

RESUMEN

En la actualidad la agricultura orgánica, se orienta a encontrar diversos métodos para lograr que los alimentos crezcan en armonía con la naturaleza. Por tal motivo la aplicación de nuevas técnicas en cultivos agrícolas ha permitido el desarrollo de alimentos sanos libres de productos tóxicos y sin residuos de sustancias químicas. Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagonicos ante patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Botrytis*, *Fusarium* y *Trichoderma*, que es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos agrícolas. El potencial de hongos de suelo como biocontroladores de fitopatógenos se probó en la presente investigación.

Para la obtención de aislados fungales se utilizó la técnica de diluciones sucesivas. De las 10 muestras de suelo colectadas en el sector de estudio, se recuperaron 25 hongos. De éstos, 12 aislados fueron viables. Posteriormente se realizaron los ensayos de antagonismo obteniendo 6 hongos biocontroladores. Para la identificación de género fue necesaria la utilización de claves taxonómicas, y bibliografía acertada; teniendo en cuenta las características microscópicas de cada especie.

Los aislados fungales encontrados pertenecen a los géneros: *Acremomyium spp*, *Chrysosporium spp*, *Verticillium spp*, *Fusarium spp*, *Phialofora spp*, y *Oidiodendron spp*, siendo los géneros de mayor incidencia *Phialofora spp*, y *Fusarium spp*.

Los hongos biocontroladores son antagonistas de *Botrytis cinerea*. No obstante, no presentan actividad antagonica ante *Alternaria spp*.

Palabras claves: hongos de suelo, antagonismo fungal, screening de hongos de suelo, hongos biocontroladores



ABSTRACT

The present paper deals with original fungi isolated from soil samples gathered at “San Joaquín” parish, Cuenca, Azuay Province. The aim of this research was to assess the potential of these fungi as biocontrol agents, targeted to control phytopathogenic fungi and bacteria common in agricultural crops.

Agricultural activities affect the ecological soil structure, affecting its balance and diminishing its auto regulation capacity. Organic agriculture provides new techniques to allow soil restoration. Besides, healthy crops can provide non toxic food, without chemical pesticide residues.

There is an important group of fungi and bacteria, which display antagonistic effects against plant pathogens. Bacteria of the genre *Pseudomonas* and *Bacillus* and fungi belonging to the genre *Fusarium* *Botrytis* and *Trichoderma*, are well know biocontrol agents. The aim of this research is to test the potential of native soil fungi as biocontrol agents.

The isolation of soil fungi was performed by means of serial dilution technique. From ten soil samples gathered San Joaquín parish, 25 fungi were isolated. From them, 12 were viable. Antagonist activity bioassays were performed, which allowed to identify six biocontrol fungi. Taxonomic keys were used to assign the genre of the fungi, regarding to microscopic characteristics.

The fungi isolated belong to the following genres: *Acremomyium* (*Cephalosporium spp*), *Chrysosporium spp*, *Verticillium spp*, *Fusarium spp*, *Phialofora spp*, and *Oidiodendronspp* with the greatest incidence of *Phialofora spp* and *Fusarium spp*.

The bioactive fungi were antagonist against *Botrytis cinerea*. However, biocontrol activity against *Alternaria spp*. Was not observed.

Key words:soil fungi, fungalantagonism, Screening ofsoil fungi, biocontrolfungi

Adriana Paola Jara Bermeo



ÍNDICE DE CONTENIDOS:

Contenido	Pág.
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Índice de Contenidos.....	3
Índice de Ilustraciones y tablas.....	7
Dedicatoria.....	10
Agradecimientos.....	11
Introducción.....	12
Capítulo 1: Fundamento Bibliográfico	
1.1 Hongos: hábitat y relación entre reinos.....	15
1.2 Suelo.....	19
1.3 Efecto biocontrolador de suelos naturales.....	20
1.4 Fungistasis.....	21
1.5 Enfermedades vegetales producidas por hongos.....	22
1.6 Hongos de suelo antagonistas ante fitopatógenos.....	24
1.7 Aislamiento y selección del agente de control biológico.....	24
1.8 Controles químicos vs. Controles biológicos.....	30
1.9 Control biológico.....	30
1.10 Métodos alternativos al control químico de fitopatógenos.....	32
1.11 Efecto fitopatógeno de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria spp</i>	34
1.11.1 <i>Botrytis cinerea</i>	34
1.11.2 <i>Alternaria spp</i>	34
1.12 Identificación de Hongos Biocontroladores.....	35
1.13 IDENTIFICACION DE GÉNERO.....	36
1.13.1 <i>Fusarium spp</i>	36



1.13.2 *Verticillium spp.*.....37
1.13.3 *Phialophora spp.*.....37
1.13.4 *Acremonium spp.*.....38
1.13.5 *Chrysosporium spp.*.....38
1.13.6 *Oidiodendron spp.*.....39

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1 Ubicación de los ensayos.....40
2.2 Aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo.....40
 2.2.1 Metodología.....40
 2.2.1.1 Fase de Campo.....40
 2.2.1.2 Mapa de Ubicación de Recolección
 de las muestras Sector San Joaquín.....42
2.3 Fase de Laboratorio.....43
2.4 Aislamiento de las cepas patológicas del género *Botrytis*
 cinerea, proveniente de frutilla (*Fragaria vesca*).....44
2.5 Aislamiento de las cepas patológicas del género
 Alternaria spp., proveniente de hojas de Col Repollo
 (*Brassicaoleracea, alba*).....44
2.6 Bioensayos para evaluar la actividad antagonista
 de hongos de suelo ante fitopatógenos.....45
2.7 Producción de hongos biocontroladores a escala
 Preparativa.....45
2.8 TÉCNICA 1: Preparación de biomasa en
 diferentes sustratos mediante el medio de cultivo czapeck-dox.....46
 2.8.1 Procedimiento.....46
2.9 TÉCNICA 2: Preparación de biomasa en diferentes
 sustratos mediante el medio de cultivo czapeck-dox..... 47



2.9.1 Procedimiento.....	47
2.10 Identificación de biocontroladores a nivel de género.....	48
2.10.1 Técnica del microcultivo.....	48
2.10.2 Materiales.....	48
2.10.3 Procedimiento.....	49
2.10.4 Técnica de cinta pegante.....	50
2.10.5 Técnicas de Tinción.....	51
2.10.5.1 Tinción de Wright.....	51
2.10.5.1.1 Procedimiento.....	51
2.10.5.2 Azul de Lactofenol.....	52
2.10.5.2.1 Composición de Azul de Lactofenol.....	53
2.11 Recuento de esporas.....	54
2.11.1 Materiales.....	54
2.11.2 Hongos utilizados para el Recuento de esporas.....	55
2.11.2.1 Procedimiento.....	55

Capítulo 3: Resultados y Discusión.

3.1 Resultados.....	56
3.1.1 Aislamiento de hongos a partir d56 muestras de suelo.....	42
3.1.2 Aislamiento de las cepas patológicas del género Botrytis cinerea, proveniente de frutilla (<i>Fragaria vesca</i>).....	60
3.1.2.1Características de Crecimiento <i>Botrytis cinerea</i>	60
3.1.2.2Características de Crecimiento <i>Alternaria</i> <i>spp.</i>	60



3.1.3 Bioensayos para evaluar la actividad antagonista de hongos de suelo ante fitopatógenos.....	62
3.1.4 Producción de hongos biocontroladores a escala preparativa	64
3.1.5 Identificación de Biocontroladores a nivel de género.....	67
3.1.6 Resultado del Conteo de Esporas.....	69
3.2 Discusión.....	71
3.2.1 Aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo.....	71
3.2.2 Bioensayos para evaluar la actividad antagonista de hongos de suelo ante fitopatógenos.....	72
3.2.3 Producción de hongos biocontroladores a escala preparativa.....	73
3.2.4 Identificación de biocontroladores a Nivel de género.....	74

Capítulo 4: Conclusiones y Recomendaciones.

4.1 Conclusiones.....	75
4.2 Recomendaciones.....	76
Bibliografía.....	77
Anexos.....	85



INDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

Tabla No. 1 Número Total de aislados fungales relacionado con el sitio de muestreo San Joaquín.....	56
Tabla No. 2 Diluciones de cada una de las muestras con su respectivo número de frecuencia.	61
Tabla No. 3 Evaluación de potencial biocontrolador por dimensión de zona de inhibición en bioensayo de antagonismo fungal	62
Tabla No. 4 Producción de hongos biocontroladores en diferentes sustratos.....	64
Tabla No. 5 Características de crecimiento de los biocontroladores a escala preparativa.....	64
Tabla No. 6 Identificación de los Hongos Biocontroladores, con la respectivo código y nombres. (Autora).....	66
Tabla No. 7 Resultado del recuento de esporas.....	70
Grafico1 Porcentajes de Diluciones en las muestras de la investigación.....	56
Grafico 2. Comparación de la frecuencia de obtención de los aislados fungales de cada dilución.....	58
Grafico 3. Relación diluciones vs Hongos bioactivos.....	59
Gráfico 4. Crecimiento en los diferentes Sustratos.....	65
Gráfico 5 Porcentaje de la actividad antagonista de los aislados fungales.....	69



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

***“SCREENING DE HONGOS DE SUELO ANTE MICROORGANISMOS
FITOPATÓGENOS”***

***Trabajo Final para Obtención del
Título de Bioquímica Farmacéutica***

Autora:

Adriana Paola Jara Bermeo

Director :

Dr. Virgilio Espinoza Vásquez

Cuenca - Ecuador

2011

Adriana Paola Jara Bermeo



ALMA FUERTE

No te des por vencido, ni aún vencido,
no te sientas esclavo, ni aún esclavo;
trémulo de pavor, piénsate bravo,
y acomete feroz, ya mal herido.
Ten el tesón del clavo enmohecido
que ya viejo y ruin, vuelve a ser clavo;
no la cobarde estupidez del pavo
que amaina su plumaje al primer ruido.
Procede como Dios que nunca llora;
o como Lucifer, que nunca reza;
o como el robledal, cuya grandeza
necesita del agua, y no la implora...
Que muerda y vocifere vengadora,
ya rodando en el polvo, tu cabeza !

Enseñarás a volar,
pero no volarán tu vuelo.
Enseñarás a soñar
pero no soñaran tu sueño.
Enseñarás a vivir
pero no vivirán tu vida.
Sin embargo, en cada vida, en cada
sueño,
perdurará la huella de
camino enseñado.



DEDICATORIA

Para ti Gran Dios Todopoderoso y a mi Madre María espero contribuir con un granito de arena en este universo, también dedico el esfuerzo de mi tesis a mi toda mi familia, no los defraudaré.

Geova al fin entendí por qué suceden las cosas y con ello la felicidad de seguir caminando juntos.



AGRADECIMIENTO

A Dios creador del universo y dueño de mi vida que me permite construir otros mundos mentales posibles, a mi Madre María por cuidarme y aconsejarme siempre que lo he necesitado.

A mis padres, Ruth y Patricio por el apoyo incondicional y cariñoso que han dado a lo largo de la mi vida, sin importar lo inquieta y juguetona que he sido.

A mis ñañas Tititas Pichu y Elika, por el ánimo brindado en cada día universitario. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

Al amoremio Geovanny Piña por enseñarme a ver el más allá de lo evidente, que no hay límites, que todo lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mí; por esas mañanas, tardes noches, y madrugadas de aliento detrás de cada llamada.

A todos los directivos de la Universidad Estatal, por su apoyo y colaboración para la realización de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Químicas en la persona de Dra. Silvana Donoso Decana e Ing. Ruth Cecilia Álvarez Subdecana por la mano que me dieron cuando todo fue oscuro, y por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo.

Al Doctor Virgilio Espinoza por su dirección en el trabajo de investigación.

Dra. Susana Calvo por su asesoría en todo momento, por demostrarme con su ejemplo el verdadero significado del orden y puntualidad.

Al Doctor Eduardo Sánchez que por medio de su manera de vivir y leer en la vida ahora sé que soy un piti mejor cada día.

A la Dra. María Elena Cazar Ph. D por sus valiosas enseñanzas en la investigación científica, y demostrarme que si podemos ser mejores profesionales, y personas todos los días.

A los protagonistas de este proyecto, Dr. Juan Parra, Dr. Geovanny Larriva ,Ing Paulina Vilena por su participación activa en el proyecto ya que me permitieron crecer y sentir un poco más la vida de ayudante de investigación.

A Mayu, Vero Urgilés, Byron Moreno, Sra Ruth, Diana DinoRomero , muy buenos amigos y que me apoyaron en este proceso.

A mis amigos, que por medio de las discusiones y preguntas, me hacen crecer en conocimiento.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Gracias de todo corazón



INTRODUCCIÓN

Los hongos conforman una agrupación cosmopolita de eucariontes heterótrofos, usualmente microscópicos, cuyo cuerpo vegetativo consiste en filamentos ramificados los cuales tienen paredes celulares definidas constituidas por celulosa y quitina (Agrios, 1988). En la biosfera, los hongos ocupan una amplia variedad de hábitats que incluyen al suelo, aguas dulces y saladas. La carencia de pigmentos fotosintéticos convierte a un grupo mayoritario en saprófitos, obteniendo sus nutrientes de organismos huéspedes (Beckett, et al, 1979). En su relación con las plantas, los hongos se incluyen en el grupo de fitopatógenos sistemáticos variados además de los virus, invertebrados y bacterias. En un sentido muy amplio las enfermedades microbianas de las plantas causan disfunciones que disminuyen su capacidad de mantenerse en su nicho ecológico (Atlas y Bartha, 2002). Los hongos están bien adaptados para actuar como patógenos. La gran variedad de esporas y la producción de estructuras de resistencia los permite permanecer viables fuera de la planta hospedera. Sin embargo, menos del 2% de las aproximadamente cien mil especies fungales conocidas son capaces de colonizar las plantas y causarles enfermedades (Buchanan et al, 2000; Schuman, 1991).

La agricultura en los países en vías de desarrollo está enfrentando cambios basados en exigencias del mercado, preferencias de los consumidores y consideraciones éticas. Durante décadas los pesticidas de síntesis química fueron ampliamente utilizados para asegurar buenos rendimientos en cultivos de importancia económica. Sin embargo, muchos pesticidas químicos han sido eliminados sea por riesgos potenciales en la salud humana, efectos en organismos no-objetivo y desarrollo de resistencia por patógenos. La demanda pública para reducir el uso de pesticidas limita la aplicación de químicos en cultivos y productos agrícolas (Butt, 2000; Tripathi, 2004).

La necesidad de agroquímicos selectivos y biodegradables ha derivado la atención científica al estudio de productos naturales de origen vegetal y animal como posibles biopestidas. La aplicación de extractos y compuestos de plantas en el



manejo de post-cosecha de frutas es una práctica creciente que elimina los efectos adversos de químicos en productos agrícolas (Tripathi, 2004).

El efecto antagonista de ciertos hongos de suelo contra patógenos vegetales demuestra que este nicho ecológico es una importante fuente de cepas biocontroladoras. En efecto, hongos del género *Trichoderma* son comercializados como biopesticidas específicos contra *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Fusarium*, incrementando el crecimiento de raíces y la captación de nitrógeno hasta en un 25% (Ligon, 2000). La búsqueda de cepas nativas procedentes de ecosistemas no antropizados puede generar nuevos biocontroladores como alternativa al uso de pesticidas químicos.

La presente propuesta se basa en la necesidad de utilizar métodos de control biológico en la lucha contra fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica en nuestro país. La evaluación de hongos nativos provenientes del suelo como biocontroladores busca evitar la introducción de cepas aisladas de otros ambientes, que podrían alterar el equilibrio de poblaciones microbianas del suelo.



OBJETIVO GENERAL:

Determinar el screening de hongos de suelo ante microorganismos fitopatógenos, a partir de muestras de suelo recolectadas en I parroquia agrícola San Joaquín del Cantón Cuenca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Aislar hongos provenientes de muestras de suelo, con el fin de probar su actividad biocontroladora ante microorganismos fitopatógenos.
- Evaluar el efecto antagonista de los hongos aislados, mediante ensayos “in vitro”.
- Determinar la producción de biomasa fungal.
- Realizar la identificación de hongos a nivel de género.
- Establecer un protocolo de aislamiento, identificación y producción de hongos biocontroladores.



Capítulo 1

1. Fundamento Bibliográfico

1.1 Hongos: hábitat y relación entre reinos.

Los hongos son importantes no sólo por sus aspectos benéficos, sino por los prejuicios que causan a la silvicultura, la agricultura y también a la salud humana o animal (Turrialba, 1991). En la biósfera, la mayor concentración de hongos se encuentra en los primeros 20 cm de suelo. Un gramo de suelo seco puede contener hasta un millón de esporas.

Los hongos del suelo se ven afectados por el ambiente que los rodea, produciendo en ellos microambientes que puede ser benéfico o perjudicial para su crecimiento. Entre los factores ambientales que más influyen sobre ellos son la humedad, la temperatura y las condiciones químicas y físicas del suelo.

En la evolución terrestre los hongos han marcado un gran avance importante para desarrollar relaciones simbióticas junto con las raíces, incluyendo desde las más simples hasta las más complicadas: las algas para formar a los líquenes y las micorrizas, en esta asociación existe algunas sustancias nutritivas, a su vez protege del ataque de los patógenos externos.

Otra de las asociaciones que constituyen es el hábitat saprofítico, que a su vez se ha dividido en dos grupos: los que habitan en el suelo: estos crecen desenvueltamente en el suelo y se desarrollan alimentándose de la materia orgánica y los habitantes de la rizosfera: tiene un crecimiento reducido, crecen en las hojas que cubren el suelo (Turrialba, 1991).



Características fundamentales de los hongos

- Son heterótrofos, es decir se alimentan de materia orgánica preformada su fuente de energía es el carbono.
- Son eucariotas, tiene un núcleo y membrana diferenciadas.

Hifas

Los hongos están formados por filamentos que se denominan hifas (o talo) que pueden ser tabicadas o no, el conjunto y las ramificaciones de hifas forman el micelio. Se distinguen dos tipos de micelio:

Micelio Vegetativo; encargado del desarrollo y nutrición del hongo.

Micelio de fructificación; o reproductor del que nacen las esporas asexuadas y sexuadas.

Micelio Vegetativo: se multiplica por elementos de propagación, por formaciones originadas del propio micelio, que son:

Blastoconidios: son células esféricas u ovales (levaduras) emiten en uno o varios puntos de la célula brotes que van desarrollándose hasta separarse de la célula madre por un proceso de brotación o yemación.

Arthroconidios: formas cilíndricas forman arthroconidias por la desarticulación de la hifa o por escisión. El micelio vegetativo forma en condiciones adversas, estructuras de resistencia destacando los clamidocondios y los esclerotes.

Clamidocondios: partes de micelio vegetativo por agotamiento del medio, calor, desecación, engrosan su membrana, que le permiten resistir las causas anteriores e incluso antisépticos, y se puede observar en cultivos viejos o pobres. Pueden ser terminales e intercalares y observarse además en parte de los conidios.



Esclerotes: se forma en condiciones adversas de la vida, por entrecruzamiento de hifas, aparece como un cuerpo globoso, generalmente visible a simple vista, pétreo, pigmentado.

Micelio de fructificación: a partir de este forman hifas que dan origen a elementos como pueden ser: asexuadas o sexuados en ambos casos internos o externos.

Las esporas asexuadas externas se denominan conidios y se presentan en una gran variedad de formas, agrupaciones y origen (*Aspergillus*, *Penicillium*). Algunos son los productores de tiñas; por su tamaño se denominan *macroconidias* y *microconidias*.

Las esporas asexuadas internas se originan dentro de una estructura globosa, transparente llamada esporangio que se encuentra en el extremo de una hifa llamada esporóforo. En su interior hay un sinnúmero de esporas (antiguamente llamados esporangioesporas).

Las esporas asexuadas se producen en número indeterminado a diferencia de los asexuados que lo hacen en número par, de 2 o 4, generalmente 8 y excepcionalmente en número mayores. Las esporas asexuadas externos que nacen del extremo de una célula fértil claviforme llamada baside y en número de 4 son los basidiosporos.

Los esporos asexuados o ascosporas se forman dentro de sacos llamados ascos que pueden ser simples como en el caso de las levaduras o en ascocarpos como son: apotecio, peritecio, cleistotecio y ascostroma.

El micelio se desarrolla formando colonias fúngicas de aspecto diferente a las colonias bacterianas.

Las colonias de hongos levaduriformes son típicas de los hongos unicelulares (levaduras). Esta es de tipo bacteriano, de aspecto butiroso, húmeda, brillante u opaca y la mayor parte de las veces con olor a levadura de pan, generalmente blanca.

Las colonias de hongos filamentosos se caracterizan por producir un micelio aéreo afelpado, algodónoso o aterciopelado, pigmentado o no (Brevis y Padilla, 1988).

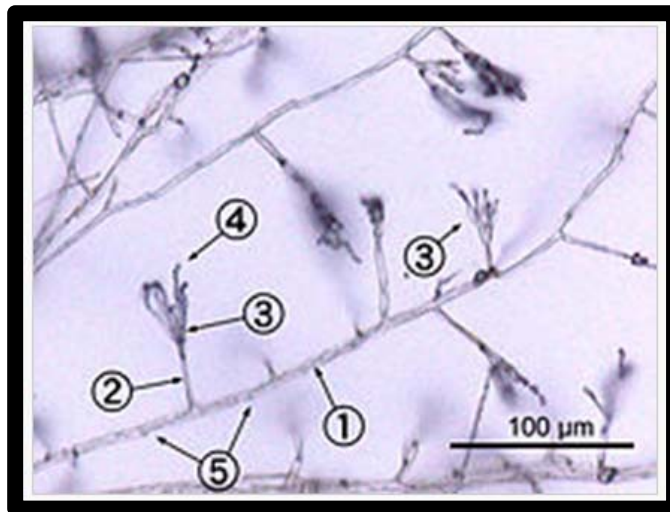


Figura No. 1. Partes de un hongo: (1) Hifa, (2) Conidióforo, (3) Fiálide, (4) Conidia, y (5) Septos. Tomado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Fungi> (Zabriskie TM, Jackson MD, 2000)

En la observación in vitro encontramos el micelio, que puede ser incoloro o no igualmente las esporas coloreadas. Los hongos tienen una fase parasitaria levaduriforme y una saprofiticamicelial, y que en respuesta a cambios ambientales pasan de esta fase a 20 a 25°C a la fase de levadura 37°C o viceversa, se llaman dimórficos (Arenas, 2005).

Algunos hongos originan levaduras y filamentos que pueden existir juntas y no necesariamente por la temperatura, y se llaman polimórficos.

Se clasifican en dos divisiones

VER ANEXO A.

Adriana Paola Jara Bermeo



1.2 Suelo.

La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres, influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales (van der Heijden et al, 2008).

La materia orgánica es descompuesta por la actividad de diferentes especies de bacterias y hongos que liberan los nutrientes al suelo, dejándolos disponibles para que sean nuevamente absorbidos por las plantas. Los microorganismos interactúan mutuamente también con las plantas de manera beneficiosa. La solubilización de nutrientes, fijación del nitrógeno, sustancias generadoras del crecimiento vegetal son interesantes ejemplos, la misma puede ser neutra o perjudicial, en el último caso los hongos producen enfermedades y en algunas ocasiones la muerte del vegetal.

La absorción puede ser directa a través de las raíces o indirecta a través de los microorganismos que forman simbiosis con las raíces (hongos formadores de micorrizas). Estos organismos cohabitan con microorganismos patógenos que atacan a las plantas reduciendo su productividad (Rodríguez y Echeverría, 2009).

Las plantas generan nutrientes que sirven para el crecimiento de microorganismos en las superficies vegetales, estos son generados dentro de la planta, en forma de exudados y son excretados a la superficie. Estos contienen una gran variedad de materiales orgánicos que incluyen azúcares simples, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y hormonas de crecimiento de la planta, que pueden ser empleados más o menos eficientemente como sustratos por los distintos microorganismos (Mondino, 2003).

Actualmente, el uso excesivo de agentes químicos utilizados en la Industria Agrícola ha incrementado la resistencia de ciertos microorganismos hacia estos agroquímicos.



El control biológico mediante organismos antagónicos representa una valiosa herramienta, no química, para la protección contra hongos fitopatógenos (Guijón y Gonzales, 2004).

En la bibliografía consultada se han presentado numerosos ejemplos de hongos y bacterias con efectos antagonistas sobre otros microorganismos patógenos a diferentes especies de vegetales, dicha cualidad puede ser aprovechada en forma de control biológico de aquellos patógenos vegetales.

Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*; este último es el más utilizado para el control de algunos patógenos (Fernández, 2001).

La acción en la que se basa es su actividad antifúngica, proveniente de hongos de suelo ha provocado una mayor búsqueda para detectar estos microorganismos como agentes biológicos de control para algunos patógenos vegetales.

1.3 Efecto biocontrolador de suelos naturales.

Los organismos que inhiben el crecimiento de otros pueden ser usados para controlar plagas y patógenos, este método se denomina *control biológico*. El crecimiento de hongos fitopatógenos puede ser controlado mediante organismos que atacan o compiten como: nematodos, bacterias u otros hongos (Carlile, et al, 2001).

En la actualidad, hay más de 80 productos para el control biológico de patógenos en todo el mundo, y esta cifra tiende a incrementarse. La mayoría de estos productos son formulaciones tanto de los hongos *Gliocladium*, *Trichoderma* o la bacteria *Pseudomona* y *Bacillus*. Sin embargo, no todos estos productos están registrados como agentes de control biológico, pero se comercializan como



promotores del crecimiento vegetal, fortalecedores de plantas, o acondicionadores del suelo.

Productos para controlar los patógenos del suelo han sido formulados a partir de: *Sclerotinia*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* son *Coniothyrium minitans*, especies de *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Bacillus*, y *Fusarium*. Ciertos productos que contienen, *Trichoderma*, *Ampelomyces quisqualis*, *Bacillus* y *Ulocladium* se están desarrollando para el control de las enfermedades foliares primarias, *Botrytis* y *oidio* (Timothy, Paulitz, Belanger. R.R, 2001).

Algunas condiciones que favorecen la enfermedad, también favorecen la gestión de las enfermedades con agentes de control biológico. Las condiciones ambientales tales como temperatura y la humedad relativa pueden ser controladas. Al igual que el agente patógeno, los agentes biocontroladores también son sensibles a las condiciones ambientales. El vacío biológico en los sustratos del suelo también puede favorecer el establecimiento de agentes de control biológico, siempre y cuando se aplican antes de la introducción de los patógenos.

La logística y la economía de la aplicación de agentes de control biológico son más favorables que las aplicaciones de campo. Se los puede aplicar directamente a una red cada vez mayor, en el sistema de irrigación, se rocía en las plantas, o se aplica a las semillas híbridas de alto valor (Timothy. Paulitz, Belanger. R.R 2001).

1.4 Fungistasis.

Se define como fungistasis la medida de inhibición de la germinación de crecimiento, atribuyéndose a varios factores tales como: la falta de carbono (importante para el desarrollo), o una producción de compuestos antifúngicos, que algunos casos es mínima, su intensidad depende de propiedades físicas y químicas.



Se conoce que existe casi todo los suelos, con la excepción de los suelos que son: profundos como por ejemplo los suelos que corresponden a arenas de playas y suelos forestales, esto se debe por la escasa presencia de poblaciones microbianas; también se presenta en las hojas de las plantas.

La presencia de fungistasis necesita de microorganismos vivos, la esterilización del suelo anula completamente este fenómeno, pero en algunos casos puede persistir aun en suelos esterilizados; se puede restaurar mediante la inoculación de microorganismos.

1.5 Enfermedades vegetales producidas por hongos.

Los organismos vivos causantes de las enfermedades de las plantas se llaman patógenos, estos son microscópicos y muy difíciles de ver a simple vista. Obtienen sus nutrientes y todo lo que necesitan para su supervivencia y reproducción, lo que producen una relación parasita.

Las enfermedades que ocasionan los hongos en ciertas plantas pueden ser de tipo local o general, pero también pueden aparecer por separado en hospedantes distintos. Regularmente los hongos producen necrosis local o también general, que finaliza con la muerte de los tejidos vegetales.

En otros casos pueden producir toxinas que matan a las células, desarrollándose dentro de la planta y obstruyen el sistema vascular, produciendo alteraciones y evitando la absorción de los nutrientes (Pscheldt, 2003).

El desarrollo de una enfermedad se puede observar las siguientes etapas:

Contaminación. En esta etapa se da la llegada del patógeno (esporas del hongo) al hospedador.



Penetración del patógeno: Se puede realizar bien a través de tejido sano para lo cual el patógeno ha desarrollado mecanismos para atravesar de forma activa las barreras estructurales de la planta (cutícula y pared celular epidérmica), posee estructuras o enzimas digestivas que ayuden a degradar los tejidos de la planta (combinación de enzimas hidrolíticas, incluyendo cutinasas, pectinasas, poligalacturonasas y proteasas), o ingresa a través de heridas o las aperturas naturales de la superficie de la planta (Agrobiotecnología, 2010).

Infección: Es la etapa cuando el patógeno se contacta con las células del hospedero.

Incubación: Es el tiempo que transcurre entre la infección y la aparición de los síntomas, esta etapa depende de su duración como el tipo de patógeno y los órganos que ataque.

Difusión o invasión: En esta etapa el patógeno se desarrolla a más de los primeros tejidos, pero algunos diferentes patógenos se limitan áreas específicas de la planta, sin embargo pueden colonizar diferentes tejidos sin importar la clase de planta.

Reproducción del patógeno: Algunos de los patógenos producen sus estructuras en el interior del hospedero.

Diseminación o dispersión del patógeno: Las estructuras reproductoras de los patógenos pueden alcanzar la superficie del hospedero y son distribuidos en el medio. VER ANEXO H.



1.6 Hongos de suelo antagonistas ante fitopatógenos.

La mayor parte de organismos patógenos tienen antagonistas biológicos que pueden ser utilizados como agentes biocontroladores naturales, reduciendo la población afectada por los patógenos.

Resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos. Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos y son: competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor sea la probabilidad de que un aislamiento se manifieste por varios modos de acción; más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, aspectos que no poseen los plaguicidas químicos.

1.7 Aislamiento y selección del agente de control biológico.

Los microorganismos (hongos o bacterias) empleados en el biocontrol de fitopatógenos, son generalmente aislados a partir del suelo o de la planta.

Pero no siempre presentan características óptimas para ser usados en biocontrol. La estrategia para este proceso, es la recolección de muestras de plantas sanas (raíces, tallo u hojas), procedentes de campos infectados con el fitopatógeno que se desea controlar.

Cuando se han aislado los microorganismos provenientes de las muestras de suelo, se utilizan medios de cultivo selectivos (sustratos nutritivos artificiales) que permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos presentes en la muestra obtenida.

Se debe evaluar la eficacia de los biocontroladores como antagonistas del patógeno mediante bioensayos in vitro. Estas pruebas consisten en confrontar al patógeno con el posible antagonista con el fin de evaluar su potencial para inhibir el crecimiento o inclusive causar la muerte del patógeno.



Posteriormente, aquellos aislamientos con capacidad antagonista evidente deben ser evaluados nuevamente a nivel de laboratorio, invernadero y campo, considerando varios criterios para conocer su potencial tecnológico, entre los criterios más importantes que se deben considerar se citan principalmente:

- a)** velocidad de crecimiento y de acción biológica sobre el patógeno, con producción de esporas, que son estructuras muy resistentes responsables en muchos casos de la diseminación de los agentes de control biológico;
- b)** producción de enzimas capaces de perforar y destruir al patógeno;
- c)** capacidad de asociación o colonización de las raíces de la planta (en el caso de antagonistas de patógenos que afecten a las raíces);
- d)** resistencia a antimicrobianos químicos frecuentemente empleados en agricultura; y
- e)** resistencia a luz ultravioleta (en caso de antagonistas de patógenos de las hojas o los frutos).

De esta manera, la selección a nivel laboratorio representa un paso importante en la obtención de aislamientos con alto potencial antagonista y que, al ser evaluados bajo los diferentes criterios descritos, pueden considerarse postulantes importantes para ser producidos en una escala mayor y de establecerse en el ecosistema previsto. Asimismo, la evaluación en campo del agente de control biológico es indispensable, ya que permite conocer su verdadera capacidad de acción. Es importante desarrollar tecnologías de producción de agentes para el control biológico de los organismos que ocasionan plagas en los vegetales (organismos fitopatógenos), (Serrano, et al, 2003).



Aunque en algunos casos (como los mecanismos de antagonismo de especies del género *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos), se cuenta con un conocimiento amplio del modo de acción, pero no resulta así para la mayoría de los agentes de control biológico, esto sucede porque un mecanismo antagonista es responsable del control o supresión del patógeno.

Dentro de las etapas del desarrollo de tecnología para la producción de un agente de control biológico, y desde el punto de vista técnico, el mayor cuello de botella es la producción y formulación del agente de control biológico para la obtención de un producto con una vida de resistencia suficientemente amplia. Es importante considerar que la tecnología de producción y formulación debe ofrecer un producto que reúna las cualidades necesarias para potenciar los mecanismos de antagonismo del agente de control biológico en su aplicación en el campo.

De manera general, la tecnología de producción y formulación de un agente de control biológico debe reunir las siguientes características, (Janisiewicz, W. y L. Korsten, 2002):

- Proceso de producción masiva del agente de control biológico (microorganismo o antibiótico) con una calidad constante entre lotes de producción.
- Obtención de un formulado con vida prolongada, preferentemente a temperatura ambiente, que ofrezca ventajas competitivas (nutrientes, protección contra luz ultravioleta) al agente de control biológico en el ecosistema donde será aplicado y que sea compatible con la tecnología de aplicación disponible en el campo.
- Obtención de una formulación de alta concentración del agente de control biológico, ya que mientras más diluido se encuentre el agente de control biológico en la formulación, mayor será el volumen o cantidad a aplicar, lo que dificulta su comercialización y almacenamiento.



Existen dos métodos de producción de agentes de control biológico: cultivo en medio sólido y cultivo en medio líquido.

La producción de agentes de control biológico en *medio sólido* es frecuentemente la primera opción cuando se trata de producir hongos, ya que es su hábitat natural. Además, a nivel laboratorio, la producción de esporas del hongo en medio sólido se alcanza de manera relativamente sencilla y presenta la ventaja de que las esporas así producidas tienden a ser más tolerantes a los procesos de secado que las esporas producidas en medio líquido.

En general, el cultivo en *medio líquido* es el método más económico y confiable para la producción masiva de agentes de control biológico antagonistas de fitopatógenos (hongos, levaduras y bacterias), porque en él es posible cultivar todo tipo de agentes de control biológico.

El desarrollo del proceso de producción del agente de control biológico se inicia, a nivel laboratorio, con la optimización de un medio de cultivo y el estudio de variables de proceso como agitación, temperatura, acidez y oxígeno disuelto. Es importante en esta etapa que se optimicen el cultivo. Se pretende minimizar el tiempo de fermentación y maximizar la concentración de biomasa viable producida, y para el caso de formulaciones sólidas, maximizar la resistencia de la biomasa a la desecación.

Una limitante para el desarrollo de estas formulaciones es que la mayor parte de la información generada en esta área no está disponible en la literatura científica, pues forma parte del acervo tecnológico privado de las empresas productoras.

Existen dos clases generales de formulaciones de agentes de control biológico: líquidas, o bien en forma de polvos humectables. En ambas es necesario reducir la actividad metabólica del microorganismo para prolongar la estabilidad y la vida de anaquel del producto. En las formulaciones líquidas, la estrategia general es disminuir la actividad de agua, mediante el uso de electrolitos (sales minerales,



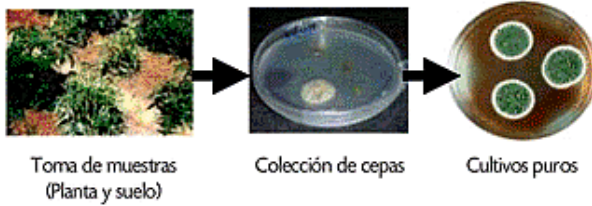
Universidad de Cuenca

azúcares, polioles, etc) o aceites para generar suspensiones altamente concentradas del agente de control biológico.

Para elaborar formulaciones en forma de polvos humectables, se lleva a cabo una deshidratación (disminuyendo así la actividad de agua) del agente de control biológico, pero el proceso de formulación es uno de los puntos más críticos, desde el punto de vista técnico, en el desarrollo tecnológico de un producto de control biológico.

Es necesario evaluar el comportamiento de la población del agente de control biológico y del patógeno en el ecosistema, así como la gravedad del daño económico provocado por éste (Borges, 1997).

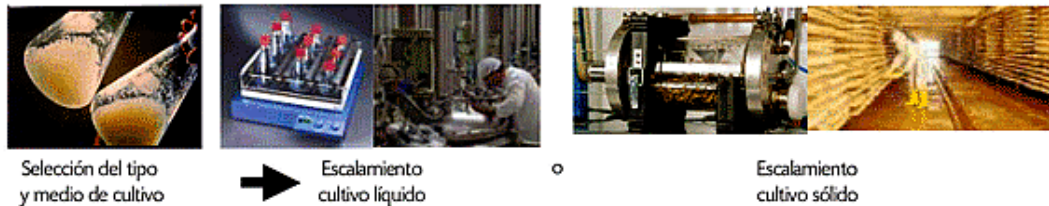
A) Obtención y aislamiento de antagonistas



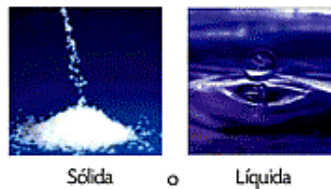
B) Selección de antagonistas



C) Tecnología de producción y escalamiento del proceso



D) Formulación



E) Tecnología de aplicación y registro

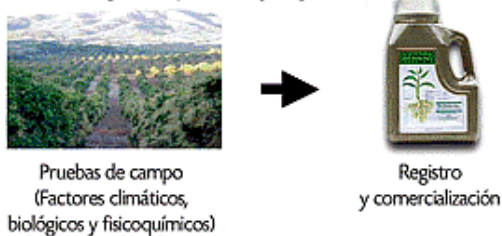


Figura No. 2. Proceso de obtención de antagonistas,

Tomado de: http://revistaciencia.amc.edu.mx/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=81



1.8 Controles químicos vs. Controles biológicos.

Se debe pensar en un control de enfermedades no solo desde el punto de vista curativo, sino también preventivo.

El control biológico generalmente tiene efectos más específicos que el químico, y solo el microorganismo patógeno o la plaga clave se ve negativamente afectada, respetando a otros microorganismos beneficiosos y fauna útil (artrópodos que actúan como enemigos naturales de las plagas).

Características de los agentes biocontroladores las más específicas:

- Estabilidad genética
- Efectividad a baja concentración
- No exigente en requerimientos nutricionales
- Capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del ambiente
- Efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de hortalizas
- Capacidad de reproducción en medios de crecimiento económico
- Mantenerse en una formulación durante un largo período de vida.
- No produzca metabolitos secundarios que causen daños a salud humana (Niurka y Hernández, 2007).

1.9 Control biológico.

El control biológico o biocontrol de enfermedades han experimentado desde su utilización cambios en cuanto a su contenido y definición, siendo la más aceptada: Control Biológico se define como “la reducción del inóculo o de la actividad productora de la enfermedad del patógeno, debido a uno o más organismos, incluida la planta huésped y excluido el hombre” (Baker, et al, 1987).

De esta definición se desprenden un gran número de posibles vías a explorar en la búsqueda del control de las enfermedades: 1. Uso de microorganismos



antagónicos. 2. Uso de fungicidas naturales derivados de metabolitos secundarios de plantas y microorganismos. 3. Manipulación de la resistencia en productos recolectados (Viñas, 2005).

El control biológico generalmente posee efectos más específicos, es decir, solo afecta al organismo patógeno que se quiere controlar, sin atacar a los otros organismos beneficiosos y manteniendo intactas las comunidades microbiológicas del suelo para favorecer la salud de las plantas y raíces, siendo más estable y duradero que otros métodos de control y compatible con los conceptos y metas del manejo integrado de plagas y la agricultura sostenible (Yamaguchi y Clark, 1998).

El objetivo de la agricultura sustentable consiste en mantener a largo plazo la viabilidad económica y la productividad de los cultivos, al mismo tiempo que protege la calidad ambiental y los recursos naturales; esto porque se ha tratado de minimizar pesticidas químicos y fertilizantes en los cultivos tanto como sea posible, a través del uso más efectivo y eficiente de los recursos no renovables del lugar y la integración de ciclos, procesos y controles biológicos. Sin embargo, el biocontrol no pretende reemplazar completamente a los controles químicos, ya que estos siempre tendrán un rol importante en la supresión de las enfermedades; pero se lo puede combinar con otras estrategias de control dentro de un sistema integrado de manejo de plagas (Hutson, y Miyamoto, 1998).

Hutson y Miyamoto, indican que para tener un efectivo desarrollo e implementación de buenos sistemas de control biológico, tenemos que centrarnos en el estudio de cinco áreas críticas:

- Identificación de las cepas, condiciones, interacciones y requerimientos necesarios para un óptimo rendimiento de los mecanismos específicos de biocontrol.
- Uso de múltiples antagonistas y variados mecanismos de acción.
- Influencia de la planta hospedera sobre las comunidades microbianas.



- Integración del control biológico con otras estrategias de control de enfermedades.
- Mejoramiento de formulaciones y sistema de aplicación.

1.10 Métodos alternativos al control químico de fitopatógenos.

El uso de pesticidas químicos ha conducido a una mejora importante en la producción de las cosechas, compuesto que ha proporcionado un suministro continuo de alimentos a bajo costo. Sin embargo, la demanda pública para reducir el uso de pesticidas y la legislación vigente en los países desarrollados limita la aplicación de compuestos químicos en los cultivos y productos agrícolas, ya que estos reducen la fertilidad del suelo y acarrear problemas ecológicos graves; es así que en la actualidad se están desarrollando nuevas alternativas de control de más específicas y menos nocivas para el ambiente a través del desarrollo de agroquímicos selectivos con alta degradabilidad en la naturaleza.



Figura No. 3. Los hongos desarrollados o en desarrollo para el control biológico de plagas (Burges, 1998; Butt et al, 1999, 2001).

Producto	Hongo	Objetivo	Productor
Los hongos entomopatógenos			
Mycotal	Verticillium lecanii	Mosca blanca	Koppert, Países Bajos
Vertalec	Verticillium lecanii A	Afidos	Koppert, Países Bajos
BIO 1020	Metarhiziumanisopliae	Gorgojo de la vid	LicencedtoTaensa, USA
Biogreen	Metarhiziumanisopliae	Larvas de escarabajo en el pasto	Bio-careTechnology, Australia
Metaquino	Metarhiziumanisopliae	Saliva bichos	Brasil
Bio-Path	Metarhiziumanisopliae	Cucarachas	EcoScience, USA
Bio-Blast	Metarhiziumanisopliae	Termitas	Ecoscience, USA
Cobican	Metarhiziumanisopliae	Bichos de caña de azúcar	Probioagro, Venezuela
Conidia	Beauveriabassiana	Broca del café Hypothenemshampeii	Live SystemsTechnology, Colombia
Ostrinil	Beauveriabassiana	Taladro del maíz Natural Oruga Sesamia	Natural Plant Protection (NPP), Francia
CornGuard	Beauveriabassiana	Europea taladro del maíz Ostrinianubilalis	Mycotech, USA
Mycotrol GH	Beauveriabassiana	Saltamontes y langostas	Mycotech, USA
Mycotrol WP &	Beauveriabassiana	Mosca blanca, pulgones	Mycotech, USA
BotaniGard	Beauveriabassiana		
Naturalis-L	Beauveriabassiana	Gusanos del algodón	Troy Biosciences, USA
Proecol	Beauveriabassiana	Gusano ejército	Probioagro, Venezuela
Boverin	Beauveriabassiana	Escarabajos	former antigua URSS
Boverol	Beauveriabassiana	Escarabajos	Checoslovaquia
Boverosil	Beauveriabassiana	Escarabajos	Checoslovaquia
Engerlingspilz	Beauveribrongniartii	Abejorros	Suiza
SchweizerBeauveria	Beauveribrongniartii	Abejorros	Suiza
Melocont	Beauveribrongniartii	Abejorros	Austria
Green Muscle	Metarhiziumflavoviride	saltamontes y langostas	CABI - Reino Unido BioScience
PFR-97	Paecilomycesfumosoroseus	Mosca blanca	ECO-tek, EE.UU
Pae-Sin	Paecilomycesfumosoroseus	Mosca blanca	Agrobionsa, Mexico
Laginex	Lagenidiumgiganteum	Larvas de mosquitos	AgraQuest, EE.UU.



1.11 Enfermedades vegetales causadas por *Botrytis cinerea* y *Alternaria spp.*

1.11.1 *Botrytis cinerea*.

Botrytis cinerea es un fitopatógeno que causa los “mohos grises” o las “pudriciones grises” de frutas y hortalizas, tanto en el campo como durante el almacenamiento. Generalmente todas las frutas, hortalizas y bulbos almacenados son atacados por *Botrytis cinerea*. La pudrición puede iniciarse en la inflorescencia o en el extremo del pedúnculo del fruto, o bien en cualquier herida, hendidura o incisión en los tejidos de los órganos almacenados. Dicha pudrición tiene el aspecto de un área bien definida, pardusca y aguada, la cual penetra profundamente y avanza con gran rapidez a los tejidos del órgano. En la mayoría de hospederos y bajo condiciones de humedad, se desarrolla una capa de moho aterciopelado, granular y de color grisáceo o gris parduzco sobre la superficie de las áreas putrefactas (Agrios, 1991).

Las características son: abundantes conidios de forma oval en el extremo de conidióforos grises.

Entre los principales antibióticos de origen microbiano efectivos para controlar esta enfermedad tenemos a Irumamicina, Albopeptina, Tautomicina, Tautomicitina, RS-22, todos los aislados de *Streptomyces spp.* De origen Chino (Duran y Mosquera, 2007).

1.11.2 *Alternaria spp.*

El hongo de género *Alternaria spp.*, ataca principalmente a las hojas y en menor grado a los frutos de las solanáceas como la papa y el tomate riñón, produciendo en las hojas en un inicio manchas irregulares de color pardo oscuro, rodeadas de un halo amarillento, que posteriormente van creciendo por zonas concéntricas claramente visibles, que al final se desprenden dejando a las hojas agujereadas;



cuando la enfermedad avanza las hojas se ennegrecen totalmente y se secan (Urquijo, et al, 1979).

Puede ser controlado por el grupo de antibióticos llamados polioxinas, producidos por el hongo *Streptomycescacaai* (Duran y Mosquera, 2007).

Los conidios de *Alternaria spp.* se caracteriza por poseen setos transversales y longitudinales, llamados dictiosporas, de forma picuda y de color pardo. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o también de la espora anterior, dando lugar a más de un brote. Esta especie crece en medios ricos y en la oscuridad bajo condiciones ambientales no controladas, se forma un exceso de micelio que afecta el desarrollo tridimensional de su esporulación (Carrillo, 2003).

1.12 Identificación de Hongos Biocontroladores.

Debido a que cada una de las enfermedades fungosas de las plantas casi siempre se debe a un solo tipo de hongos y a que hay más de 100 000 especies diferentes de hongos, la identificación de la especie que se encuentra en una planta enferma o en un medio de cultivo, implica que deben excluirse todas, excepto una de las especies de hongos conocidas.

Las características más importantes de los hongos que se utilizan para su identificación, son sus esporas y cuerpos fructíferos (o estructuras portadoras de las esporas) y, hasta cierto grado, las características de su soma (plasmodio o micelio).

Estos órganos se examinan directamente en el microscopio compuesto después de haber sido retirados de la planta a la que han infectado. Con frecuencia, el espécimen infectado debe mantenerse húmedo durante algunos días para permitir el desarrollo de los cuerpos fructíferos del hongo o, en todo caso, este último debe aislarse y cultivarse en medios artificiales a fin de que su identificación se realice



con base en los cuerpos fructíferos que produzca en esos medios. En el caso de algunos hongos, se han generado medios nutritivos especiales que permiten cultivar selectivamente sólo a una determinada especie de hongo, permitiendo su rápida identificación.

La forma, color, tamaño y manera en que se disponen las esporas sobre los esporóforos o cuerpos fructíferos, así como la forma, color, etc., de esas estructuras reproductoras, son características suficientes para sugerir (con una cierta experiencia en taxonomía de hongos), la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo. En cualquiera de los casos, esas características se utilizan para determinar el género y la especie a la que pertenece un hongo determinado, y esto se logra mediante la consulta de claves analíticas que se han publicado para la identificación de las especies de hongos. Una vez que ha determinado el género al cual pertenece un cierto hongo, deben consultarse las descripciones específicas de la especie en monografías de los géneros de hongos o en publicaciones específicas de revistas de investigación.

1.13 IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO

1.13.1 *Fusarium spp.*

Fusarium es un hongo fitopatógeno que habita en el suelo de forma libre y cuando encuentra condiciones óptimas, en la mayoría de los cultivos agrícolas, hortícolas y silvícolas del mundo; presentes también en hospedantes silvestres, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición, se introduce en el interior de las plantas a través de sus raíces. El aislamiento *Fusarium* toma un carácter más complejo, porque no presenta un crecimiento miceliar en el exterior del vegetal infectado, se debe inocularlo junto con las partes afectadas de la planta en el medio de cultivo. Ocurre a nivel de la base del tallo de la planta (Urquijo, et al, 1979.)



Existen 9-90 especies reconocidas, dependiendo del sistema taxonómico usado. Algunas especies presentan formas especiales o razas.

Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. La principal toxina producida por estas especies de *Fusarium* son fumonisinas y trichothecenos (Agrios, 1991). VER ANEXO B.

1.13.2 *Verticillium spp.*

Es un género de hongos de la división Ascomycota, de la familia Plectosphaerellaceae. Suele incluir especies saprófitas y parásitas de plantas superiores, insectos, nemátodos, huevos de moluscos y otros hongos. Actualmente se cree que este género contiene 51 especies.

Entomopatógenos (Zare y Gams, 2001) Patógenos de plantas y saprófitos de restos vegetales (Barbara y Clewes, 2003).

Pero se ha revisado este género y la mayoría de los entomopatógenos y micopatógenos se han pasado a un nuevo grupo llamado *Lecanicillium*. Las especies mejor conocidas son, *Verticillium dahliae* y *Verticillium albo-atrum* causantes de la enfermedad denominada verticilosis en más de 400 especies vegetales. VER ANEXO C.

Las conidias se producen por separado en los ápices de las filídes, pero sobre todo de una célula, de vez en cuando septada.

1.13.3 *Phialophora spp.*

La mayoría son especies fitopatógenas; nueve especies saprófitas acuáticas. Gran diversidad de hospedantes: frutales, forestales, hortalizas, ornamentales, gramíneas, pueden ser atacados por cinco o más especies de este patógeno. Es



un género forma de hongo con conidióforos cortos, a veces reducidas a fiálides; sus conidios son unicelulares.

Produce ahogamientos, pudriciones radicales y de tubérculos, cánceres del tronco y collar de las plantas, marchiteces, tizones foliares y pudrición de frutos (Zentmyer, 1983). VER ANEXO D.

1.13.4 Acremonium.

Es un género de hongos de la familia *Hypocreaceae*. Anteriormente se los conocía como "*Cephalosporium*".

Su especie es generalmente de crecimiento lento e inicialmente se compacta y húmeda. Sus hifas son finos y hialinos y producen en su mayoría simples fiálides. Sus conidios son generalmente de una sola célula (es decir, ameroconidia), hialino o pigmentados, globosos a cilíndricos, y en su mayoría agregados en la cabeza de viscosa en el ápice de cada phialide. VER ANEXO E.

1.13.5 *Chrysosporium* spp.

Chrysosporium es un hongo filamentoso queratinofílico, es aislado de: suelo, estiércol. Pueden vivir en algunos restos de pelos y plumas que se encuentran en el suelo, contiene varias especies; los más comunes son *Chrysosporium keratinophilum*, *tropicum* *Chrysosporium*, *merdarium* *Chrysosporium*, *inops* *Chrysosporium*, *pannicola* *Chrysosporium*, *queenlandicum* *Chrysosporium* y *zonatum* *Chrysosporium*.

Las especies de *Chrysosporium* se diferencian unas de otras por la textura, la morfología, la localización y el tamaño de las conidias (Morrison, 1993). VER ANEXO F.



1.13.6 *Oidiodrendon spp.*

Es una especie muy común, sin embargo representa una porción pequeña de la microbiota del suelo, también se lo puede encontrar en detritus, madera y corteza.

Sus características son micelio hialino marrón; conidióforo en forma de árbol, poco ramificado solo en la parte superior, ramificado irregularmente, conidias redondas en cadenas. VER ANEXO G.



Capítulo 2

2. Materiales y Métodos

2.1 *Ubicación de los ensayos*

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología perteneciente a la Universidad de Cuenca situado en Balzaín. Los hongos fueron ubicados en el laboratorio con la finalidad de suministrar las mejores condiciones óptimas que requieren para su crecimiento, además de proporcionar un manejo adecuado para luego aislar estos hongos.

2.2 Aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo

2.2.1 METODOLOGÍA

2.2.1.1 Fase de Campo

El muestreo se realizó en la Parroquia de San Joaquín del cantón Cuenca, perteneciente a la Provincia del Azuay.

Parroquia asociada a suelos de cultivos agrícolas, considerados como nichos ecológicos en los cuales los microorganismos conviven a pH y concentraciones de nutrientes diversas.

Para la obtención de las muestras de suelo, se realizó una excavación (20 – 50 cm de profundidad). Los suelos asociados a raíces vegetales tienen la mayor densidad de población fungal.

La cantidad de muestras recolectadas fue entre 10 a 20 g, en bolsas plásticas debidamente rotuladas, posteriormente guardadas en la nevera a 4°C y procesadas dentro de las 24 – 48 horas siguientes a su recolección, para permitir que las esporas fungales se encuentren viables.



Universidad de Cuenca

El tiempo de almacenamiento de las muestras, previo a su procesamiento, no debe ser mayor a 96 horas, para evitar la pérdida de viabilidad de la carga de microorganismos.

El material colectado fue procesado en el Laboratorio de Biotecnología de Balzaín de la Universidad de Cuenca. VER ANEXO I, J, K.

2.2.1.2 Mapa de Ubicación de Recolección de las muestras Sector San Joaquín.



Figura No. 4. Mapa coordenadas de Ubicación, Parroquia San Joaquín, tomado de: <http://www.googlemaps.com>

Coordenadas UTM	
A)	2,895043 S, 79,054475 W
B)	2,891175 S, 79,057677 W
C)	2,889364 S, 79,06206 W
D)	2,888947 S, 79,061716 W
E)	2,890998 S, 79,060021 W
F)	2,889981 S, 79,06008 W
G)	2,888545 S, 79,06426 W
H)	2,887473 S, 79,064357 W
I)	2,886862 S, 79,067339 W
J)	2,893624 S, 79,057624 W

Figura No. 5. Coordenadas Satelitales de Ubicación toma muestras, Parroquia San Joaquín.

2.3 Fase de Laboratorio.

Aislamiento e identificación de los hongos de las muestras del suelo

Las muestras recolectadas fueron trasladadas al laboratorio (10 muestras), se efectuó diluciones sucesivas, de 1 gramo de muestra diluido en 9 mL de agua destilada.

Se procedió a realizar los aislamientos en medio de cultivo de Agar Papa y Agar Malta con adición de, con nistatina 500.000 UI/L y cloranfenicol (0,1g/L).

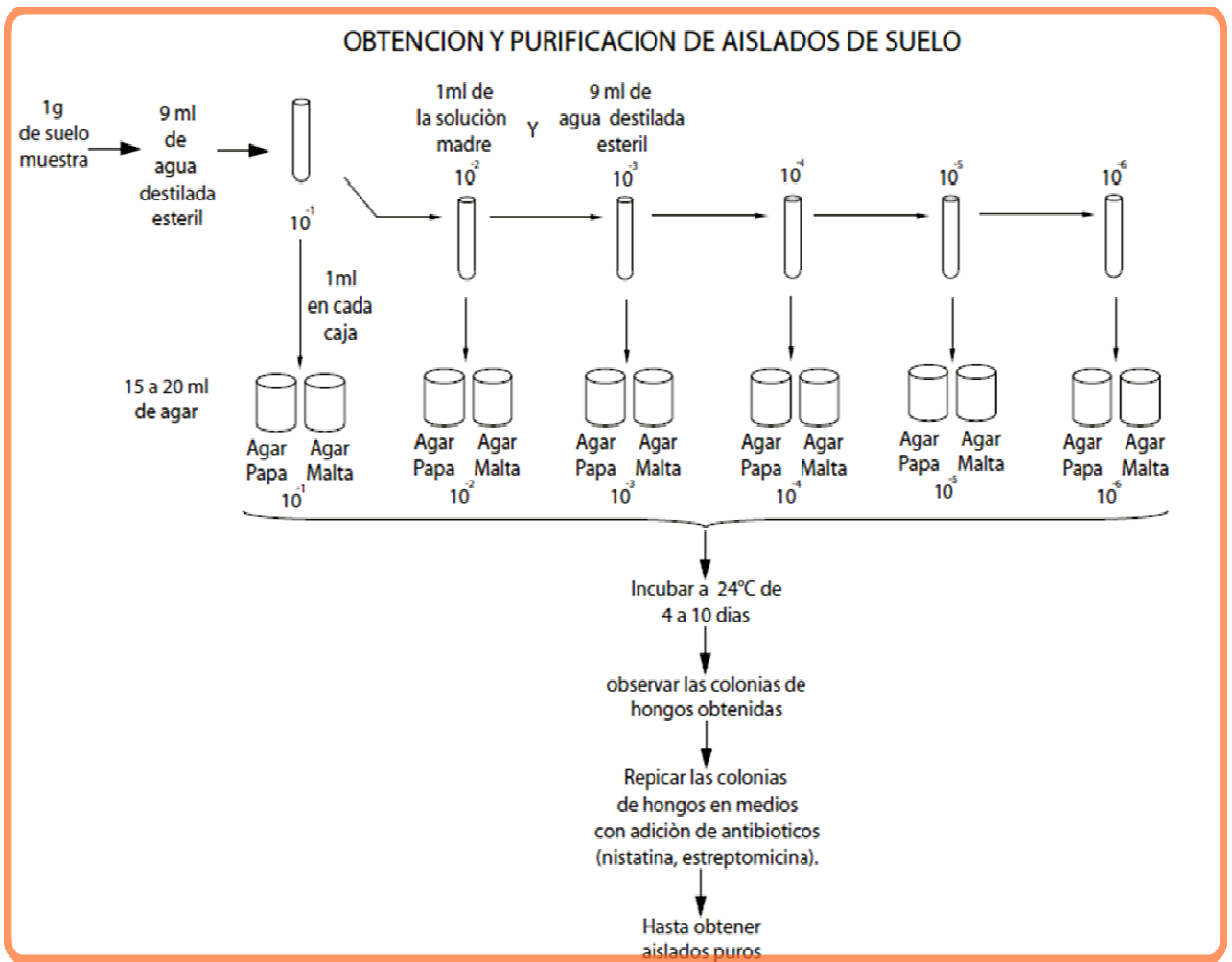


Figura No. 6. Obtención y purificación de aislados de suelo, Fuente: autora



Medios de Aislamiento

- Malta (Merck) ®
- Papa Dextrosa Agar (PDA - Merck)®
- Nistatina 500000 UI/L
- Cloranfenicol (0,1g/L).

Se incubó a una temperatura de 22°C durante 5 días.

2.4 Aislamiento de las cepas patológicas del género *Botrytis cinerea*, proveniente de frutilla (*Fragaria vesca*).

Para el aislamiento de *Botrytis cinerea*, se utilizó la técnica de Carrillo (2003), se prepara la muestra de frutilla (*Fragaria vesca*), del cual se va a obtener el agente patógeno previamente fueron lavados en agua estéril en cámara húmeda por 5 días y colocado en la estufa a una temperatura de 25 ° C durante 8 días, con una humedad del 60% para luego obtener el patógeno a utilizar en los ensayos de antagonismo.

Al observar el crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea*, sobre la superficie de la fruta se colocó porciones del mismo con una asa bacteriológica flameada en una placa de Agar Malta y Agar Papa adicionado cloranfenicol (0,1g/L), para evitar el crecimiento de bacterias. Se realizó repiques continuos hasta obtener cepas puras del patógeno.

2.5 Aislamiento de las cepas patológicas del género *Alternaria spp*, proveniente de hojas de Col Repollo (*Brassicaoleracea, alba*).

En el laboratorio cada hoja de Col Repollo (*Brassicaoleracea, alba*) contaminada con *Alternaria spp*, fue seleccionada, como se muestra en la fotografía, se diseccionó los círculos concéntricos de color café oscuro, para luego ser desinfectados por inmersión en etanol 70% v/v. Cada pedazo fue colocado en placas de Agar Papa y Agar Malta, con nistatina 500000 UI/L y cloranfenicol



(0,1g/L). Las placas se incubaron a en la estufa a una temperatura de 25 ° C durante 8 días.

Cuando se observó crecimiento de micelios de *Alternaria spp*, fueron repicados hasta obtener aislados puros.

2.6 Bioensayos para evaluar la actividad antagonista de hongos de suelo ante fitopatógenos.

El ensayo de antagonismo “in Vitro” se realizó por duplicado.

Se realizó la siembra de los patógenos (*Botrytis cinerea* y *Alternaria spp.*) en Agar Papa Dextrosa (PDA - Scharlau), y en Agar Malta: con nistatina 500000 UI/L y cloranfenicol (0,1g/L), por separado esto se incubó a una temperatura de 27 °C durante 8 días, se adicionó para evitar el crecimiento de bacterias que interfirieran en la obtención de los patógenos a utilizar en los ensayos de antagonismo.

De los repiques de cepas puras de los patógenos se recolectó una redondéela de cada uno de ellos (*Botrytis cinerea* y *Alternaria spp.*) y también de los biocontroladores (25), luego se colocó en una placa de Agar Malta y Agar Papa. El efecto antagonístico se evaluó determinando el microorganismo que inhibió el crecimiento del otro (Rodríguez, *et al*, 2002).

El ensayo de antagonismo in vivo se desarrolló empleando como patógeno a la especie de *Botrytis cinerae* y *Alternaria spp*, frente a los bicontroladores.

2.7 Producción de hongos biocontroladores a escala preparativa.

La producción de biomasa a escala, en cantidad suficiente con el fin de obtener los hongos biocontroladores depende del medio empleado y las condiciones del cultivo. Se pueden emplear varios cultivos en estado sólido que requieren fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y sales inorgánicas, elementos de traza y sustancias orgánicas pueden adicionarse.



La fuente de carbono puede derivarse de elementos como: almidón, glucosa, monosacáridos, polisacáridos, dextrina, maltosa, sacarosa, metilcelulosa, fructosa, furanosa o harina de maíz. La fuente de nitrógeno se deriva de al menos una de estas fuentes: harina de soya, peptona, extracto de levadura, germen de trigo, caseína o residuos del procesamiento de cereales. Las vitaminas y sales minerales incluyen vitamina B₁, vitamina B₆, y ácido nicotínico (Cazar, M.E 2004) . El uso de un soporte sólido junto con medios líquidos incrementa la producción de metabolitos secundarios, enzimas y esporas.

2.8 TÉCNICA 1. PREPARACIÓN DE BIOMASA EN DIFERENTES SUSTRATOS MEDIANTE EL MEDIO DE CULTIVO CZAPECK-DOX.

2.8.1 Procedimiento.

Pesar los siguientes reactivos para el Medio Czapeck-Dox 1 Litro:

- 2 g de NaNO₃,
- 1 g de KH₂PO₄,
- 0.24 g de MgSO₄ - 7H₂O,
- 0.5 g de KCl,
- 0.01g de FeSO₄ - 7H₂O,
- 30 g de Sacarosa,
- Extracto de levadura 5 g
- 1 L de agua destilada estéril

1. Pesar 200 gramos del sustrato (maíz, cascarilla, arroz, chanca) en un Erlenmeyer
2. Verter 200mL del medio de Cultivo Czapeck al sustrato hasta embeberlo
3. Colocar un tapón compuesto de gasa y algodón
4. Autoclavar el medio de cultivo
5. Esperar que se enfríe y sembrar las esporas de los hongos seleccionados con puntas estériles



6. Colocar un tapón compuesto de gasa, algodón y con papel aluminio
7. Incubar 7 días a 27°C.

2.9 TÉCNICA 2. PREPARACIÓN DE BIOMASA EN DIFERENTES SUSTRATOS MEDIANTE EL MEDIO DE CULTIVO CZAPECK-DOX.

2.9.1 Procedimiento.

Pesar los siguientes reactivos para el Medio Czapeck-Dox 1 Litro:

- 2 g de NaNO_3 ,
- 1 g de KH_2PO_4 ,
- 0.24 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- 0.5 g de KCl ,
- 0.01g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- 30 g de Sacarosa,
- Extracto de levadura 5 g
- 1 L de agua destilada estéril

1. Pesar 200 gramos del sustrato (maíz, cascarilla, arroz, chanca) en un Erlenmeyer
2. Verter 200mL del medio de Cultivo Czapeck al sustrato hasta embeberlo
3. Colocar un tapón compuesto de gasa y algodón
4. Autoclavar el medio de cultivo
5. Esperar que se enfríe y cortar con un bisturí estéril el medio (Agar Papa o Agar Malta) del Hongo Biocontrolador, en pequeños pedazos cuadrados y que posteriormente se los coloca el Erlenmeyer las esporas de los hongos seleccionados con puntas estériles
6. Colocar un tapón compuesto de gasa, algodón y con papel aluminio
7. Incubar 7 días a 27°C.



2.10 Identificación de biocontroladores a nivel de género.

Para la identificación del género en los hongos biocontroladores revisar que el microscopio no tenga ningún tipo de error, por lo que se deberá limpiar el portaobjetos a utilizar en cada ensayo, también es importante limpiar los lentes objetivos del microscopio.

2.10.1 Técnica del microcultivo.

Los hongos están formados por estructuras frágiles, que al ser tocadas con ganchos, asas bacteriológicas, o espátula se destruyen o caen al colocarlos en la placa, lo que hace que sea imposible observarlas con su propia morfología para la identificación taxonómica.

Para la identificación de los biocontroladores se utilizó el microcultivo para el crecimiento de hongos que se utilizó:

2.10.2 Materiales

1. Puntas de pipetas estériles
2. Agua destilada estéril
3. Cajas estériles
4. Porta y cubre objetos estériles
5. Vaselina estéril
6. Medio de cultivo
7. Pipetas pasteur
8. Palillos estériles
9. Azas estériles
10. Papel absorbente corta en pedazos pequeños
11. Cámara de flujo laminar

2.10.3 Procedimiento.

- Sanitizar la Cámara de Flujo Laminar
- Todos los materiales deben ser colocados en la Cámara de flujo laminar por el tiempo de 15 minutos de luz u.v.
- Utilizar una pipeta Pasteur colocar gota de medio de cultivo (Papa o Malta) en un porta objetos estéril.
- Esperar que se solidifique el agar
- Con una asa bacteriológica estéril tomar una porción del hongo biocontrolador a identificar y repicarlo en la placa estéril con el agar
- Cubrir con un cubre objeto previamente colocado en sus vértices vaselina.
- En la caja Petri estéril se ubica en forma de un triángulo los palillos de madera y se coloca el porta objeto preparado anteriormente
- Dentro de la caja se procede a colocar 5 mL de agua estéril, para hacer una cámara de humedad
- Tapar la caja Petri y no sellar con papel parafilm
- Colocar en la estufa a 27 ° C durante 7 días.

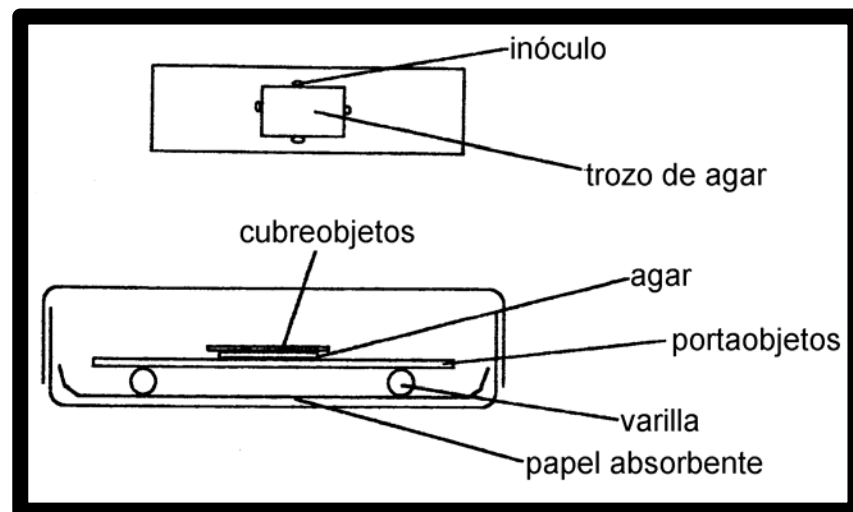


Figura No. 7. Técnica del microcultivo *en caja Petri*

Tomado de: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/03htextotecnicas.pdf>

2.10.4 Técnica de cinta pegante.

Esta técnica es una de las más usadas, por que conserva la yuxtaposición de las esporas y segmentos de manera correcta sin modificación alguna.

Se procede a colocar el lado engomado la cinta transparente scotch sobre la colonia del hongo que se desea observar su morfología

Colocar la cinta bien extendida sobre una gota de Azul de actofenol en la placa portaobjetos.

Luego situar en el microscopio y observar la forma y el ordenamiento característico de las esporas

Se observa en el microscopio con el lente de resolución de 4X.

Después de encontrar la estructura, se puede ir aumentando hasta llegar a la resolución más grande 40X.

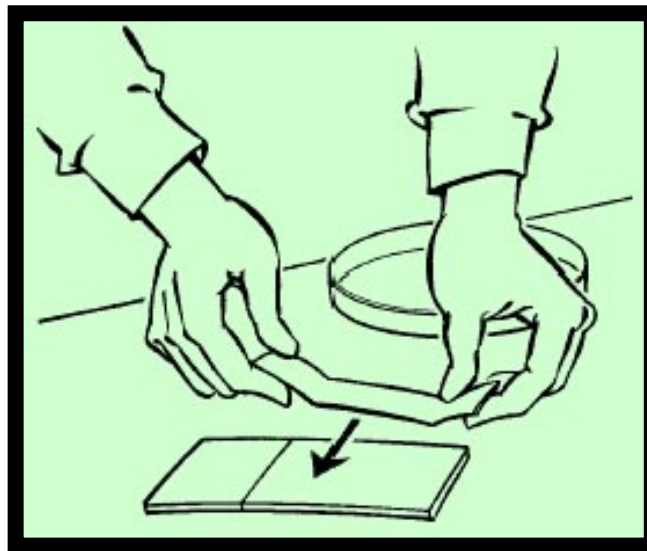


Figura No.6. Preparación con cinta.

Tomado de:

http://www.unad.edu.co/fac_ingenieria/pages/Microbiologia_mutimedia/3_4_2siembra.htm



2.10.5 Técnicas de Tinción

Para la identificación de las estructuras de los hongos se realizaron preparados coloreados de Azul de Lactofenol y tinción de Wright.

2.10.5.1 Tinción de Wright

2.10.5.1.1 Procedimiento

Con una aza se toma de la placa micelios del hongo biocontrolador y se coloca en un porta objetos.

Se coloca cantidad suficiente de colorante de Wright cubriéndola totalmente, evitando que se evapore.

Se deja reposar 4 minutos.

Colocar en igual cantidad una solución amortiguadora o en su defecto agua destilada.

Dejar en reposo 7 minutos

Lavar la placa

Se observa en el microscopio con el lente de resolución de 4X.

Después de encontrar la estructura, se puede ir aumentando hasta llegar a la resolución más grande 40X.

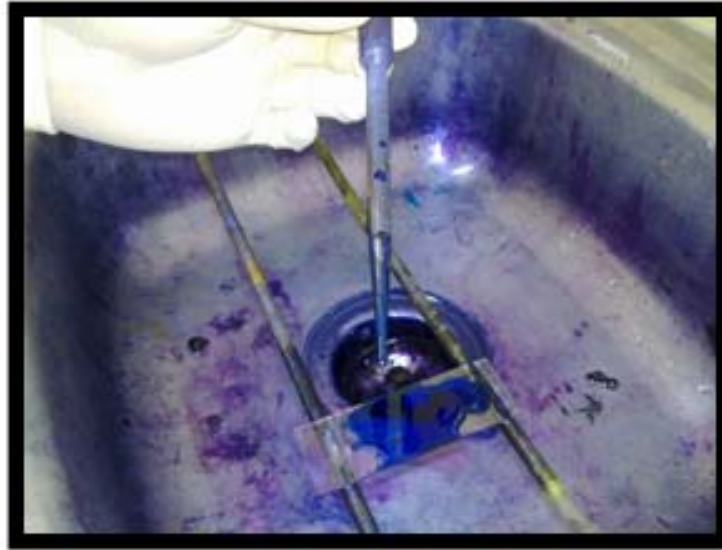


Figura No. 7. Tinción de Wright.

Tomado de http://www.unad.edu.co/fac_ingenieria/pages/Microbiologia_mutimedia/3_4_2siembra.htm

2.10.5.2 Azul de Lactofenol

Se coloca la muestra fungal del hongo a observar en un portaobjetos mediante una asa bacteriológica estéril, con mucho cuidado de destruir las estructuras morfológicas.

Cubrir la muestra con el cubreobjetos, posteriormente colocar una gota de Azul de Lactofenol y está lista para poder ser observado en el microscopio óptico.

Procurar que no queden burbujas de aire en la preparación.

Se observa en el microscopio con el lente de una resolución de 4X.

Después de encontrar el microorganismo deseado, se puede ir aumentando hasta llegar a la resolución más grande 40X.

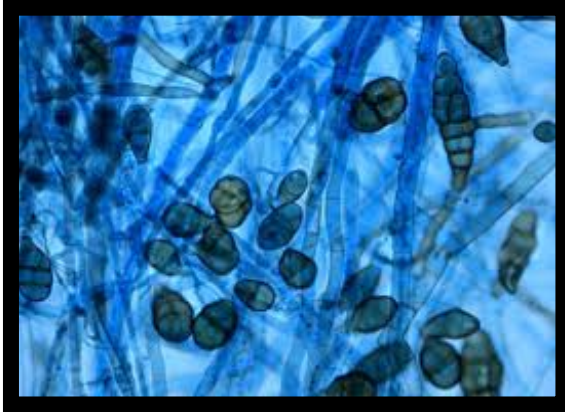


Figura No. 8. Tinción de Azul de Lactofenol. Observación microscópica con tinción de Azul de Lactofenol de *Alternaria spp.*



Figura No. 9. Observación microscópica sin tinción de Azul de Lactofenol de *Alternaria spp.*

2.10.5.2.1 Composición de Azul de Lactofenol (azul de algodón)

Ácido láctico	25 mL
Glicerina	50 mL
Agua destilada	25 mL
Azul de algodón	0.05 g

Se realizó una descripción macroscópica en base a la consistencia y el color que el hongo le confiere al medio de cultivo.

Luego se realizaron montajes de cada uno de los aislados, con una gota de Azul de Lactofenol en la placa del microcultivo para la observación de la reproducción asexual; fueron observados al microscopio con un aumento de 40X.

Las estructuras externas del hongo, como conidios, conidióforos, hifas tabicadas y no tabicadas fueron tomados en cuenta para la identificación de esta manera se hizo la identificación de los hongos biocontroladores a nivel de género haciendo uso de claves morfológicas mediante la técnica del microcultivo.

Figura No. 10. Identificación Microscópica (Técnica del Microcultivo)



Figura No. 11. Identificación Macroscópica (Cepas Puras de Biocontroladores)

2.11 RECUENTO DE ESPORAS

2.11.1 Materiales

1. Puntas de pipetas estériles
2. Agua destilada estéril
3. Tubos de plástico tapa rosca
4. Bisturí
5. Embudo
6. Soporte de embudos
7. Gasa estéril
8. Gradilla para tubos
9. Vortex



2.11.2 Hongos utilizados para el Recuento de esporas

2.11.2.1 Procedimiento

- Sanitizar la cámara de Flujo laminar
- Colocar todos los instrumentos dentro de la cámara y encender el ultra violeta durante 15 minutos
- Rotular los tubos con el código del hongo bicontrolador
- Los hongos bicontroladores sembrados en medio de arroz se extraen de este aproximadamente (1 cm²) y se colocan en los tubos de plástico tapa rosca
- Colocar 5 mL de agua destilada estéril en el tubo
- Homogenizar en el vortex
- Colocar el embudo en el soporte y la gasa para la filtración
- Se filtra y se recoge el filtrado en otro tubo de plástico
- Colocar en la cámara de Neubauer
- Observar en el microscopio con lente de resolución 40X
- Se cuenta las esporas en la cámara de Neubauer de la igual forma que se realiza para el conteo de glóbulos blancos en 5 cuadrantes de la cámara, cada uno de los extremos y el de centro.

En caso que el recuento de esporas no se realice el mismo momento de la filtración se procede a colocar en el congelador.

Capítulo 3

3 Resultados y Discusión.

3.1 Resultados

3.1.1 Aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo

De este trabajo se obtuvo un total de 25 aislados fungales de suelo recolectado en la zona de San Joaquín de la provincia del Azuay, de estos cada uno fue registrado por sus características como: coloración, aspecto de su colonia, pigmentación que confiere al medio de cultivo, crecimiento en Agar Papa-Dextrosa y Agar Malta.

En la siguiente tabla se describe las características procedentes del aislamiento de hongos del suelo mediante la técnica de dilución, la descripción de su colonia y su código

Tabla No. 1 Caracterización de aislados fungales en relación con el sitio de muestreo San Joaquín.

Muestra	Dilución	Código	Aspecto
1	10^{-4}	A ₇	Blanco algodonoso
	10^{-4}	A ₈	Blanco verduzco, algodonoso, le confiere al medio color pardo
	10^{-3}	A ₁₁	Color vino algodonoso, le confiere color al medio
	10^{-3}	A ₁₂	Blanco algodonoso
	10^{-3}	A ₁₃	Blanco algodonoso
	10^{-3}	A ₁₄	Blanco algodonoso, le confiere color al medio
	10^{-2}	A ₁₅	Color vino, le confiere color al medio
	10^{-2}	A ₁₆	Blanco con hilos algodonosos
	10^{-2}	A ₁₇	Blanco algodonoso.
	10^{-2}	A ₁₈	Blanco algodonoso.

2	10^{-2}	A ₉	Blanco algodonoso.
	10^{-2}	A ₁₀	Blanco algodonoso.
	10^{-3}	A ₁₉	Blanco algodonoso, le confiere color al medio
	10^{-3}	A ₂₀	Blanco algodonoso, confiere color al medio
3	10^{-2}	A ₁	Blanco algodonoso.
	10^{-2}	A ₂	Rojo vino algo algodonoso, confiere color al medio de cultivo
	10^{-2}	A ₃	Pardo verduzco confiere color amarillo al medio
	10^{-3}	A ₄	Rojo vino un poco algodonoso, confiere color al medio
	10^{-3}	A ₅	Blanco verduzco, algo algodonoso confiere al medio un color pardo
	10^{-3}	A ₆	Café oscuro, no algodonoso
5	10^{-5}	A ₂₁	Coloración verduzco, la parte superior transfiere color rojizo al medio
	10^{-5}	A ₂₃	Blanco algodonoso, con abundante micelio aéreo no confiere color al medio
6	10^{-5}	A ₂₄	Blanco micelio algodonoso
	10^{-4}	A ₂₂	Aspecto algodonoso, coloración blanca amarillenta, no confiere color al medio
	10^{-2}	A ₂₅	Hongo con micelio negro y trasfiere un color negro al micelio
Total de aislados	25		

A: Hongos de aislados en San Joaquín.



Figura No. 12, Aspecto Macroscópico de cepas fungales purificadas.

Fuente: Autora

El trabajo de aislamiento de especies fungales por dilución seriada evidenció que las soluciones de suelo preparadas en concentraciones de rangos 10^{-2} y 10^{-3} proveen la mayor cantidad de especies fungales en el medio de cultivo.

Los resultados muestran que los hongos obtenidos provienen de muestras a estas concentraciones. Este resultado concuerda con el hecho de que se trata de las soluciones más concentradas. Indicando que la densidad de aislados fungales está en relación directa con la concentración de la muestra.

Representado en la siguiente tabla.

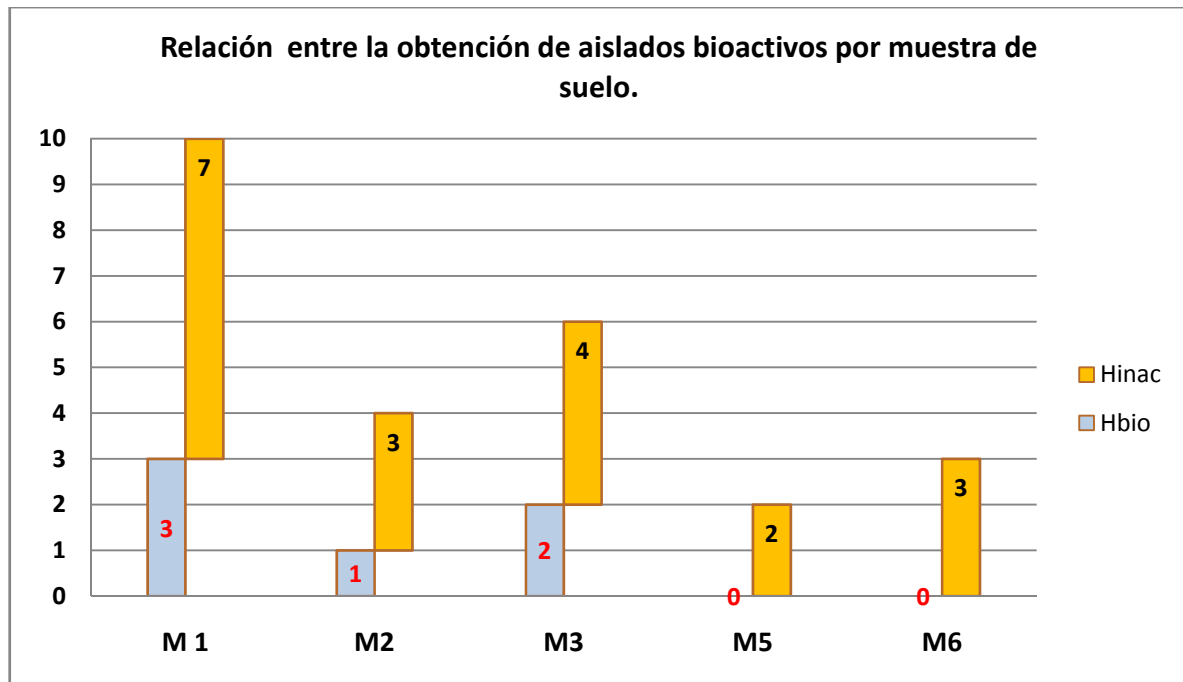
Adriana Paola Jara Bermeo

Tabla No. 2 Diluciones de cada una de las muestras, con su respectivo número de frecuencia.

Muestra	Dilución	# Especies Fungales	H.bio en la dilución
1	10^{-4}	2	1
	10^{-3}	4	2
	10^{-2}	4	0
2	10^{-3}	2	0
	10^{-2}	2	1
3	10^{-3}	3	2
	10^{-2}	3	0
5	10^{-5}	2	0
6	10^{-5}	1	0
	10^{-4}	1	0
	10^{-2}	1	0

H.bio= Hongos biocontroladores

Grafico 3. Relación entre la obtención de la obtención de aislados bioactivos por muestra de suelo.



De la muestra 1 se obtuvo el 66.6% del total de los hongos biocontroladores, y en su dilución 10^{-3} se consiguió dos hongos biocontroladores que representa cada



uno el 16.66%. En el caso de la muestra 3 representa el 33.33%. Finalmente se consiguió 6 hongos con capacidad antagonista ante el patógeno *Botrytis cinerea*.

3.1.2 Aislamiento de las cepas patológicas del género *Botrytis cinerea*, proveniente de frutilla (*Fragaria vesca*).

Identificación de las cepas patológicas del género *Botrytis cinerea*, proveniente de frutilla (*Fragaria vesca*.) y cepas patológicas del género *Alternaria spp*, proveniente de hojas de Col Repollo (*Brassicaoleracea, alba*).

Mediante la técnica descrita anteriormente descrita se obtuvo este patógeno.

3.1.2.1 Características de Crecimiento *Botrytis cinerea*

Puede crecer en Agar Papa o Agar Malta. El aspecto de la colonia es de color gris - negra, de aspecto algodonosa, el tiempo de crecimiento es de 8 días a 25° C.

3.1.2.2 Características de Crecimiento *Alternaria spp.*

El crecimiento es óptimo tanto Agar Papa o Agar Malta.

El aspecto de las colonias en principio es de color blanco algodonoso, que posteriormente se torna de color negro, del mismo aspecto. El tiempo de crecimiento es de 8 días a 25°C.


<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria spp</i>
	
 <p data-bbox="282 1482 834 1520">Placa de Cepa pura de <i>Botrytis cinerea</i>.</p>	 <p data-bbox="899 1482 1419 1520">Placa de Cepa pura de <i>Alternaria spp</i>.</p>

Tabla No. 2. Características de Crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria spp*

3.1.3 Bioensayos para evaluar la actividad antagonista de hongos de suelo ante fitopatógenos

De las 25 cepas aisladas, se realizaron repiques en medios de cultivos para obtenerlos puros que posteriormente fueron probados en ensayos de actividad antagonista para seleccionar las cepas activas contra estos patógenos. Resultando un total de 6 cepas con actividad controladora sobre hongos fitopatógenos. El valor es mencionado en milímetros

Tabla No. 3 Evaluación de potencial biocontrolador por dimensión de zona de inhibición en bioensayo de antagonismo fungal.

HONGO BIOACTIVO	HONGO PRUEBA	
	<i>Alternaria spp</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>A₄</i>	NA	NA
<i>A₅</i>	NA	80 mm
<i>A₆</i>	NA	60 mm
<i>A₇</i>	NA	70 mm
<i>A₉</i>	NA	120 mm
<i>A₁₀</i>	NA	NA
<i>A₁₁</i>	NA	50 mm
<i>A₁₃</i>	NA	NA
<i>A₁₄</i>	NA	110 mm
<i>A₁₇</i>	NA	NA
<i>A₁₉</i>	NA	NA
<i>A₂₃</i>	NA	NA

NA= No Activo

No todos los hongos bioactivos presentaron actividad antagonista ante los Hongos Prueba *Alternaria spp*, y *Botrytis cinerea* pues de los 25 hongos solo fueron efectivos contra *Botrytis cinerea* tan solo 6, el que mostró la actividad antagonista más alta fue el aislado A₉ con una zona de inhibición de 120mm.

Para *Alternaria spp* ninguno de los Hongos bioactivos presentó actividad.

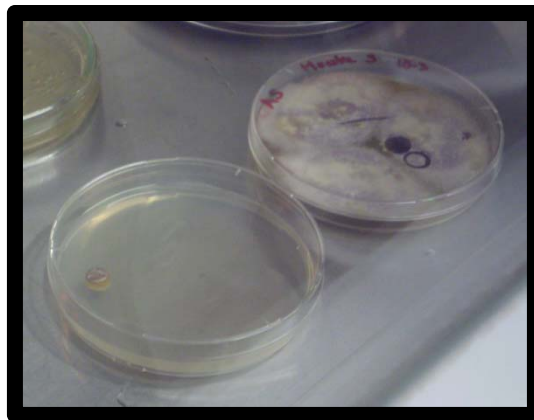


Figura No. 13, Redondéela del hongo biocontrolador

Fuente: Autora

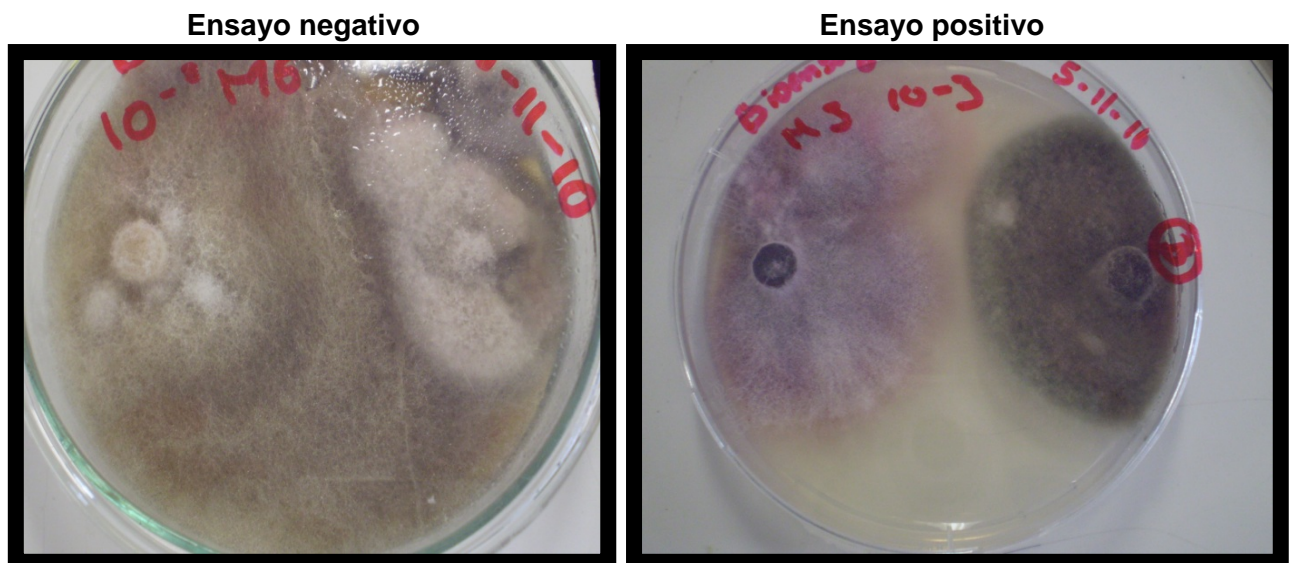






Figura No. 14, Antagonismo de *Alternaria spp*. y *Botrytis cinérea*

Adriana Paola Jara Bermeo

3.1.4 Producción de hongos biocontroladores a escala preparativa

La producción de biomasa se realizó en diferentes sustratos que se presenta a continuación

Tabla No. 4 Producción de hongos biocontroladores en diferentes sustratos

Medio	Tiempo de Crecimiento	Ilustración del medio
Arroz	Bueno	
Maíz	Excelente	
Cascarilla de Arroz	Malo	
Maíz molido (Chanca)	Bueno	

El crecimiento de los hongos biocontroladores en los diferentes sustratos depende de las características del hongo biocontrolador.

El crecimiento de los hongos biocontroladores en el sustrato de Cascarilla de arroz fue lento y poco satisfactorio, en contraposición a lo observado en el sustrato de chanca y maíz.

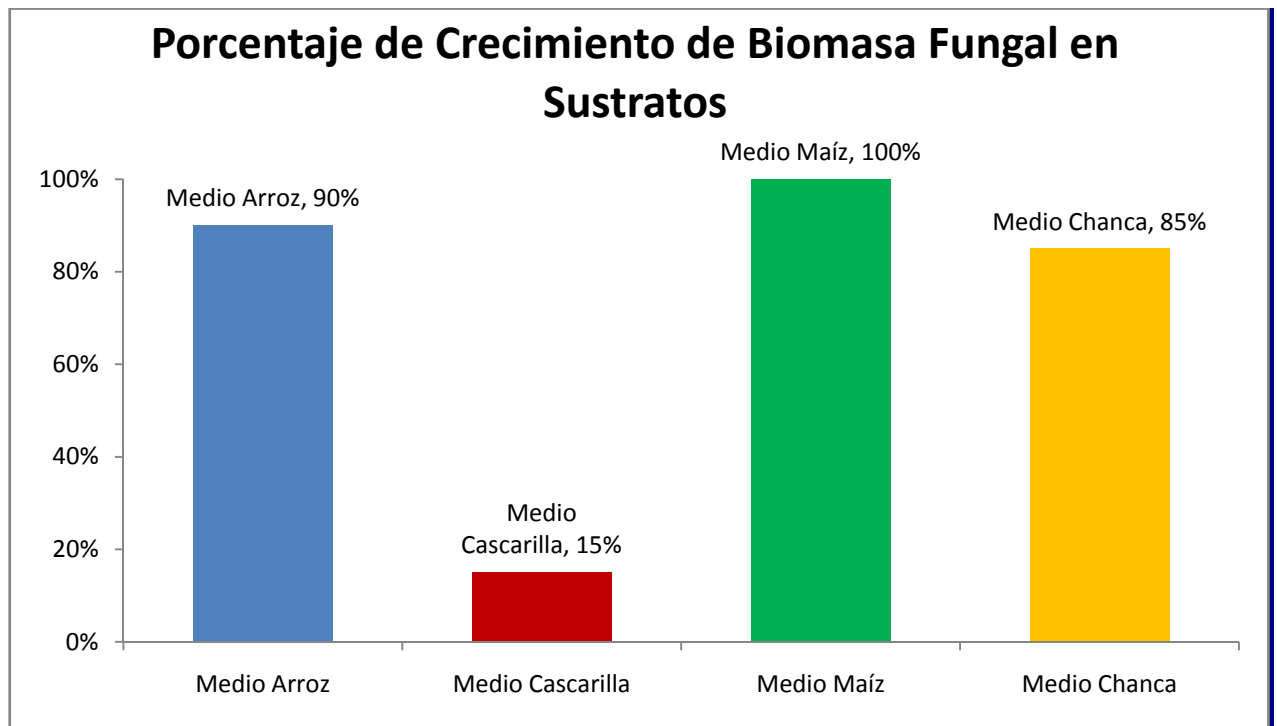


Gráfico 4. Evaluación de crecimiento en los diferentes sustratos



Tabla No. 5 Características de crecimiento de los biocontroladores a escala preparativa.

H. bio	INOCULO		SUSTRATO DE MAÍZ	ASPECTO FINAL DEL SUSTRATO GRANO			SUSTRATO DE MAÍZ PULVERIZADO	ASPECTO FINAL DEL SUSTRATO PULVERIZADO		
	Esporas	Fragmentos	GRANO	Compacto	Poco compacto	No compacto		Compacto	Poco compacto	No compacto
A5	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
A6	+	+	+	-	+		+	+	-	-
A7	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
A9	+	-	+	++	-	-	+	+	-	-
A11	+	-	+	++	-	-	+	+	-	-
A14(1)	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A14(2)	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
A14(3)	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-


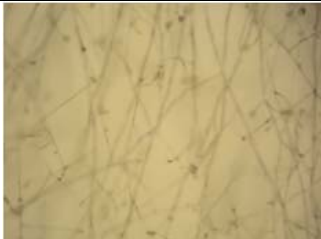
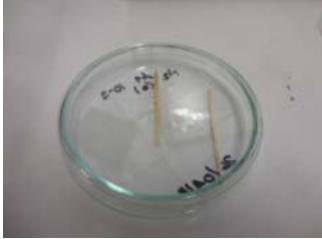
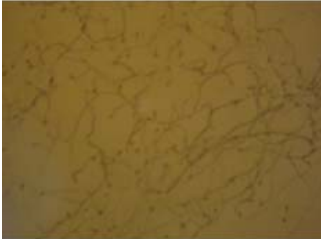
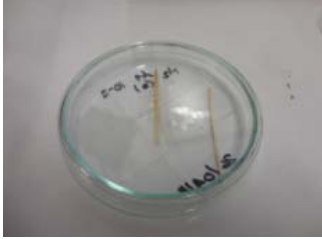
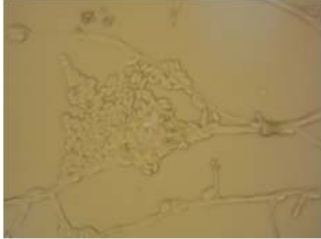
H.bio= Hongo bioactivo

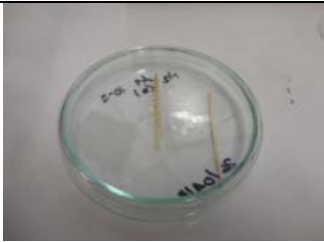



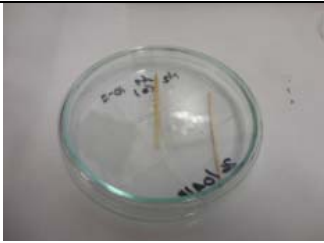
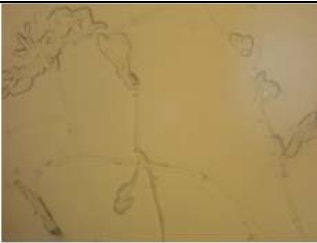


3.1.5 Identificación de biocontroladores a nivel de género

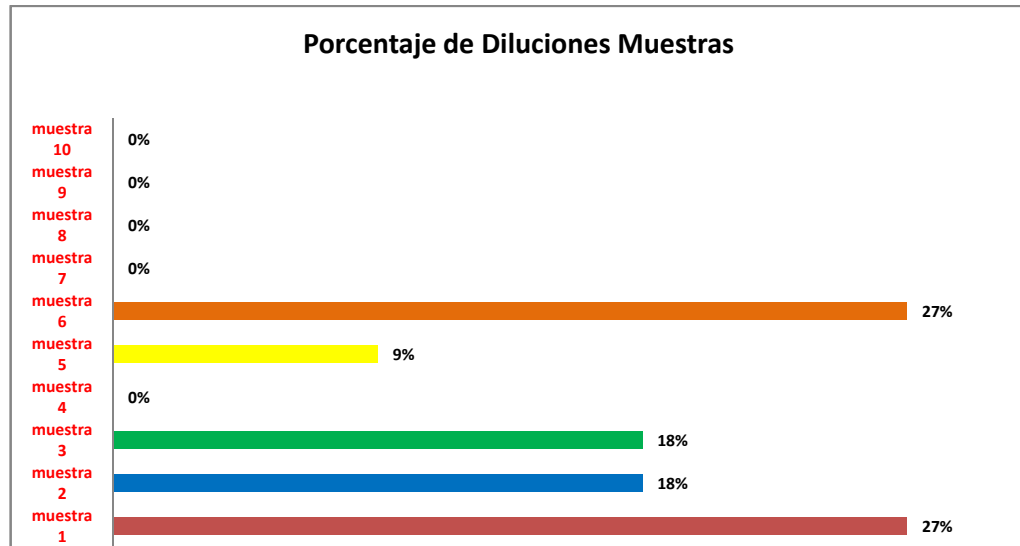
La identificación de biocontroladores se realizó mediante la técnica del microcultivo descrito en el capítulo II. A continuación se presentan las características microscópicas de este.

Tabla No. 6 Identificación de los Hongos Biocontroladores, con el respectivo código y nombres. (Autora)

Código Hongo	Identificación	Características	MICROCULTIVO	MEDIO DE CULTIVO
A ₅	<i>Acremonium / Cephalosporium</i>	Hifas no tabicadas, Conidióforos abundantes, conidios abundantes en grupo		
A ₆	<i>Oidiodendron</i>	Hifas tabicadas		
A ₇	<i>Verticillium</i>	Colonia Color blanco algodonoso morado Hifas no tabicadas		

A ₉	<i>Chrysosporium</i>	Colonia blanca algodonos, confiere color a medio Hifas no tabicadas		
A ₁₁	<i>Fusarium</i>	Colonia blanca violeta confiere color al medio Hifas tabicadas Conidios abundantes		
A ₁₄	<i>Phialofora</i>	Colonia blanca algodonosa Micelio aéreo color blanco y morado Hifa no tabicada		

El resultado total de las diez muestras fungales aisladas se obtuvo como resultado el siguiente gráfico



El trabajo de aislamiento y purificación de hongos de suelo presenta dificultades en el mantenimiento de cepas puras, por lo cual algunos aislados pueden resultar no viables para los ensayos de actividad biológica, No obstante, los resultados obtenidos muestran que, del número de hongos viables, el 50% presentan actividad biocontroladora ante *B.cinerea*, tal como se muestra en el siguiente gráfico

3.1.6 Resultado del Conteo de Esporas

Se utilizó las esporas de los hongos biocontroladores procedentes del sustrato de maíz, y maíz pulverizado (chanca).



Figura No. 15, Obtención de esporas del Sustrato Arroz, **Fuente:** Autora

Adriana Paola Jara Bermeo



Figura No. 16, *Cámara de Neubauer.* Fuente: Autora

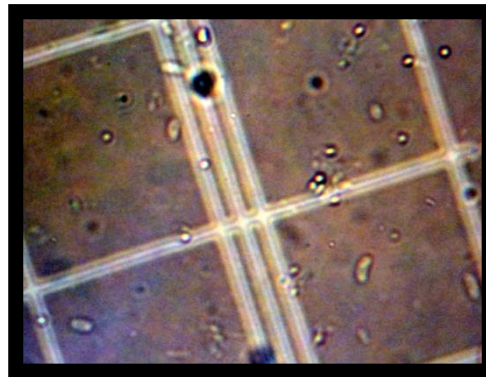


Figura No. 17, *Conteo de Esporas, Técnica cámara de Neubauer,* Fuente: Autora

El recuento de esporas se realizó mediante la Cámara de Neubauer se obtuvo los siguientes resultados

Tabla No. 7 Resultado del recuento de esporas

RECuento DE ESPORAS		
Biocontrolador	TOTAL	esporas/mL.
Acremonium o Cephalosporium	34,6	5,82832E-10
Oidiodendron	12,6	2,49906 E-07
Verticillium	12,6	2,49906 E-07
Chrysosporium	39,6	2,59316 E-10
Fusarium	23	6,75512 E-09
Phialofora	20	1,5625 E-08

3.2 Discusión

3.2.1 Aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo

El objetivo de este trabajo fue investigar los suelos de San Joaquín como fuente de hongos con actividad biocontroladora, para evitar el uso de agentes agroquímicos en las hortícolas.

El uso intensivo de fertilizantes y plaguicidas químicos del suelo ha incrementado la fatiga del suelo (factor limitante para un cultivo), que lleva a la falta de sus componentes básicos (N, P y K). Por esta razón se planteó la presente investigación, con el fin de reemplazar los plaguicidas por estos agentes biocontroladores naturales (Escuela Superior de Agricultura de Barcelona, 2011).

Russell (1968) propone que, en condiciones naturales, el número de organismos que habitan en el suelo es mayor, incrementándose su diversidad. La zona de muestreo se realizó en San Joaquín por su actividad agrícola, con el ánimo de investigar la diversidad fungal presente en suelos intervenidos con prácticas agrícolas.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Russell. Las muestras colectadas a 20cm de profundidad presentaron una importante población de microorganismos. En la biósfera, un gramo de suelo seco puede contener hasta un millón de esporas; este factor depende del hábitat del suelo así como las condiciones físicas y químicas.

La técnica de dilución seriada es útil para el aislamiento de hongos en los productos agrícolas, pero a veces conviene sembrar el inóculo tomando directamente de la superficie del material de estudio (Carrillo, 2003). En este trabajo de investigación se realizó la técnica de dilución para obtener los hongos biocontroladores a partir de un gramo de suelo, y para los patógenos *Alternaria spp.* y *Botrytis cinerea* se realizó la técnica como explica (Carrillo, 2003).



Universidad de Cuenca

Esta investigación determinó que el 50% de las cepas obtenidas mediante la técnica de dilución, produjeron doce hongos de cepas puras, y de ellas seis son biocontroladores, para *Botrytis cinerea*. Las seis cepas restantes fueron descartadas por inactividad frente al patógeno mencionado.

Los medios de cultivo utilizados para ello fueron Agar Papa-Dextrosa y Agar malta, con el objeto de buscar una dependencia entre la actividad biológica y el medio de cultivo. Los hongos biocontroladores mostraron una mejor bioactividad en el medio agar malta. La diferencia entre los medios de cultivo es su disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, esta diferencia entre la composición de nutrientes puede incidir en la producción de esporas por los hongos estudiados (Cazar, 2006).

3.2.2 Bioensayos para evaluar la actividad antagonista de hongos de suelo ante fitopatógenos

El uso de agentes biocontroladores microbianos (ABM) es una de las estrategias más prometedoras para controlar el ataque de fitopatógenos. Actualmente, el número de ABM's registrados y disponibles como productos comerciales incluye cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*. Géneros fungales como *Gliocardium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Cándida* y *Conithyrium* (Vinale, F. et al, 2008).

Ejemplos exitosos de hongos biocontroladores como *trichoderma spp.* Quees habitante común del suelo, existiendo una abundante evidencia que lo confirma como un agente biocontrolador de muchos hongos fitopatógenos, que aparecen en la mayor parte de suelos agrícola. La capacidad de sobrevivencia de este agente depende de la capacidad para producir esporas de resistencia como las clamidosporas, tanto en suelos naturales como en suelos estériles, permitiéndole sobrevivir por largos períodos de stress, también en terrenos donde existen varios residuos de pesticidas.

En ocasiones no siempre hay una relación directa entre la actividad de este biocontrolador in vitro e in vivo.

Adriana Paola Jara Bermeo



Universidad de Cuenca

Chet y Baker (1980), en muchos experimentos encontraron que la mínima cantidad efectiva de *Trichoderma* es alrededor de 1×10^6 u.f.c. /g de suelo, pero esta cantidad depende del tipo de suelo, pH adecuado (5.0), temperatura y condiciones de humedad (Acuña, 2001).

El biocontrolador ideal debe encontrarse bien adaptado tanto al hábitat de la planta como al patógeno, teniendo que sobrevivir prolongadamente y prosperar por un largo tiempo.

Uno de los ejemplos exitosos es el fungicida biológico Trichodex, desarrollado en Chile por el laboratorio AbbotLaboratories de Chile Ltda. y AgrEvo de Chile, se encuentra elaborado en forma de polvo mojable de esporas al 25% su función es preventiva y altamente selectivo. El modo de acción del Trichodex consiste en consumir los nutrientes existentes y que son secretados por los tejidos de la planta, actuando de manera competitiva por los nutrientes y por espacio con el patógeno *Botrytis cinerea* provocando destrucción de los componentes estructurales de este.

3.2.3 Producción de hongos biocontroladores a escala preparativa

En el presente trabajo se valoró la calidad, el tiempo de crecimiento de los hongos biocontroladores mediante diferentes sustratos (arroz, maíz, cascarilla de arroz, maíz pulverizado), se puede utilizar otras técnicas de producción que dependen de las características de los biocontroladores. En algunos trabajos se realiza un pre tratamiento del sustrato en especial de los cereales (trigo, cebada, arroz) lavados previamente para el proceso de producción de biomasa a gran escala.

A escala preparativa, los hongos crecen más lentamente. Esta desventaja puede superarse mediante la selección de sustratos que garanticen una mayor producción y bioactividad de los hongos biocontroladores.

Después de la selección del hongo biocontrolador efectivo, que deberá garantizar características como: disponibilidad a mayor escala posible, las



pruebas de campo, que demuestren una excelente reproductividad del biocontrolador.

Se realizará pruebas para garantizar que no exista interacción con las especies vegetales sanas a utilizarse, la temperatura que tiene los sustratos y su actividad acuosa (*aw*), sin olvidar un factor muy importante que su técnica sea económicamente factible su comercialización.

3.2.4 Identificación de biocontroladores a nivel de género

Existen varias claves de identificación de hongos, una de ellas es “CMI descriptions of pathogenicfungi and bacteria” perteneciente a la Commonwealth Micological Institute, donde se encuentran descritas las especies de hongos entomopatógenos. Esta caracterización se basa en la descripción macroscópica así como microscópica. (Cañedo y Ames, 2004).

También existen técnicas de identificación de hongos mediante un perfil genético para desarrollar un marcador molecular específico del tipo SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) para la caracterización de las especies, para identificar hasta el nivel de especies, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante las herramientas de DNA. (Biopacific, 2010).

En este trabajo de investigación la identificación de los hongos biocontroladores se realizó utilizando claves morfológicas, revisadas en material bibliográfico. Es importante recalcar que el interés de nuevas investigaciones puede llegar a la identificación de especie.

Capítulo 4

Conclusiones y Recomendaciones.

4.1 Conclusiones

El desarrollo de la investigación permitió presentar las siguientes conclusiones:

- Es difícil encontrar el antagonista perfecto a un patógeno en particular, especialmente en condiciones del trópico, por la gran diversidad y actividad biológica de los microorganismos. Una serie de características de los antagonistas como su capacidad competitiva, habilidad para multiplicarse y persistir en condiciones ambientales desfavorables, pueden ser mejoradas con la manipulación.
- Los seis hongos biocontroladores identificados, en este estudio fueron eficaces en el control del microorganismo *Botrytis cinerea*, con diferentes medidas de zonas de inhibición mediante ensayos de antagonismo. Para el patógeno *Alternaria spp* los hongos biocontroladores no resultaron eficaces.
- La cantidad de esporas por mL depende de las características del hongo biocontrolador, y no influye en la medida de la zona de inhibición.
- El crecimiento de los hongos biocontroladores en los diferentes sustratos depende del estado físico en que se encuentre este, la morfología del biocontrolador, y tipo de inóculo empleado (esporas o trozos de medio de cultivo). El sustrato de maíz fue 100% efectivo para el crecimiento de los hongos biocontroladores.
- La viabilidad de los Hongos Biocontroladores en el sustrato de maíz no supera el tiempo del ensayo, debido a factores físicos (deshidratación) y la superficie del soporte utilizado (Erlenmeyer 1000mL).

4.2 Recomendaciones

- Incentivar la continuación esta investigación en diferentes zonas agrícolas de Provincia del Azuay, y extenderlas a nivel regional.
- Esta investigación se realice en diferentes ecosistemas para que se obtenga un mayor número de hongos aislados mediante bioensayos y diferentes sustratos a escala preparativa
- Se sugiere también que se realice la identificación de los biocontroladores en género y especie.



BIBLIOGRAFIA

AGROBIOTECNOLOGIA, (2010). Resistencia a hongos fitopatógenos mediante ingeniería genética, [en línea]. Disponible en www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word.

AGRIOS, G. (1991). Fitopatología. Quinta Edición. Editorial Limusa-Wiley, S.A. de C.V. México, D.F. ISBN 968-18-1466-5. pp. 43, 201-221.

ARENAS ROBERTO., Micología Médica Ilustrada. Editorial, Mcgraw-Hill 3ª Edición. Páginas: 423.

BAKER, R., Elad y and Chet Y. 1987, The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. Phytopatology.

BARBARA, D.J. & Clewes, E. (2003). "Plant pathogenic Verticillium species: how many of them are there?" Molecular Plant Pathology 4(4).297-305. Blackwell Publishing.

BENINTENDE, SILVIA.; SÁNCHEZ, CECILIA. Microorganismos del suelo. Universidad Nacional de Entre Ríos., Facultad de Ciencias Agropecuarias. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/parte_de_unidades_10_y_11_microorganismos_del_suelo.pdf. [Accesado 04 Julio del 2011].

BIOPACIFIC. Disponible en: <http://www.biopacific.cl/investigacion/identificacion-genetica-biocontroladores> [Accesado: 20 Agosto del 2011].

BREVIS, Pedro y Carlos Padilla. (1988). Manual de Microbiología General, Universidad de Talca. pp. 100-102.



BUCHANAN, B., Grisse, W. & Jones, R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. U.S.A.

BURGES, D.H. (1997), Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms and nematodes, UK, Chapman and Hall.

BUTT, T., Copping, L. (2000). Fungal biological control agents. Pesticide Outlook, 11, 186 – 191.

CAMACHO Ferre F. (2008). Tecnicas de Producción en Cultivos Protegidos. Instituto Cajamar. Madrid. Disponible en: <http://www.fundacioncajamar.com/files/publicaciones/10.pdf>. [Accesado 21 julio del 2011].

CAÑEDO Verónica y Teresa Ames. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; pp. 62. Disponible en : <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>. . [Accesado 30 Agosto del 2011].

CARLILE, M., Watkinson, S., Gooday, G. (2001). The Fungi. Elsevier Academic Press. Londres., 588 pp. ISBN 987-9381-19-X. Disponible en: Word Wide Web: www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf.

CARRILLO, Leonor (2003). Los hongos de los Alimentos y Forrajes. Universidad Nacional de Salta-Argentina. ISBN 987-9381-19-X. Disponible en: Word Wide Web: www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/htextocubierta.pdf.

CLARKSON, J.M.; HEALE, J.B. (1985) Pathogenicity and colonization studies on wild-type and auxotrophic isolates of *Verticillium albo-atrum* from hop. Heterokaryon compatibility and genetic recombination within a host plant between hop wilt isolates of *Verticillium albo-atrum*. Plant Pathology 34, 119-128, 129-138. Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Verticillium_albo-atrum/VERTSP_ds.pdf. [Accesado 26 Agosto del 2011].



CIPOTATO. Disponible en: <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>
[Accesado; 28 Julio del 2011].

DÍAZ B. M., LÓPEZ LASTRA C. C., OGGERIN M., FERERES A., RUBIO V. (1998). Identificación de hongos entomopatógenos asociados a pulgones en cultivos hortícolas en la zona centro de la Península Ibérica. Limusa. Mexico-D.F.

DURAN LÓPEZ, MOSQUERA VINTIMILLA. (2007). Actividad Biocontroladora de Hongos de Suelo Sobre Microorganismos Fitopatogenos, Tesis para optar el grado de Biologo. Universidad del Azuay. Capitulo I. pp 5-17. Cuenca- Ecuador.

ENFERMEDADES EN PLANTAS CAUSADAS POR HONGOS, (Junio 2009). Fitomicosis. Disponible en: <http://fungi.blogspot.es/>. [Accesado 28 agosto del 2011].

Esab.upc.edu, disponible en: <http://www.esab.upc.edu/desab/la-delegacio/activitats/1eres-jornades-d2019agroecologia-i-agricultura-ecologica-a-lesab200f/documentacio-addicional>, [Accesado 21 Agosto del 2011].

FBMC, Disponible en:
<http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:IPYS4WuBJ1EJ:www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word/> [Accesado 28 julio del 2011].

FERNÁNDEZ, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. En: Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica.

GRUPO BATLLE S.A (2011). Semillas Batlle. Col repollo. Disponible en: <http://www.semillasbatlle.es/es/col-repollo>. [Revisado 24 Agostodel 2011].

HUDSON, David., MIYAMOTO, Junshi. (1998). Fungicidal Activity.Chemical and Biological Approaches to Plant Protection.PrimeraEdicion.Jhon Wiley & Sons Ltd. England. ISBN 0 471 96806 4 pp. 10-50, 132-160.



JANISIEWICZ, W. y L. Korsten (2002), "Biological control of postharvest diseases of fruits", *Ann. Rev. Phytopathol.*, 40, 411-441.

JAY W. Pscheldt, (2003), *Como diagnosticar y controlar las enfermedades de las plantas*, OregonStateUniversity.

LIGON, J. (2000). Enhancing biocontrol agents. *Pesticide Outlook*. 12, 175 – 176

LISBOA, Mario. (2003). Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en *Vitis vinifera*, Tesis para optar el grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Talca- Chile. pp. 5-13.

MARTÍ SOLÉ M., ALONSO ESPADALÉ R., CONSTANS AUBERT A. (2003). Identificación de hongos.

MARTINEZ, L.B., Pugnaire, F.I. (2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18(2):44-54. disponible en <http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/606.pdf> [Accesado el 28 de mayo de 2011].

MONDINO, P. (2003). Control biológico de enfermedades de plantas. En: *Bases conceptuales para el manejo ecológico de plagas y enfermedades*.

MORRISON, V. A., R. J. Haake, y D. J. Weisdorf. (1993). The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)*. 72:78-89. Disponible en: <http://www.doctorfungus.org/thefungi/chrysosporium.php> [Accesado el 18 de junio de 2011].

NIURKA Ana, Hernández Lauzardo/Silvia Bautista baños/Miguel Velázquez/Annia Hernández (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Disponible en



<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61225109.pdf> [Accesado el 14 de junio de 2011].

ORIETTA Fernández Larrea Vega (2001). Microorganismos antagonistas para el control.

URQUIJO, I. R. SARDIDÑA y G. SANTAOLALLA, Patología vegetal agrícola, 2 ed. Barcelona 1979.

REVISTA CIENCIA, Disponible en:
http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php?option=com_content&task.
[Accesado 08 Agosto del 2011].

RICHARD R. B'ELANGER (2000). D'épartement de Phytologie, Université Laval, Ste. Foy, Québec, Canada G1K 7P9.

RODRÍGUEZ-Echeverria, S. (2009). Organismos del suelo: la dimensión invisible de las invasiones por plantas no nativas. *Ecosistemas* 18(2):32-43. University of Coimbra, CalçadaMartins de Freitas 3001-456 Coimbra, Portugal.

RODRIGUEZ GUZMAN M. PILAR (1998). Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México, Instituto de Fitosanidad de Postgraduados. Montecillos Chapingo. Edo. De México. México.

RODRÍGUEZ, L. (2002). Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* fitopatógeno causante de (Damping off) en plantas de tomate. Simposio Internacional de fitopatógenos de suelos.

SANDOVAL BRIONES CLAUDIO. (2004). Manual técnico manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN OFICINA REGIONAL PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE. Disponible en:
<http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/aup/pdf/integra1.pdf>. [Accesado 15 Julio del 2011].



SAPIENS. Disponible en:

<http://sapiens.ya.com/agronomiaunisar/HONGOS%20BIOCONTROLADORES.htm> [Accesado: 05 Agosto del 2011].

SCHUMANN, G. (1991). Plant diseases: their biology and social impact. The American Phytopathological Society, U.S.A.

SIAFA., CENTRO NACIONAL DE CONDICIONES DE TRABAJO, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, España. Disponible en: <http://www.siafa.com.ar/notas/nota43/hongos.htm>. , [Accesado 09 Agosto del 2011].

SPRINGERLINK. Disponible en:

<http://www.springerlink.com/content/xm0p4hbwh4g0dwya/> [Accesado: 20 Agosto del 2011].

TARIQ M. BUTT, SWANSEA, AND LEONARD G. (2000). FUNGAL BIOLOGICAL CONTROL AGENTS. University of Wales, Copping, a pesticide consultant from Saffron Walden, discuss whether these agents have a future in 2222crop protection. pp. 186-189.

TIMOTHY C. PAULITZ, BELANGER. R.R, (2001). BIOLOGICAL CONTROL IN GREENHOUSE SYSTEMS. en *Revista Annu Rev Phytopathol.* Vol. 39 Septiembre 2001. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701861> [Accesado 15 Agosto del 2011].

TRIPATHI, P., Dubey, N. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology.* 32, 235 – 245

TURRIALBA (1991), Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanzas CATIE, Plagas y enfermedades forestales en América Central disponible en



<http://books.google.com/books?id=85NsFzJhj3cC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false> [Accesado el 20 de mayo de 2011].

URQUIJO, P., RODRIGUEZ, J., SANTAOLALLA, A. (1971). Patología Vegetal Agrícola. Enfermedades de las Plantas. 2da. Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-España. Pp. 366-367.

VAN DER HEIJDEN, MGA; Bardgett, RD; van Straalen, NM. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *ECOLOGY LETTERS*. Amsterdam, Netherlands. 11(3):296-310.

VICTOR RUBIO S., FERERES CASTIEL A. (2006). Cultivos. Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC). Dpto. Protección Vegetal. Serrano 115 Dpto. Madrid. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Feres,%202005.pdf>. :. [Accesado 13 agosto del 2011].

VINALE, F., Sivasithamparam, K., Ghisaberthi, E., Marra, R., Woo, S., Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40, pp. 1 – 10.

YAMAGUCHI, I. (1998). Natural product-derived fungicides as exemplified by the antibiotics, en: Fungicidal activity, chemical and biological approaches to plant protection. David Hutson y Junshi Miyamoto Editores. John Wiley and Sons. pp. 57-59, 76-79.

YEANSI. Tinción de hongos con azul lactofenol. (2011). Disponible en: <http://eniyas999.blogspot.com/2011/02/tincion-de-hongos-con-azul-lactofenol.html>. [Accesado; 17 Julio del 2011].

ZABRISKIE TM, Jackson MD.«Lysine biosynthesis and metabolism in fungi». *Natural Product Reports* 17 (1): pp. 85–97. (2000) disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Fung> [Accesado el 24 de mayo de 2011].



ZENTMYER, G.A. (1983) The world of Phytophthora. In: Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology (Ed. by Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, P.H.), pp. 1-8. American Phytopathological Society, St. Paul, USA.

ZARE, R., and Gams, W. (2001).A revisión of Verticillium sect. IV. The genera Lecanicillium and Simplicillium gen nova. Nova Hedwigia 73:1-50. London.

ANEXOS

ANEXO A

Principales hongos entomopatógenos (Tanada y Kaya, 1993)


Subdivisión	Clase	Orden	Genero
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coelomycidium</i> <i>Myiophagus</i>
	Chytridiomycetes	Blastocladales Lagenidiales	<i>Coelomomyces</i> <i>Lagenidium</i>
	Oomycetes	Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i> <i>Couchia</i>
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales	<i>Sporodiniella</i>
		Entomophthorales	<i>Conidibolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Massospora</i> <i>Meristacrum</i> <i>Neozygites</i>
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastodendrion</i> <i>Metshnikowia</i> <i>Mycodema</i> <i>Saccharomyces</i>
	Plectomycetes	Ascosphaerales	<i>Ascosphaera</i>
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i> <i>Nectria</i> <i>Hypocrella</i> <i>Calonectria</i> <i>Filariomyces</i>
	Loboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Hesperomyces</i> <i>Trenamycetes</i>
	Loculcascomycetes	Myriangiales	<i>Myriangium</i>
	Loculcascomycetes	Pleosporales	<i>Podonectria</i>
	Deuteromycatina	Hyphomycetes	



			<i>Ashersania</i> <i>Aspergillus</i> <i>Boauveria</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Engyodontium</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibellula</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Metarltizium</i> <i>Nomuraeza</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Paraisania</i> <i>Plaurodesmospora</i> <i>Polucephalomuces</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorospora</i> <i>Sporothrix</i> <i>Stibolla</i> <i>Tetranacrium</i> <i>Tibchlidium</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Verticillium</i>
Myceliasterilia			<i>Aegerita</i>
Bosidiomycotina	Phrogmabasidiomycetes	Septobasidiales	<i>Filobasidiella</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i>

Tomado de: <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>


ANEXO B.

Fusarium	
	
Fusarium	
Clasificación científica	
Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Nectriaceae</i>
Género:	<i>Fusarium</i> Link ex Grey, 1821
Especies	

Fusarium aquaeductuum
Fusarium chlamydosporum
Fusarium coeruleum
Fusarium dimerum
Fusarium incarnatum
Fusarium napiforme
Fusarium oxysporum
Fusarium proliferatum
Fusarium sacchari
Fusarium solani
Fusarium sporotrichoides
Fusarium sub glutinans
Fusarium tabacinum
Fusarium verticillioides


Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Fusarium>

ANEXO C.

Cultivo en placa de <i>Verticillium</i>	
	
Clasificación científica	
Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	<i>Ascomycota</i> (<i>AnamorphicHypocreales</i>)
Clase:	<i>Incertaesedis</i>
Familia:	<i>Plectosphaerellaceae</i>
Género:	<i>Verticillium</i> <i>Nees</i>
Especie tipo	
<i>Verticillium</i>	
SynonymsSinónimos	
<i>Verticillumdahliae</i> var.	
<i>Verticillum albo- atrum</i>	

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Verticillium>


ANEXO D.

<p><i>Phialophora</i></p> 	
<p>ScientificclassificationClasificación científica</p>	
Reino:	<i>Fungi</i> Hongos
Filo:	<i>Ascomycota</i> Ascomycota
Clase:	<i>Dothideomycetes</i> Dothideomycetes
Orden:	<i>Chaetothyriales</i> Chaetothyriales
Familia:	<i>Herpotrichiellaceae</i> Herpotrichiellaceae
Género:	<i>Phialophora</i> Phialophora Níspero, 1915
<p>Especies</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. americana</i> • <i>P. bubakii</i> • <i>P. europaea</i> • <i>P. parasitica</i> • <i>P. reptans</i> • <i>P. repens</i> • <i>P. richardsiae</i> • <i>P. verrucosa</i> 	

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Phialophora>




ANEXO E.

<i>Acremonium</i>	
	
Placa de cultivo de <i>Acremonium falciforme</i>	
ScientificclassificationClasificación científica	
Reino:	<i>FungiHongos</i>
Filo:	<i>AscomycotaAscomycota</i>
Orden:	<i>HypocrealesHypocreales</i>
Familia:	<i>HypocreaceaeHypocreaceae</i>
Género:	<i>Acremonium</i>
TypespeciesEspecie tipo	
<i>Acremoniumalternatum</i>	
SynonymsSinónimos	
<i>Cephalosporium</i>	


Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Acremonium>

ANEXO F.

<i>Chrysosporium spp.</i>	
	
Placa de cultivo de Chrysosporium	
ScientificclassificationClasificación científica	
Reino:	<i>FungiHongos</i>
Filo:	<i>AscomycotaAscomycota</i>
Orden:	<i>EuascomycetesEuascomycetes</i>
Familia:	<i>OnygenalesOnygenaceae</i>
Género:	<i>Chrysosporium Chrysosporium</i>
TypespeciesEspecie tipo	
<i>Chrysosporium spp.</i>	

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Chrysosporium>

ANEXO G.

<i>Oidiodrendon spp.</i>	
	
Placa de cultivo de <i>Oidiodrendon</i>	
Scientific classification / Clasificación científica	
Reino:	<i>Fungi</i> / Hongos
Filo:	<i>Ascomycota</i> / Ascomycota
Orden:	<i>Onygenales</i>
Familia:	<i>Myxotrichaceae</i>
Género:	<i>Oidiodrendon</i>
Type species / Especie tipo	
Especies <i>Oidiodrendon ambiguum</i> <i>Oidiodrendon cereale</i> <i>Oidiodrendon chlamydosporicum</i> <i>Oidiodrendon chlamydosporum</i> <i>Oidiodrendon citrinum</i> <i>Oidiodrendon echinulatum</i> <i>Oidiodrendon enchinulatum</i>	

Oidiodendron flavum

Oidiodendron fuscum

Oidiodendron gracile

Oidiodendron griseum

Oidiodendron hughesii

Oidiodendron kalrae

Oidiodendron kalrai

Oidiodendron maius

Oidiodendron myxotrichoides

Oidiodendron nigrum

Oidiodendron periconioides

Oidiodendron pilicola

Oidiodendron rhodogenum

Oidiodendron robustum

Oidiodendron scytaloides

Oidiodendron setiferum

Oidiodendron sulphureum

Oidiodendron tenuissimum

Oidiodendron terrestre





Oidiodendron truncatum

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Oidiodendron>






ANEXO H.




Cuadro de las Principales enfermedades en Plantas Vegetales y Ornamentales

Nombre	Agente causal	Planta que afecta	Lugar que afecta	Características – Síntomas	Fotografía
<u>Abolladura o “Lepra”</u>		melocotonero (durazno)	Hojas	Mayor grosor, hinchamiento de color inicial claro, luego rojizo. También aspecto quebradizo con recubrimiento de polvo blanco	 <p>Tomado de: http://www.plagasplantas.com/es/plagas/alternaria_tizon.htm</p>
<u>Allagas</u>	por insectos y otros artrópodos, nemátodos, hongos o bacterias	Eucaliptus	Hojas	Se trata de una respuesta del vegetal a la presencia del parasito, son un crecimiento anómalo.	 <p>Tomado de: http://www.plagasplantas.com/es/plagas/alternaria_tizon.htm</p>
Alternaria o “Tizon”	Alternaria solani	cultivos de papa	afectar al follaje	Las hojas presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienen la tienen anillos concéntricos de color oscuro.	 <p>Tomado de: http://www.plagasplantas.com/es/plagas/alternaria_tizon.html</p>
Antracnosis	hongo que puede ser generalmente el olletotrichum o el Gloeosporium	varias plantas desde árboles hasta hierba.	hojas, tallos, frutos o flores	manchas hundidas de diversos colores	






					Tomado de: http://articulos.infojardin.com/PLAGAS_Y_ENF/Enfermedades/antracnosis.htm
Botrytis o "Moho Gris"	Hongo Botrytis	Frutas, vegetales	tallos, hojas, flores y capullos	manchas se van cubriendo de pelusilla grisácea	 Tomado de: http://articulos.infojardin.com/PLAGAS_Y_ENF/Enfermedades/antracnosis.htm
<u>Cribado o Perdigonada y Gomosis</u>	Cribado o Perdigonada hongo <i>StigmiaCarpophila</i> Gomosis Hongo género: Phytophthora. 2 especies: citroptora, parasítica	Frutas drupáceas	hojas	Manchas redondas violáceas, que se vuelven claras y se transforma en un agujero provocando necrosis	 http://articulos.infojardin.com/PLAGAS_Y_ENF/Enfermedades/antracnosis.htm
<u>Chancro</u>		Arboles	Tronco de arbole	Provoca una mancha en el tronco, ramas o renuevos, los cuales provocan un anillamiento impidiendo así la circulación de la savia, dando como resultado la muerte de brotes o ramas por encima de la lesión,	 http://articulos.infojardin.com/PLAGAS_Y_ENF/Enfermedades/antracnosis.htm






<p><u>Esclerotinia</u></p>		<p>común verlo en vegetales de hoja blanda como la lechuga</p>	<p>tallos, hojas y frutos hasta 1,5 m. de altura del suelo.</p>	<p>Se observa un micelio blanco algodonoso</p>	 <p>Tomado de: http://www.elhogarnatural.com/Enfermedades.htm</p>
<p><u>Fusariosis</u></p>	<p>Hongo fusarium</p>	<p>granos de la espiga del maíz, trigo, cebada</p>	<p>que atacan las raicillas, produciendo amarilleo y marchitez de hojas</p>	<p>Putrefacción negra de progreso lento</p>	 <p>Tomado de: http://www.elhogarnatural.com/Enfermedades.htm</p>
<p><u>Mal del Plomo</u></p>	<p>Hongo</p>	<p>Ataca en especial al melocotonero y ciruelo.</p>	<p>El limbo se encrespa y marchita y la planta pierde vigor</p>	<p>deja el follaje de color plomizo</p>	 <p>Tomado de: http://www.elhogarnatural.com/Enfermedades.htm</p>






<p><u>Moteado y Manchas Foliare</u></p>	<p>no siempre es por parásitos, a veces la luz solar quema las hojas</p>	<p>Plantas en general</p>	<p>hojas</p>	<p>presencia de manchas</p>	 <p>Tomado de: http://www.caes.uga.edu/publications/pubDetail.cfm?pk_ID=7322</p>
<p><u>Mildiu</u></p>	<p>Hongo</p>	<p>Plantas solanáceas</p>	<p>Frutos y hojas</p>	<p>En la parte inferior de las hojas una pelusa blanco-grisácea y en la superior manchas amarillas, grandes y oscuras. En los frutos pequeños produce manchas grisáceas y marcescentes.</p>	 <p>Tomado de: http://www.radioazul.es/noticias/2011/06/02/las-ultimas-tormentas-favorecen-la-aparicion-de-mildiu-en-vinedos-de-las-pedroneras-socuellamos-o-las-mesas/</p>
<p><u>Negrita, Fumagina o Tizne</u></p>		<p>Planta</p>	<p>hojas</p>	<p>Primero empiezan los pulgones, cochinillas o mosca blanca cuando pican para chupar la savia. Contra esta agresión la planta actúa, desarrolla hongos saprófitos que pueden llegar a acabar con la planta.</p>	 <p>Tomado de: http://www.semillasdelgado.com/departamentos/lenoso/olivo/plagas-y-enfermedades-del-olivar/</p>



<p><u>Oidio o "Mal Blanco"</u></p>		<p>plantas ornamentales,</p>	<p>tallos, hojas, flores y frutos</p>	<p>forman sobre un tapiz blanquecino de aspecto algodonoso o pulverulento y que aparecen como manchas blancas, a la larga la planta empieza a amarillear y muere.</p>	 <p>Tomado de: http://jardinplantas.com/category/plagas/page/4/</p>
<p><u>Podredumbre de Raíz</u></p>	<p>Varios hongos</p>	<p>atacan a las plántulas de semilleros o a adultas</p>	<p>Hojas, raíces, y base del tallo</p>	<p>lesiones en la raíz y otros tejidos, que parecen licuarse, hojas que se marchitan.</p>	 <p>Tomado de: http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-enfermedades/phytophthora-sojae-01.htm</p>
<p><u>Repilo</u></p>		<p>Hojas de olivo</p>	<p>hojas</p>	<p>manifiestas con manchas circulares de variable tamaño y color oscuro, que luego tiende a ser amarillentas, la lesión puede tomar un color blanquecino.</p>	 <p>Tomado de http://www.redes-cepalcaia.org/olivaryescuela/materiales/diapositivas/diapositiva.htm</p>



<p><u>Roya</u></p>		<p>Geranio, clavel, crisantemo, rosal.</p>	<p>ataca principalmente a las partes verdes de la planta,</p>	<p>presencia de manchas de color pardo claro hasta oscuro</p>	 <p>Tomado de http://www.redes-cepalcala.org/olivaryescuela/materiales/diapositivas/diapoplaga.htm</p>
<p><u>Septoriosis</u></p>		<p>plantas ornamentales como crisantemo, margaritas, incluso en las hortalizas especialmente el apio</p>	<p>Hojas, y tallos</p>	<p>Se presenta manchas pardo-negras en sus hojas lo que ocasiona reblandecimiento de los tejidos, también afecta a los tallos y a los brotes tiernos.</p>	 <p>Tomado de http://www.elhogarnatural.com/Enfermedades.htm</p>
<p><u>Verticilosis</u></p>		<p>la vid, girasol y frambuesa</p>	<p>hojas</p>	<p>marchitamiento de los brotes, como también de las hojas</p>	 <p>Tomado de http://www.elhogarnatural.com/Enfermedades.htm</p>



ANEXO I.

MAPA ELEVACIONES CANTÓN CUENCA

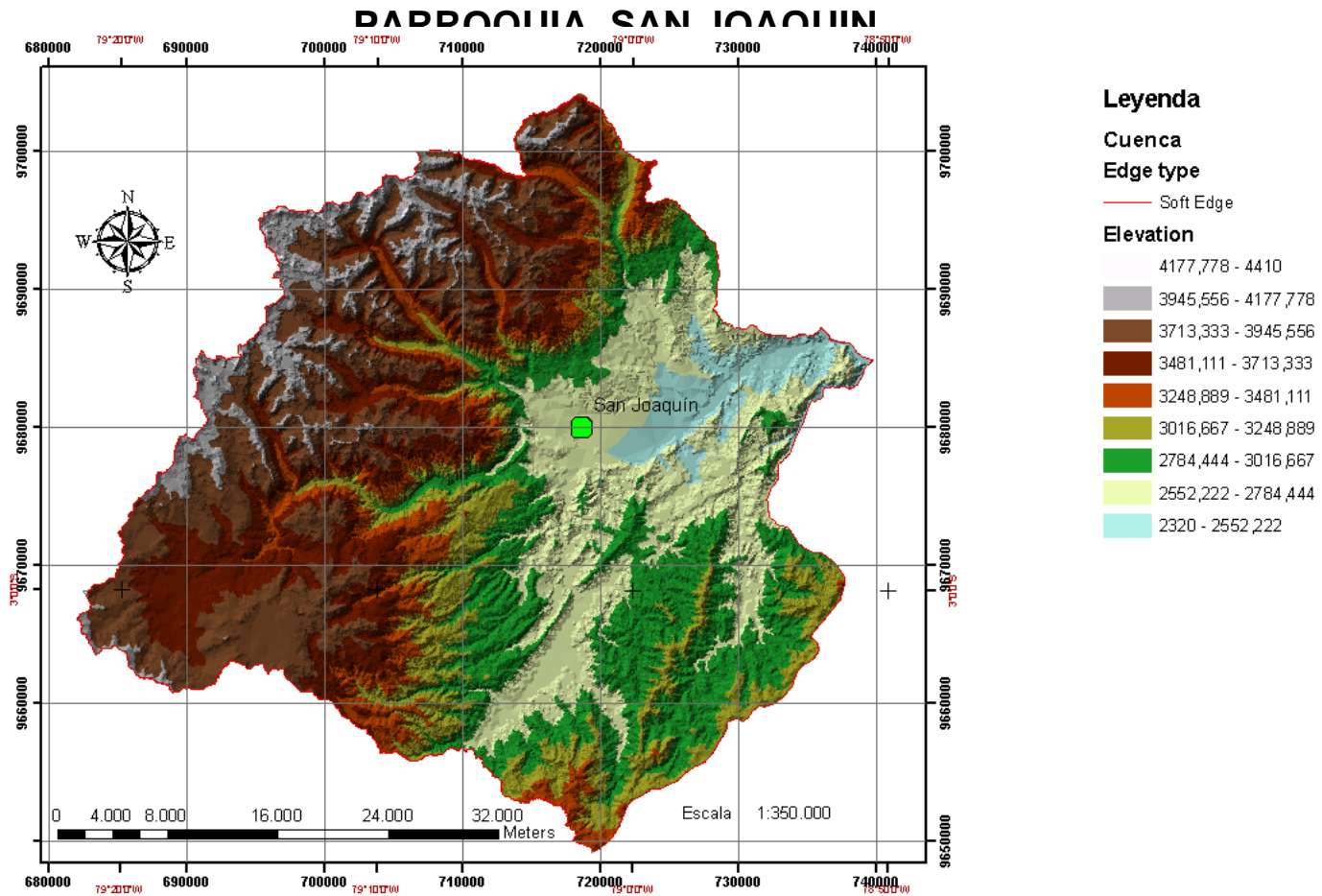


Figura No. mapa de elevaciones del Cantón Cuenca, parroquia San Joaquín. IERSE, Escuela de Biología, Ecología y Gestión, Universidad del Azuay, **Fecha:** 12 de septiembre 2011.



ANEXO J. MAPA CANTÓN CUENCA LOCALIDAD SAN JOAQUIN

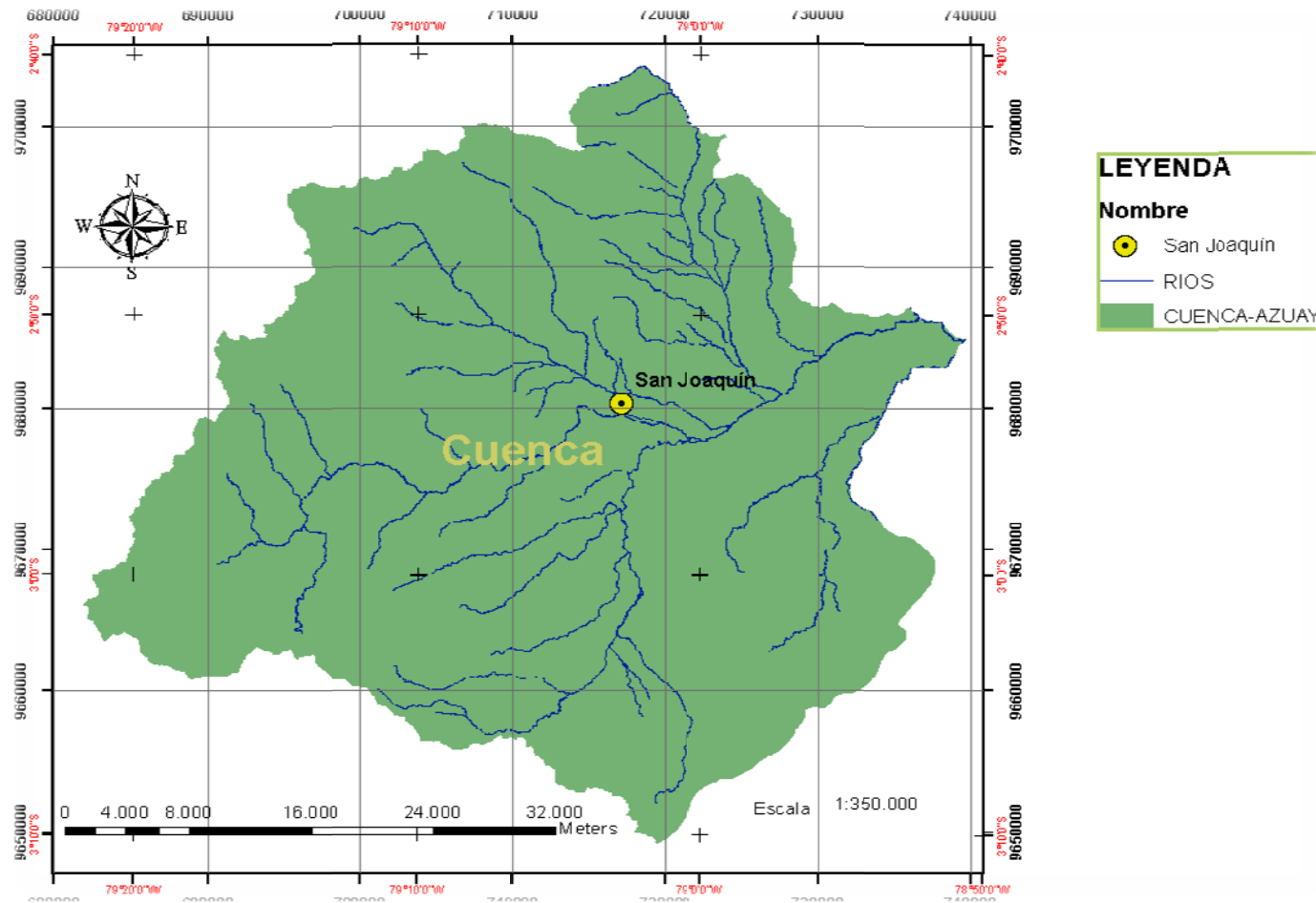


Figura No. Mapa del Cantón Cuenca, parroquia San Joaquín. IERSE, Escuela de Biología, Ecología y Gestión, Universidad del Azuay, **Fecha:** 12 de septiembre 2011.



MAPA USOS SUELOS CANTÓN CUENCA

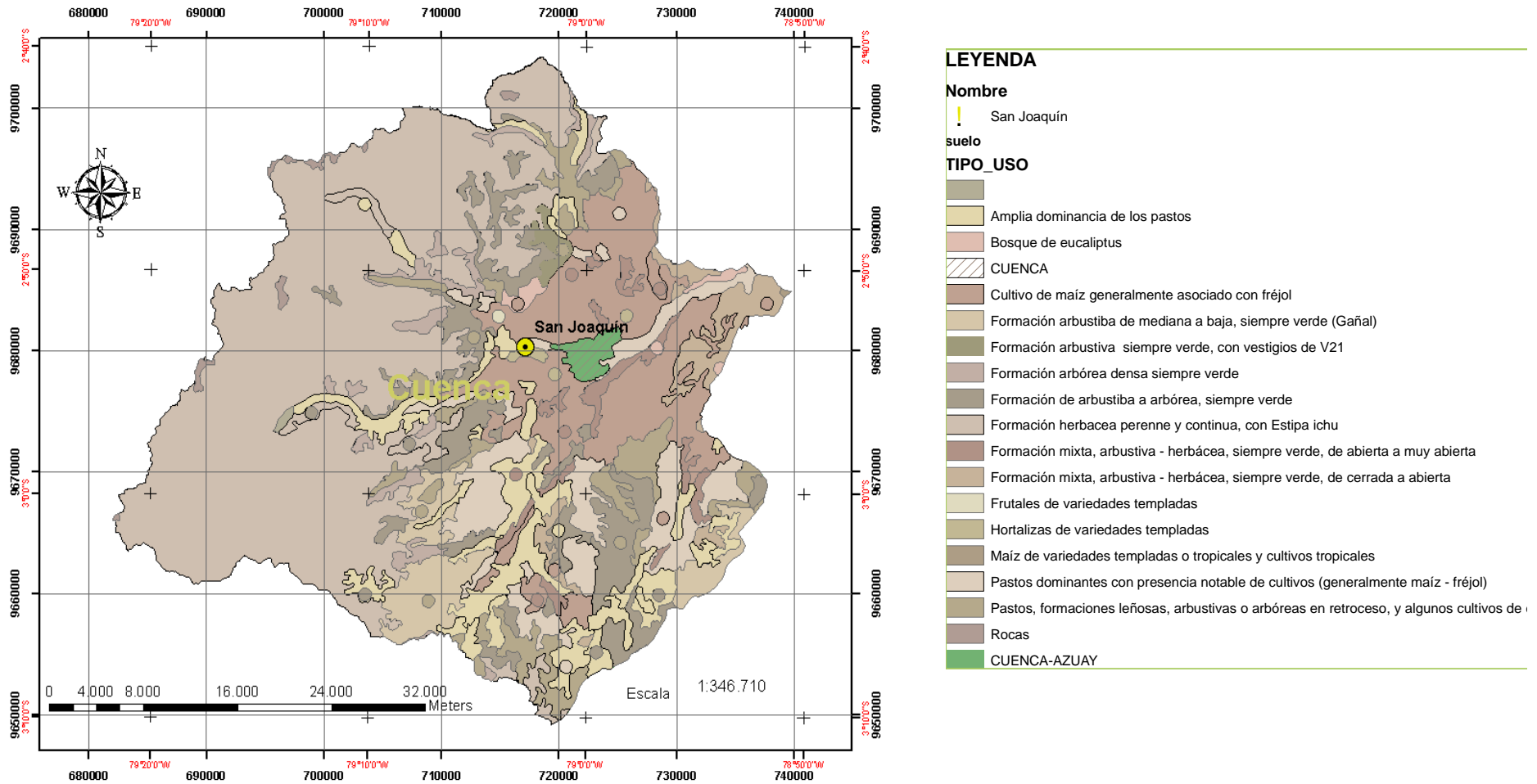


Figura No. Mapa de usos Suelos Cantón Cuenca, parroquia San Joaquín. IERSE, Escuela de Biología, Ecología y Gestión, Adriana Paola Jara Bermeo Universidad del Azuay, **Fecha:** 12 de septiembre 2011.



ANEXO L.

MUESTRAS RECOLECTADAS:

LUGAR DE MUESTREO	CARACTERÍSTICAS DEL SUELO	NUMERO DE MUESTRAS
Parroquia San Joaquín, Cuenca/Azuay, Ecuador	Terreno de aptitud agrícola.	25

CODIGO DILUCION	CODIGO HONGO	PROCEDENCIA	USO SUELO	Localización	Datum	Coordenadas UTM
Muestra 3 10 ⁻²	A1	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889364 7906206
Muestra 3 10 ⁻²	A2	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889364 7906206
Muestra 3 10 ⁻²	A3	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889364 7906206
Muestra 3 10 ⁻³	A4	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889364 7906206
Muestra 3	A5	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889364 7906206



10 ⁻³				Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.		
Muestra 3 10 ⁻³	A6	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889364 7906206
Muestra 1 10 ⁻⁴	A7	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1 10 ⁻⁴	A8	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 2 10 ⁻²	A9	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 891175 79057677
Muestra 2 10 ⁻²	A10	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 891175 79057677
Muestra 1 10 ⁻³	A11	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1 10 ⁻³	A12	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1	A13	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia	WGS84 GPS MAGELLAN	02S 895043 79054475



10 ⁻³				orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	eXplorist 510	
Muestra 1 10 ⁻³	A14	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1 10 ⁻²	A15	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1 10 ⁻²	A16	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1 10 ⁻²	A17	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 1 10 ⁻²	A18	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 895043 79054475
Muestra 2 10 ⁻³	A19	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 891175 79057677
Muestra 2 10 ⁻³	A20	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 891175 79057677



Muestra 5 10 ⁻⁵	A21	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 890998 79060021
Muestra 6 10 ⁻⁴	A22	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889981 7906008
Muestra 5 10 ⁻⁵	A23	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 890998 79060021
Muestra 6 10 ⁻⁵	A24	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889981 7906008
Muestra 6 10 ⁻²	A25	SAN JOAQUÍN	AGRICOLA	San Joaquín: Los suelos son de color pardo - negruzco. Son ricos en materia orgánica, debido a la vegetación. Vegetación: Agrupaciones vegetales primarias. Con extensas superficies de uso agrícola y pastizales.	WGS84 GPS MAGELLAN eXplorist 510	02S 889981 7906008