1023/B:NEFO.0000040950.01256.ed

ZHANG, Yong; & MA, Li-Jun. "Deciphering Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* From a Phylogenomics Perspective". *Advances in Genetics*.100 [en línea], 2017, 100, pp. 179-209. [Consulta: 16 marzo 2023]. Disponible en: 10.1016/bs.adgen.2017.09.010

ZIN, Nur; & BADALUDDIN, Noor. "Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications". *Annals of Agricultural Sciences* [en línea], 2020, 65, (2), pp. 168-178. [Consulta: 16 marzo 2023]. ISSN 0570-1783. Disponible en: 10.1016/j.aos.2020.09.003

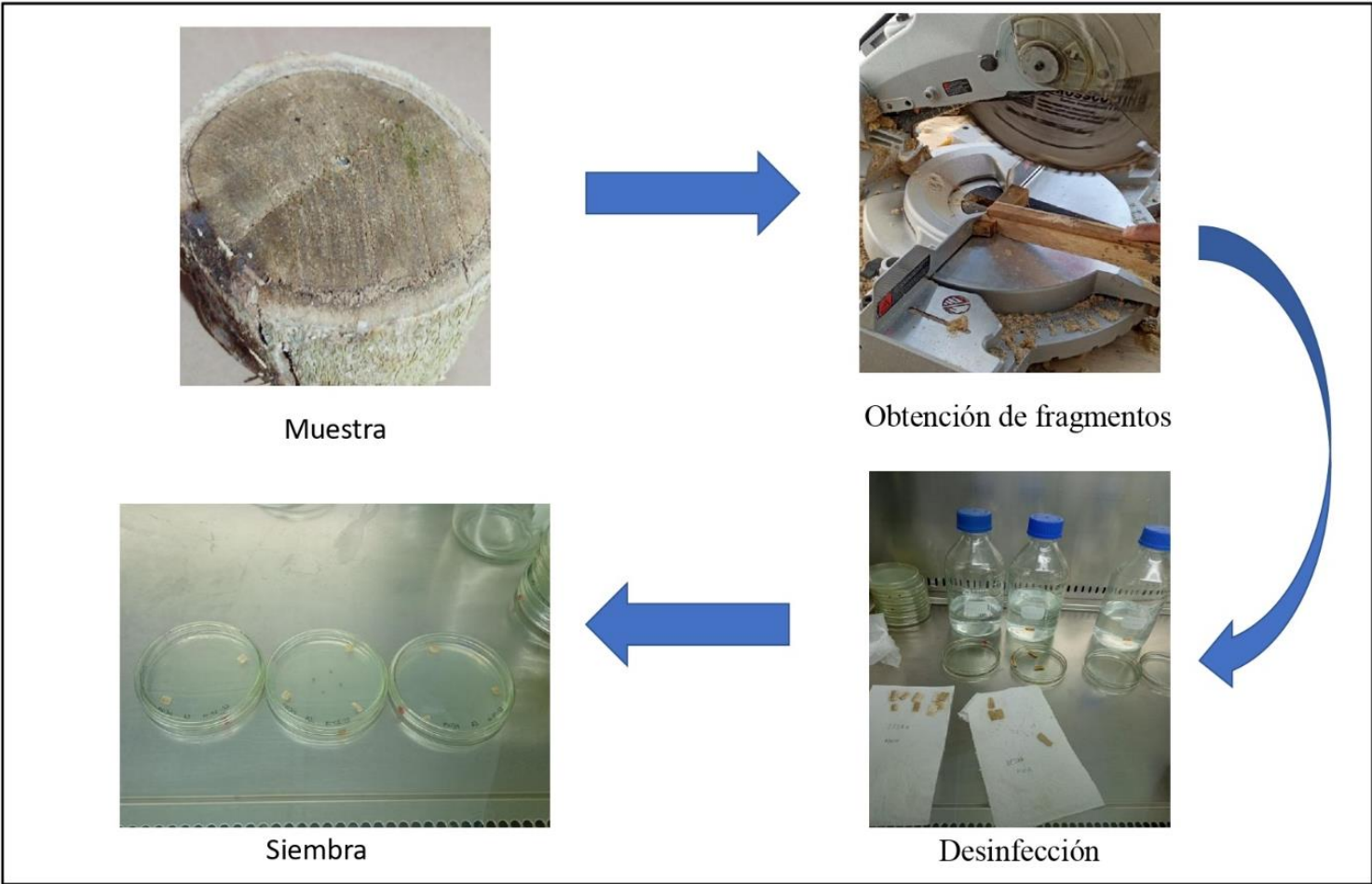


ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN DE MUESTRAS



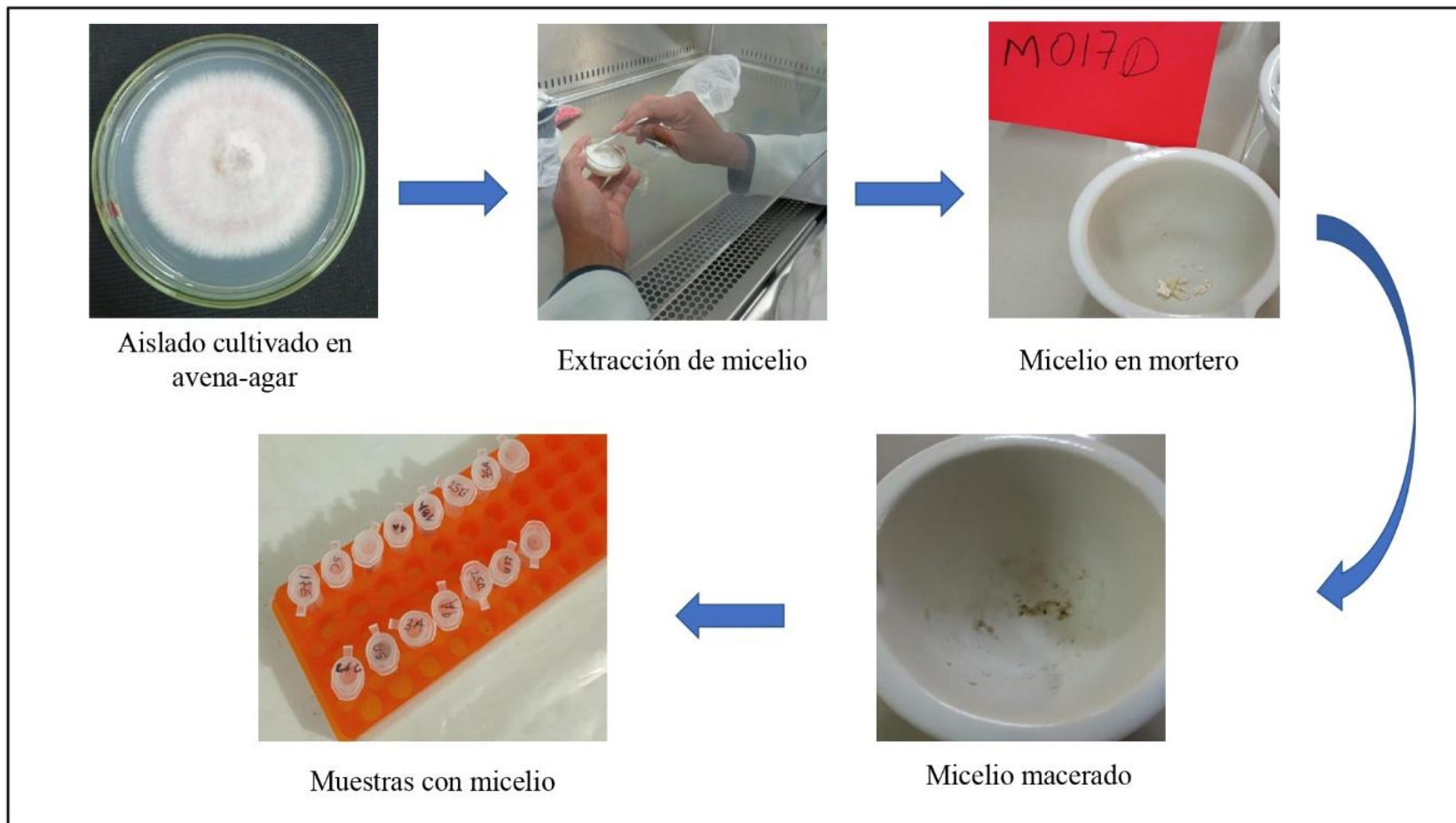
ANEXO B: AISLAMIENTO



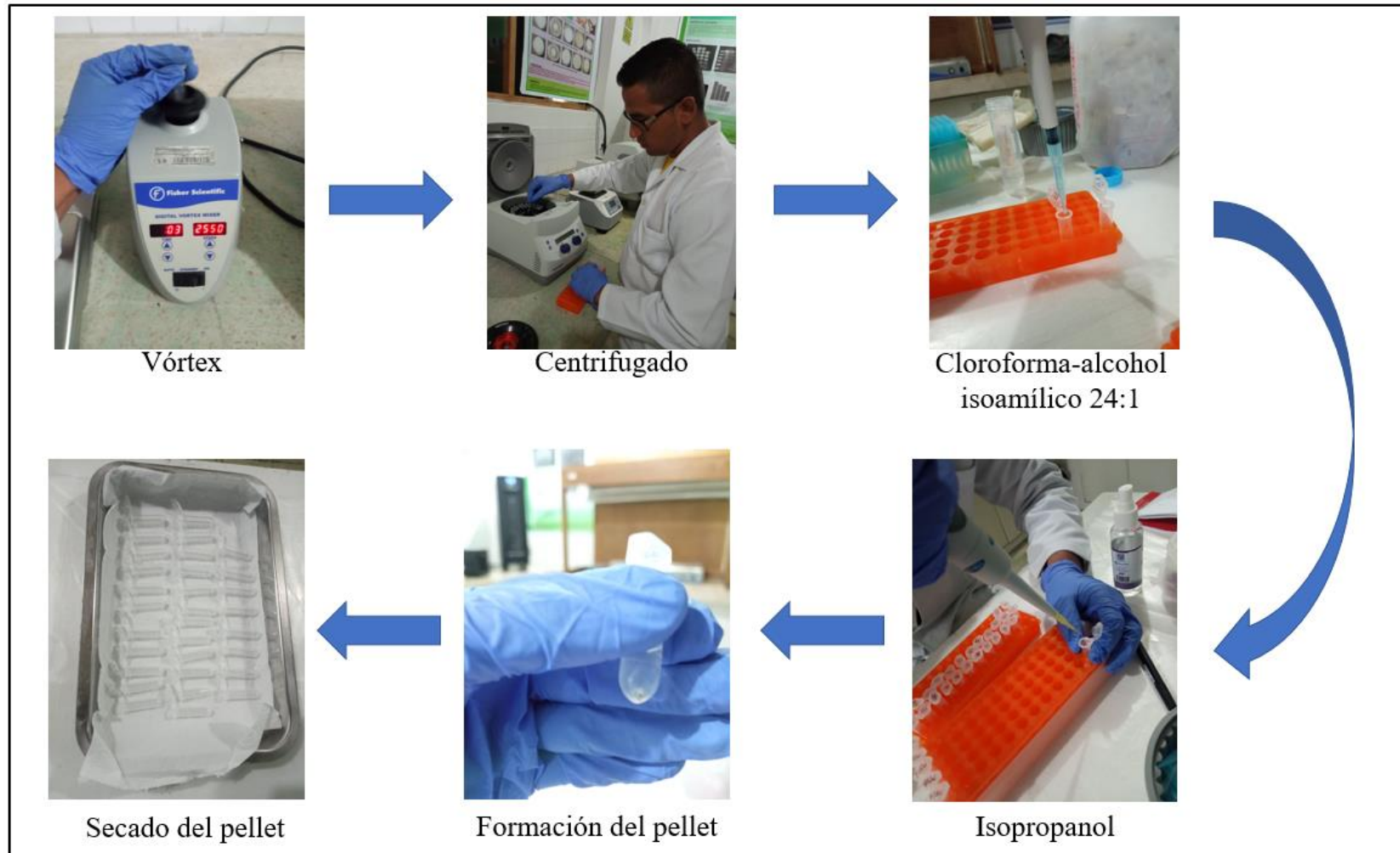
ANEXO C: PREPARACIÓN DEL MEDIO SNA

Reactivos	Cantidades
KNO ₃	1 g
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucosa	0,2 g
Sacarosa	0,2 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

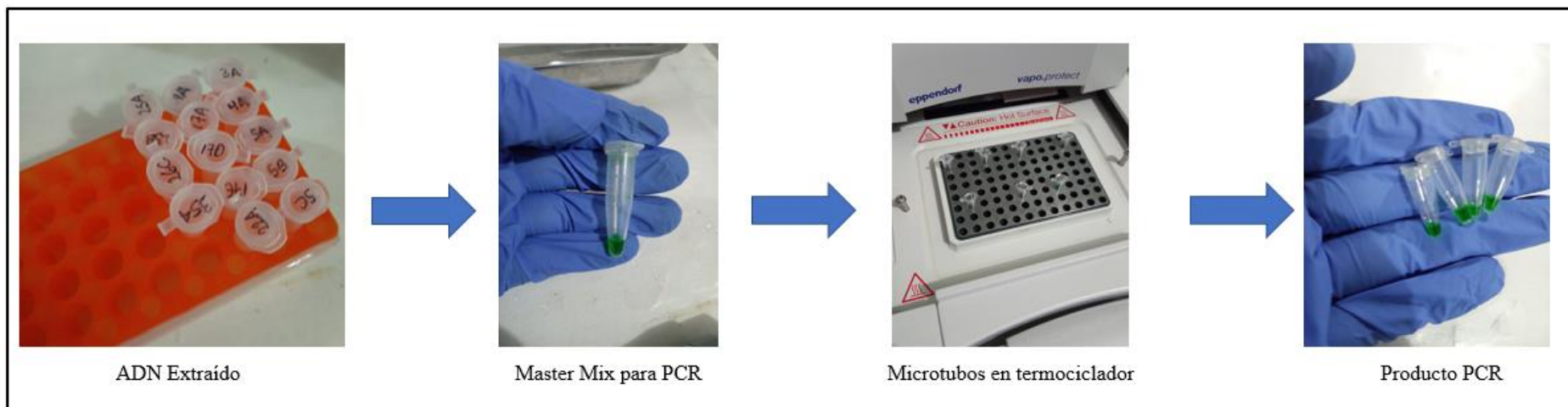
ANEXO D: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS FÍSICA)



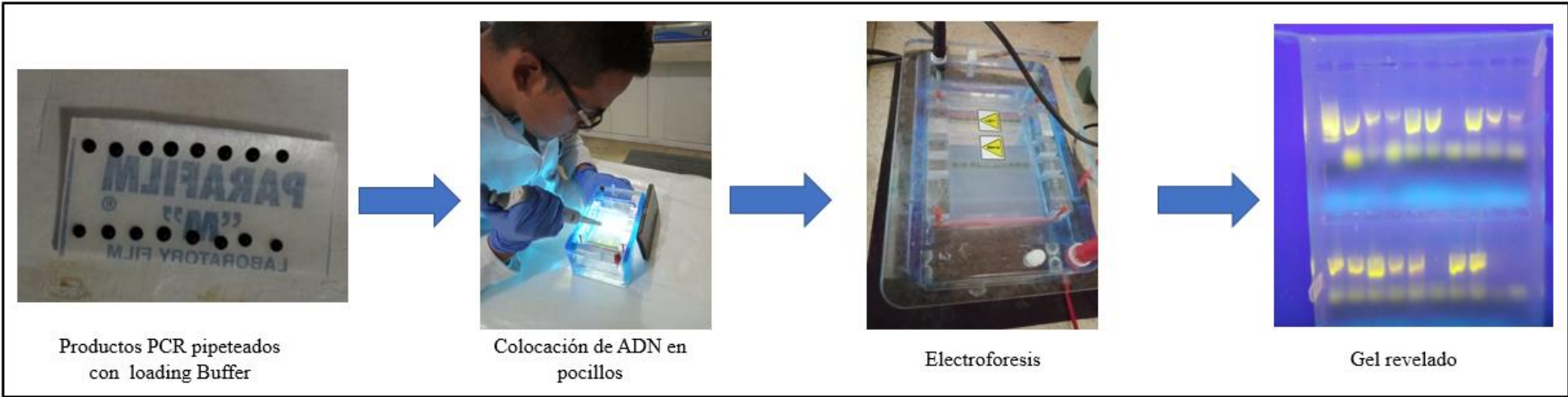
ANEXO E: EXTRACCIÓN DE ADN (LISIS QUÍMICA)



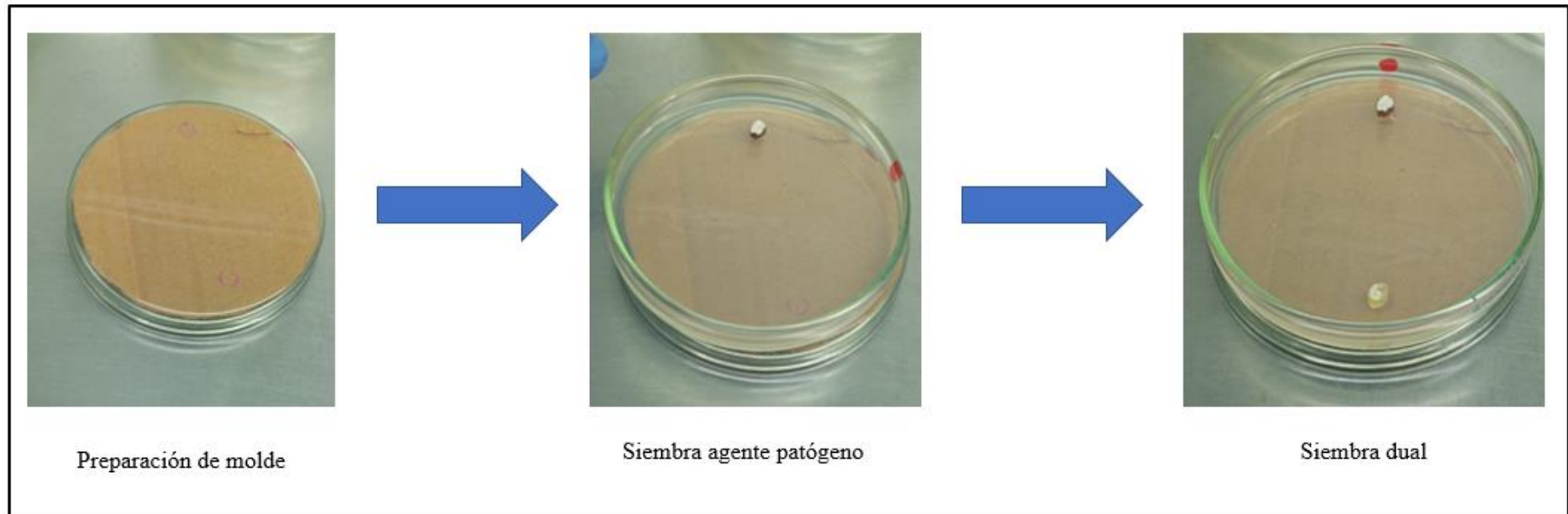
ANEXO F: PCR



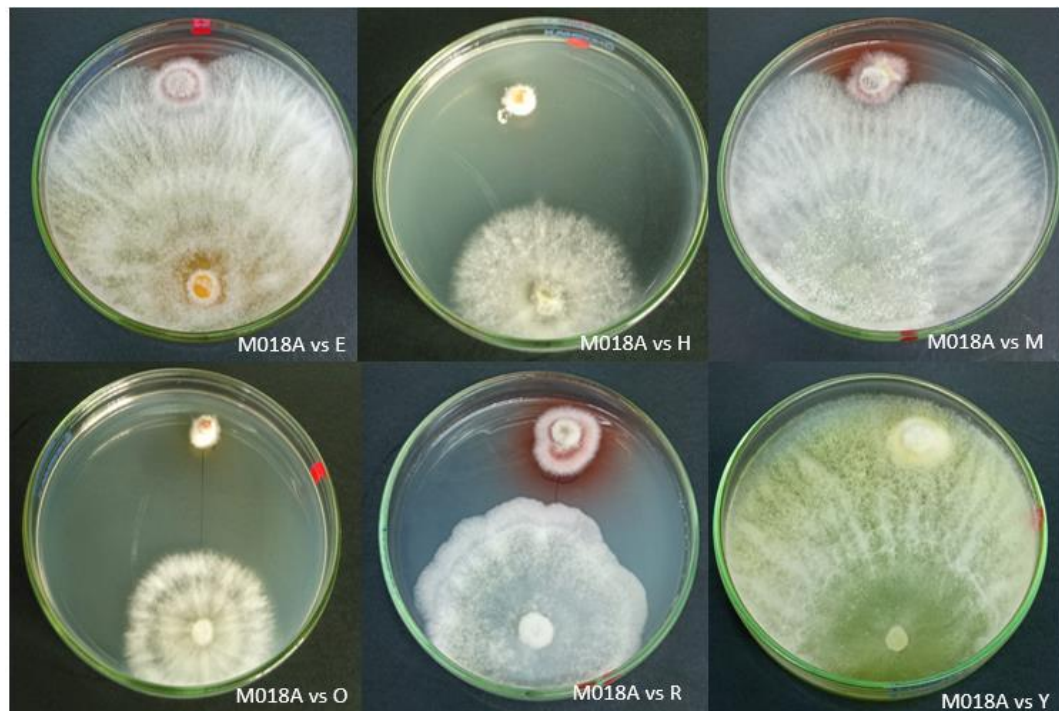
ANEXO G: ELECTROFORESIS



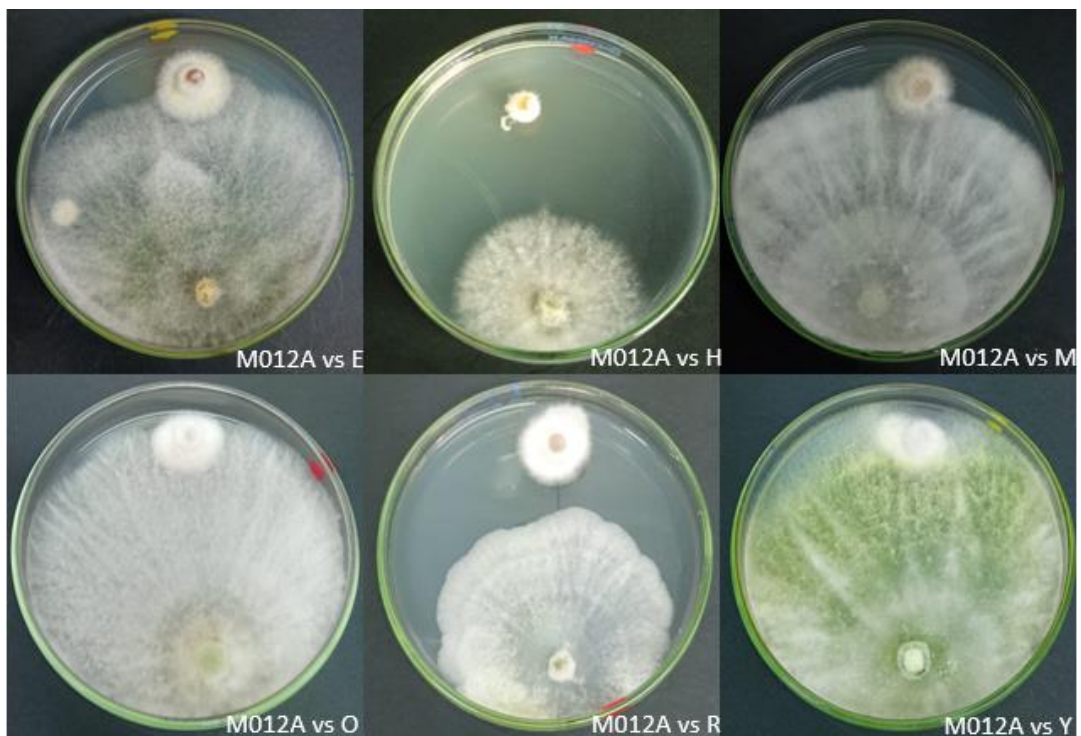
ANEXO H: SIEMBRA DUAL



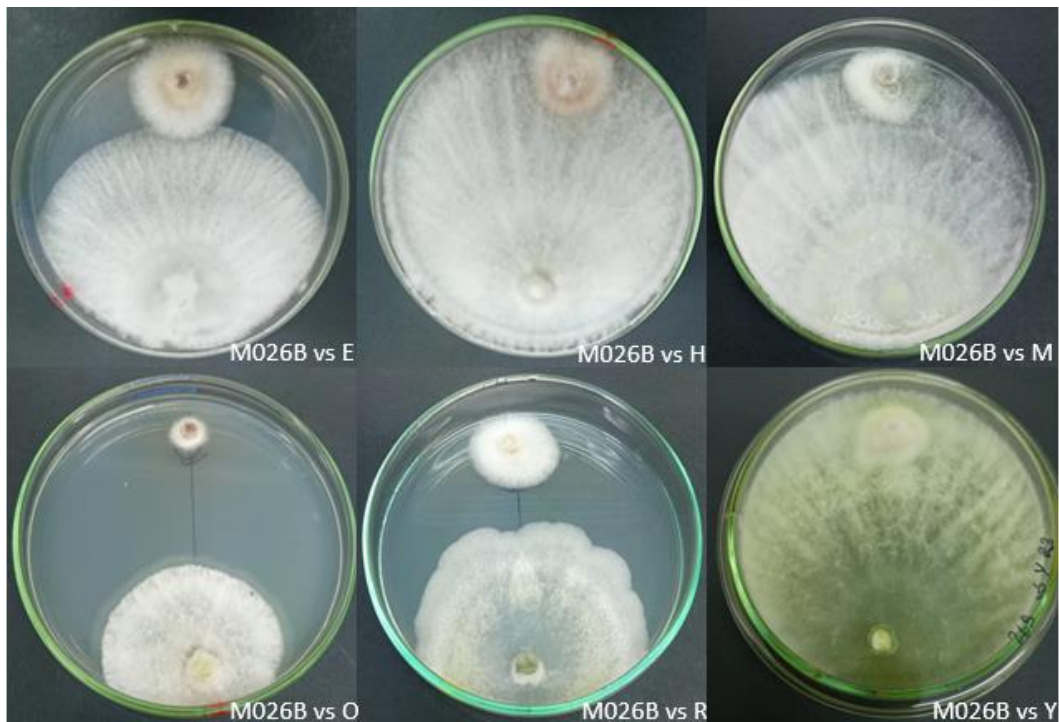
ANEXO I: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Fusarium solani* (M018A)



ANEXO J: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Fusarium solani* (M012A)



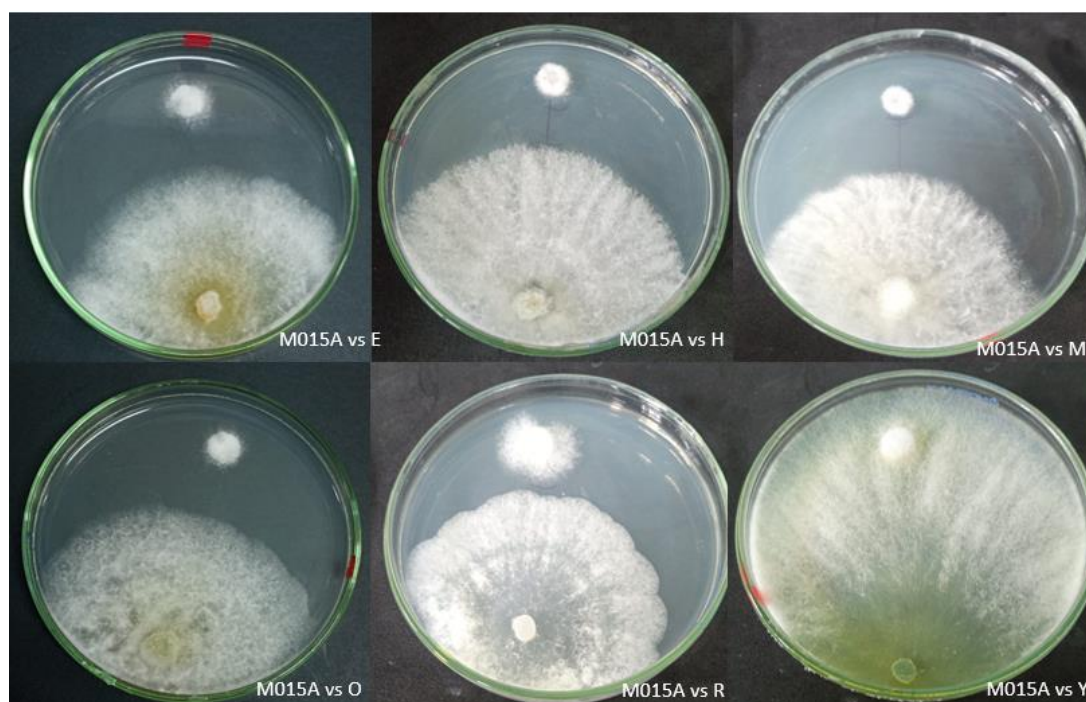
ANEXO K: CONFRONTAMIENTO DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. CON *Fusarium solani* (M026B).



ANEXO L: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Nectria pseudotrichia* (M005B).



ANEXO M: CONFRONTAMIENTO DE *Trichoderma* spp. CON *Nectria pseudotrichia* (M015A).



ANEXO N: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M012A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	0,5994	0,11988	4,532	0,0149*
Error	12	0,3174	0,02645		

ANEXO O: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M018A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	0,1835	0,03669	0,566	0,725
Error	12	0,7785	0,06488		

ANEXO P: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M026B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	1,4673	0,29346	6,95	0,00289**

Error	12	0,5067	0,04222
-------	----	--------	---------

ANEXO Q: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M005B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	1,6159	0,3232	4,073	0,0215*
Error	12	0,9522	0,0794		

ANEXO R: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL M015A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	1,036	0,2072	1,541	0,249
Error	12	1,613	0,1344		

ANEXO S: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M012A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	131,38	26,276	3,97	0,0234*
Error	12	79,42	6,618		

ANEXO T: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M018A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	210,76	42,15	11,7	0,000282***
Error	12	43,25	3,60		

ANEXO U: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M026B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	202,76	40,55	4,983	0,0106*
Error	12	97,65	8,14		

ANEXO V: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M005B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	100,7	20,14	1,913	0,166
Error	12	126,3	10,53		

ANEXO W: ANÁLISIS DE VARIANZA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL *Trichoderma* spp. vs M015A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	223,07	44,61	78,64	9.52e-09***
Error	12	6,81	0,57		

ANEXO X: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M012A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	812,4	162,48	4,394	0,0166*
Error	12	443,8	36,98		

ANEXO Y: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M018A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	196	39,19	0,382	0,852
Error	12	1232	102,63		

ANEXO Z: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M026B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	1536,6	307,33	8,643	0,00113**
Error	12	426,7	35,56		

ANEXO AA: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M005B

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	1350,1	270,03	3,308	0,0416*
Error	12	979,6	81,63		

ANEXO AB: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CONFRONTACIÓN ENTRE *Trichoderma* spp. vs M015A

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de f	Pr(>F)
Hongo_antagonista	5	6346	1269,3	1,456	0,274
Error	12	10460	871,7		




**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO**

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL
APRENDIZAJE**



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 11/ 12/ 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR	
Nombres – Apellidos:	Kevin Andrés Benalcázar Quiñónez
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL	
Facultad:	Recursos Naturales
Carrera:	Ingeniería Forestal
Título a optar:	Ingeniero Forestal
f. Analista de Biblioteca responsable:	 Ing. Fernanda Arévalo M.



2098-DBRA-UPT-2023