Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

"Evaluación in vitro del hongo *Trichoderma spp.* como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis ocasionada por el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en granadilla *Passiflora ligularis*"

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO AGROPECUARIO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Línea 4. Gestión Sostenible y Aprovechamiento de los Recursos Naturales.

SUBLINEA: Desarrollo y sostenibilidad

AUTOR: Anderson Alexis Fuertes Chamorro

ASESOR: MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

Ibarra, 03 de octubre de 2022

Ibarra, 03 de octubre de 2022

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigente en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



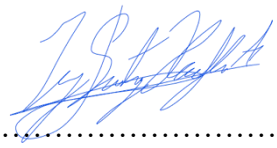
(f)……

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):



(f)……

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 1002658399



(f)……

MSc. Lennys Berutti

C.C.: 1757289986



(f)……

MSc. Edwin Fernando Del Pozo Villacís

C.C.: 1001756566

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo ANDERSON ALEXIS FUERTES CHAMORRO, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 de Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: "Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derecho de disponer de sus derechos o autorizar de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia".

Ibarra, 03 de octubre del 2022



f): …….

ANDERSON ALEXIS FUERTES CHAMORRO

C.C.: 1003856521

AUTORÍA

Yo, ANDERSON ALEXIS FUERTES CHAMORRO, portador de la cédula de ciudadanía N° 1003856521, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o accione legales.



f): …….

ANDERSON ALEXIS FUERTES CHAMORRO

C.C.: 1003856521

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, ANDERSON ALEXIS FUERTES CHAMORRO, con C.C.: 1003856521, autor del trabajo de grado intitulado: EVALUACIÓN IN VITRO DEL HONGO *Trichoderma spp.* COMO POTENCIAL ANTAGONISTA EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD ANTRACNOSIS OCASIONADA POR EL FITOPATÓGENO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. EN GRANADILLA *Passiflora ligularis* previo a la obtención del título profesional de Ingeniería Agropecuaria, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontifica Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 03 de octubre del 2022



f): …….

ANDERSON ALEXIS FUERTES CHAMORRO

C.C.: 1003856521

DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación de Proyecto de Titulación: EVALUACIÓN IN VITRO DEL HONGO *Trichoderma spp.* COMO POTENCIAL ANTAGONISTA EN EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD ANTRACNOSIS OCASIONADA POR EL FITOPATÓGENO *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. EN GRANADILLA *Passiflora ligularis,* lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 03 de octubre de 2022

Para constancia firma:



f): ……

Anderson Alexis Fuertes Chamorro
Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación
C.C/ Pasaporte: 1003856521
Carrera: Ingeniería Agropecuaria

Ibarra, 03 de octubre del 2022

DEDICATORIA

Este proyecto de tesis va dedicado a mi madre, Amparo Gimena Chamorro quien me ha dado todo y ha sido mi inspiración para salir adelante, gracias a su fortaleza, carisma y fe he logrado alcanzar este objetivo en mi vida. También a mi padre, Remigio Fuertes, quien ha sido un pilar fundamental en mi crecimiento personal y profesional.

A mi hermana, Kendra Fuertes, que es mi luz, mi motor y ha sido testigo de mis triunfos, pero también de mis derrotas y a pesar de todo ha estado ahí para apoyarme.

De igual manera, a Daniela Ortega Armas, quien con su inmenso amor ha hecho posible que este sueño se cumpla, por darme sus consejos, sus fuerzas y acompañarme en los momentos más duros de mi vida.

Anderson Alexis Fuertes Chamorro

AGRADECIMIENTO

En este objetivo cumplido en mi vida personal y profesional, quiero agradecer a Dios por darme las fuerzas para superar los problemas que se han presentado a lo largo de mi vida y por bendecirme en cada momento. También por darme el mejor ángel, mi madre, que me ha ayudado a superar cada conflicto, gracias a su amor, sus fuerzas y su entrega.

Al Msc. Santiago Mafla Andrade, asesor de mi trabajo de titulación, por dedicarme su tiempo, apoyarme y enseñarme, con su experiencia, a superar los inconvenientes que se presentaron en la investigación y tener unos resultados de calidad.

A mis lectores, por aportar con su granito de arena en base a su experiencia, para que este proyecto termine de la mejor manera y sea un aporte para el sector agrícola del país.

A mis docentes, que me han impartido sus criterios a lo largo de mi carrera estudiantil, desde el primer día, enfocándose siempre en compartir sus conocimientos, sin egoísmos para formar profesionales y personas de bien.

Anderson Alexis Fuertes Chamorro

ÍNDICE

RESUMEN 15
ABSTRACT 16
CAPÍTULO I 17
INTRODUCCIÓN 17
CAPÍTULO II 19
OBJETIVOS 19
2.1. Objetivo general 19
2.2. Objetivos específicos 19
2.3. Hipótesis 19
CAPÍTULO III 20
ESTADO DEL ARTE 20
3.1. *Passiflora ligularis* (granadilla) 20
3.1.1. Generalidades 20
3.1.2. Valor nutricional 20
3.1.3. Relevancia económica en Ecuador 21
3.2. Antracnosis 22
3.2.1 Agente causal 22
3.2.2 Proceso infeccioso de la enfermedad 23
3.2.3 Sintomatología 24
3.3. Control de la enfermedad 25
3.3.1 Control químico 25
3.3.2. Control biológico 25
3.4. Métodos de control biológico con *Trichoderma spp.* 26
3.4.1. *Trichoderma spp.* como controlador en antracnosis 26
3.4.2. Pruebas de antagonismo 26
CAPÍTULO IV 28
MATERIALES Y MÉTODOS 28
4.1. Materiales, equipos e insumos 28

4.1.1 Insumos 28
4.1.2 Equipos 28
4.1.3 Reactivos 29
4.2. Generalidades 29
4.2.1. Ubicación del área de estudio 29
4.2.2. Unidad experimental 30
4.2.3. Tratamientos 30
4.2.4. Diseño experimental 30
4.3. Preparación de la investigación 31
4.3.1 Identificación de muestras 31
4.3.2 Recolección de muestras 31
4.4. Caracterización del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* Penz en plantas infectadas mediante secuenciación molecular 32
4.4.1 Aislamiento del patógeno *C. gloeosporioides* Penz 32
4.4.2 Purificación de la muestra 32
4.4.3 Extracción de ADN 32
4.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 33
4.5. Análisis de la acción antimicrobiana de diferentes dosis de *Trichoderma spp* a través de pruebas en laboratorio 33
4.5.1. Crecimiento de colonias puras de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz 33
4.5.2. Aislamiento y crecimiento de colonias puras de *Trichoderma spp.* 33
4.5.3. Preparación de las dosis del antagonista 34
4.5.4. Dosis del control químico 35
4.5.5. Análisis de la acción antimicrobiana 35
4.6. Determinación de la mejor dosis de *Trichoderma spp.* en hojas con síntomas de antracnosis mediante pruebas en cámaras húmedas 36
4.6.1. Descripción de tratamientos usados en las cámaras húmedas 36
4.6.2. Elaboración de cámaras húmedas 37
4.6.3. Evaluación de las mejores dosis 37
CAPÍTULO V 38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 38
5.1. Pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza 38
5.2. Caracterización del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* Penz en plantas infectadas 39

5.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica 39
5.2.2 Caracterización molecular 41
5.3. Análisis de la acción antimicrobiana de diferentes dosis de *Trichoderma spp.* a través de pruebas en laboratorio. 42
5.3.1 Crecimiento micelial del fitopatógeno (cm) 42
5.4 Determinación de la mejor dosis de *Trichoderma spp.* en hojas con síntomas de antracnosis mediante pruebas en cámaras húmedas 45
5.4.1 Crecimiento diametral de la lesión en la zona infectada 45
CAPÍTULO VI 49
CONCLUSIONES 49
CAPÍTULO VII 50
RECOMENDACIONES 50
CAPÍTULO VIII 51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Contenidos nutricionales de la granadilla 21

Tabla 2 Descripción de tratamientos 30

Tabla 3 Tratamientos de cámaras húmedas 37

Tabla 4 Prueba de normalidad Shapiro Wilk y homogeneidad Bartlett test de las variables evaluadas 38

Tabla 5 Análisis de la muestra ensamblada de acuerdo a la caracterización molecular 42

Tabla 6 Crecimiento del patógeno en la evaluación in vitro del hongo *Trichoderma spp.* como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis 42

Tabla 7 Análisis de varianza para el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* Penz en la evaluación in vitro del hongo *Trichoderma* spp. como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis 43

Tabla 8 Crecimiento diametral de la lesión en hojas infectadas por *C. gloeosporioides* Penz. 45

Tabla 9 Relación de crecimiento de la infección al día 0 y 10 46

Tabla 10 Análisis de varianza para el crecimiento diametral de la lesión en la determinación de la mejor dosis en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ubicación de los laboratorios en la sede universitaria 29

Figura 2 Distribución de tratamientos 31

Figura 3 Cámara de Neubauer 34

Figura 4 Cuadros de conteo de esporas 35

Figura 5 Esquema de la técnica de cultivos duales..... 36

Figura 6 Cepa aislada con características similares para *Colletotrichum gloeosporioides* Penz 40

Figura 7 Cepa con características similares para *Colletotricum gloeosporioides* Penz purificada 40

Figura 8 Apresorios miceliales del fitopatógeno 41

Figura 9 Rangos para el crecimiento micelial del patógeno (cm) por tratamiento en la evaluación in vitro del hongo *Trichoderma* spp. como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis..... 44

Figura 10 Rangos para el crecimiento diametral (cm) de la lesión de la zona infectada por tratamiento en la determinación de la mejor dosis en el control de la enfermedad antracnosis 47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Recolección de hojas con síntomas de antracnosis 58

Anexo 2 Siembra de la zona infectada en plato petri con medio de cultivo 58

Anexo 3 Crecimiento del aislamiento de la zona infectada por *C. gloeosporioides* Penz..... 59

Anexo 4 Crecimiento de la muestra purificada del fitopatógeno 59

Anexo 5 Siembra de *C. gloeosporioides* Penz en caldo nutritivo..... 60

Anexo 6 Extracción de ADN del patógeno 60

Anexo 7 Amplificación de la secuencia del primer ITS 1 61

Anexo 8 Amplificación de la secuencia del primer ITS 4 61

Anexo 9 Cepa de *Trichoderma* spp. y crecimiento en caldo nutritivo 62

Anexo 10 Conteo de esporas del antagonista 62

Anexo 11 Dosis del control químico 63

Anexo 12 Medición del crecimiento micelial del patógeno 63

Anexo 13 Relación de crecimiento de la lesión (cm) en cámaras húmedas 64

Anexo 14 Tabla de crecimiento en la técnica de cultivos duales 64

Anexo 15 Tabla de crecimiento de la lesión en cámaras húmedas..... *65*

RESUMEN

A nivel mundial los alimentos que se producen son cada vez más perjudiciales para la salud humana debido al alto contenido de residuos químicos que contienen. Uno de los principales problemas es el uso excesivo e inadecuado de insumos agrícolas para controlar enfermedades fúngicas en el cultivo de granadilla *Passiflora ligularis* J. Además de un bajo conocimiento sobre manejo integrado de plagas por parte de los productores. Es por esto que una de las alternativas para reducir el uso de fungicidas como Mancozeb, para manejo de antracnosis, es el control biológico que disminuye los residuos químicos en la fruta. *Trichoderma* spp. es un excelente controlador biológico de algunos patógenos, como *Fusarium oxysporum, Botrytis cinérea, Phytophthora infestans,* que ocasionan pérdidas en las producciones y disminuyen los rendimientos. El principal objetivo del presente estudio fue evaluar in vitro el hongo *Trichoderma spp.* como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis ocasionada por el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* Penz en granadilla. La investigación se realizó en los laboratorios de la PUCE-SI, cantón Ibarra, provincia de Imbabura y se utilizó un diseño completamente al azar con tres dosis de *Trichoderma spp* ($1x10^3$, $1x10^5$, $1x10^7$ ufc/ml) y un testigo a base de Mancozeb con tres repeticiones. Se utilizó la técnica de cultivos duales en donde se obtuvo el mejor control del patógeno con la dosis de $1x10^7$ ufc/ml. Además, las dos mejores dosis se evaluaron en cámaras húmedas con hojas infectadas midiendo el crecimiento diametral de la lesión obteniendo el mejor resultado con $1x10^7$ ufc/ml de *Trichoderma spp.* Por esta razón el antagonista en estudio resulta una alternativa de control a la enfermedad antracnosis en granadilla aportando a la producción sana de productos agrícolas y al cuidado del medio ambiente.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Passiflora ligularis,* control biológico, control químico, *Colletotrichum gloeosporioides*

ABSTRACT

Globally, the foods that are produced are increasingly harmful to human health due to the high content of chemical residues they contain. One of the main problems is the excessive and inappropriate use of agricultural inputs to control fungal diseases in passion fruit cultivation *Passiflora ligularis* P., in addition to low knowledge on integrated management of pests and diseases by producers. This is why one of the alternatives to reduce the use of chemical fungicides such as Mancozeb, for anthracnose management, is biological control that reduces chemical residues in the fruit. *Trichoderma spp* is an excellent biological controller of some pathogens, such as *Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea, Phytophthora infestans*, which cause production losses and decrease yields. The main objective of this study was to evaluate in vitro the fungus *Trichoderma* spp as a potential antagonist in the control of anthracnose disease caused by the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz in granadilla. The research was carried out in the laboratories of PUCE-SI, Ibarra canton, Imbabura province, and a completely randomized design was used with three doses of *Trichoderma* spp ($1x10^3$, $1x10^5$, $1x10^7$ spores/ml) and a control based on Mancozeb with three repetitions in each treatment. The dual culture technique was used, where the best control of the pathogen was obtained with a dose of $1x10^7$ ufc/ml. In addition, the two best doses were evaluated in humid chambers with infected leaves, measuring the diametral growth of the lesion, obtaining the best result with $1x10^7$ spores/ml of *Trichoderma spp*. For this reason, the antagonist under study is an alternative to control the anthracnose disease in passion fruit, contributing to the healthy production of agricultural products and the care of the environment.

Keywords: *Trichoderma*, *Passiflora ligularis,* biologic control, chemical control, *Colletotrichum gloeosporioides*

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los países productores de granadilla en el continente americano son: México, Bolivia, Perú, Ecuador y el mayor exportador Colombia. El principal lugar de destino de esta fruta es Europa, debido al interés que existe en este mercado por su elevado contenido de vitamina C, su potencial para preparar mermeladas, jarabes; y aportar en el cuidado de patologías crónicas, según lo mencionado por López et al., (2012).

Este cultivo en Ecuador representa un rubro importante para la economía de pequeños y medianos productores. Esta fruta posee una gran adaptabilidad a los diferentes climas y tiene alto contenido nutritivo. Presenta una gran aceptación en la región para ser consumida en fresco, y también se usan las hojas y frutos en la farmacología, según Brito et al., (2008).

Carvajal et al., (2014) afirman que en Europa el mercado es estricto en relación a estándares de calidad algo que no cumplen los principales exportadores de la granadilla. Esto es debido a que el control de plagas y enfermedades es deficiente y los fitosanitarios que se utilizan tienen un efecto negativo sobre el medio ambiente. Una de las enfermedades de mayor perjuicio en la producción es la antracnosis.

La antracnosis es una enfermedad fúngica problemática para los productores, debido a su alta agresividad, ocasionando afectaciones en las partes vegetativas y sobre todo provocando disminución en los rendimientos de producción. Es ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, el cual ataca principalmente a hojas, tallos y frutos, ocasionando daños en las etapas de producción, cosecha y post cosecha, lo que perjudica la comercialización y por ende la economía del productor (Vaca, 2018).

El control químico es el que realizan mayoritariamente los productores para disminuir las afectaciones en campo por el ataque de este hongo. Sin embargo, el inadecuado uso de los productos fitosanitarios genera resistencia en los fitopatógenos, y las dosis de los insumos agrícolas deben ser cada vez mayores para lograr un resultado, dejando un elevado contenido

de residuos lo que los convierte en perjudiciales para la salud humana y para el medio ambiente. Debido a esto es importante buscar alternativas de control para esta enfermedad que afecta a la granadilla (Izquierdo, 2017).

Entre las alternativas de control a enfermedades ocasionadas por hongos se encuentra el control biológico, basado en bacterias u hongos benéficos, como la *Trichoderma spp*. La finalidad de estos antagónicos es inhibir el desarrollo de los patógenos. Esta manera de realizar controles de plagas y enfermedades en los cultivos resulta importante, ya que es amigable con el medio ambiente, sus sistemas y sobre todo aporta en salvaguardar la salud de los consumidores.

El presente documento muestra en el capítulo de Estado del Arte, información sobre el manejo de cultivo de granadilla, sus fitopatógenos y hongos antagónicos. En el capítulo de materiales y métodos se presentan los insumos requeridos en la investigación. En el capítulo de resultados y discusión, se presentan los principales hallazgos obtenidos en el estudio. Y finalmente, se muestran las conclusiones y recomendaciones para el control de la antracnosis.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar in vitro el hongo *Trichoderma spp.* como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis ocasionada por el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en granadilla *Passiflora ligularis*

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el hongo *Colletotrichum gloeosporoides* Penz. en plantas infectadas mediante secuenciación molecular.
- Analizar la acción antimicrobiana de diferentes dosis de *Trichoderma spp.* a través de pruebas en laboratorio.
- Determinar la mejor dosis de *Trichoderma spp.* en hojas con síntomas de antracnosis mediante pruebas en cámaras húmedas.

2.3. Hipótesis

H0= Ninguna dosis de *Trichoderma spp.* tiene acción antimicrobiana frente al hongo patógeno.

Ha= Al menos una dosis de *Trichoderma spp.* tiene acción antimicrobiana frente al hongo patógeno.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. *Passiflora ligularis* (granadilla)

3.1.1. Generalidades

La granadilla es una fruta originaria de América y se halla dispersa desde norte, centro y Sudamérica, con altos contenidos nutricionales tanto en vitaminas como en minerales, por lo que es de gran interés económico en el Ecuador. En este país se han identificado aproximadamente 800 hectáreas sembradas, con un rendimiento de 4,5 a 6 t/ha (Realpe, 2020).

Esta planta es de tipo perenne y trepadora, por lo que necesita un sostén o una guía para su desarrollo, no genera tallos gruesos y sin mucho gasto energético alcanza un gran crecimiento longitudinal, por lo que sus raíces no van más allá de 35 centímetros de profundidad, también cabe mencionar que son pivotantes con múltiples raíces secundarias y terciarias, según Bonilla et al., (2015).

3.1.2. Valor nutricional

Esta fruta es rica en nutrientes, ya que presenta un alto contenido de proteínas y minerales, tales como: calcio, hierro, fósforo, potasio, además de vitaminas B2 y C. La pulpa de la granadilla contiene fenoles, lo cual le brinda las características nutracéuticas en el control de la presión sanguínea. De igual forma tiene propiedades digestivas y diuréticas, además de su capacidad antioxidante (Realpe, 2020).

La Tabla 1 que se muestra a continuación describe los contenidos nutricionales que contiene la granadilla.

Tabla 1

Contenidos nutricionales de la granadilla

Parámetros	Contenido/100g de pulpa
Agua	72 – 80
Energía (kcal)	94
Proteínas (g)	2,4
Fibra dietética	2,8
Magnesio	10,9
Sodio	29
Potasio	28
Vitamina B6	348
Vitamina C (mg)	0,06
Ácido fólico (mg)	20
Carbohidratos (total)	17,3
Cenizas (g)	1,2
Calcio (mg)	10
Fósforo (mg)	64
Hierro (mg)	0,9

Nota. Adaptado de Realpe, (2020).

3.1.3. Relevancia económica en Ecuador

Realpe (2020) afirma que este cultivo se desarrolla mejor en climas subtropicales, con temperaturas de 14 a 24 °C y en la sierra se cultiva en todos los cantones, encontrando principalmente variedades como: morada, amarilla y real. Este alimento en el país se consume en fresco, aunque también se puede desarrollar productos terminados, con valor agregado como pulpa o mermeladas, lo cual aporta en la generación de empleos en toda su cadena productiva.

La granadilla representa el 12% de la producción de frutos tropicales en Ecuador con un mercado ascendente desde el 2006 hasta el 2012 por la demanda que existe en los países que la requieren.

Es comercializada en kilogramos, definiéndose como de primera al fruto con diámetro mayor a 74 mm y una masa superior a los 150g. El precio de esta categoría es de 4 dólares el kg.

El fruto de segunda se cotiza en $2,50/kg, su diámetro debe estar entre los 74 y 65 mm, masa de 150 a 100 gramos. Finalmente, el de tercera presenta un diámetro menor a 65 mm, menor a 100g y un precio de venta de $1,25/kg (Realpe, 2020).

A pesar de la elevada producción que se obtiene con la granadilla, los productores no tienen un margen de rentabilidad, debido a la masiva presencia de intermediarios. Además, el poco conocimiento para el mantenimiento de la calidad y técnicas que ayuden a la inocuidad del producto son factores que dificultan el comercio de este cultivo. Las cosechas se ven afectadas por insectos plaga y enfermedades, una de ellas es la antracnosis (Puga-Muima y Chalco-Sandoval, 2021).

3.2. Antracnosis

3.2.1 Agente causal

El hongo causante de la antracnosis es *Colletotrichum gloeosporioides* Penz*,* mismo que es un estado anamorfo de *Glomerella.* Este patógeno presenta colonias variables, de crecimiento micelial con forma radial, margen ondulado de coloración blanco y masas anaranjadas; el micelio es aéreo plano, presenta enramado inmenso y septado. Una de las características es la presencia de conidias hialinas, curvadas y fusiformes. Los conidios tienen una forma cilíndrica ovoide, con color salmón y en forma de masas, con un tamaño de 13,56 – 14,24 x 4 μm (Carrillo, 2019).

Llivicura (2018) afirma que *C. gloeosporioides* Penz afecta gran parte de los órganos de la planta, especialmente la zona aérea; es decir, brotes tiernos, inflorescencias, frutos en formación y maduros. Este hongo es considerado como uno de los más importantes en ataque

a productos agronómicamente importantes, debido a su gran capacidad para causar infecciones latentes o quiescentes (donde el hongo permanece asintomático en el tejido hasta que algún factor predisponente activa su estado).

El desarrollo de este patógeno empieza por la deposición de conidias en la superficie del hospedero, estas se fijan y germinan, producen apresorios los cuales penetran la epidermis de la planta, en donde van a crecer, colonizan los tejidos y finalmente esporulan (Llivicura, 2018).

3.2.2 Proceso infeccioso de la enfermedad

En el cultivo de granadilla, la antracnosis es una de las principales enfermedades que limita la producción y rendimiento para una buena comercialización, generando de esta manera pérdidas económicas. La antracnosis tiende a causar infecciones latentes y/o quiescentes, que dependen de las condiciones ambientales para su correcto crecimiento (Carrillo, 2019).

El mismo autor menciona que el porcentaje de infección de esta enfermedad es muy variable ya que depende de las condiciones ambientales y del cultivo; sin embargo, las precipitaciones son el factor más relevante e influyente para su desarrollo. La humedad relativa y temperaturas altas generadas por lluvias periódicas ayudan al progreso de la enfermedad, aunque también se favorece por una baja nutrición, mal drenaje, saturación de agua en el suelo, mal manejo de podas e inadecuado uso de fungicidas.

Además de los factores ambientales existen estructuras especializadas del agente causal, tales como: tubos germinales, apresorios e hifas para desarrollar la enfermedad. El proceso infeccioso empieza con la germinación de las conidias, mismas que se encargan de generar el apresorio por las aberturas existentes, lenticelas o lesiones que presenta la granadilla en su cutícula. Las hifas de penetración ingresan por estas aperturas creciendo dentro de las células, generando haustorios y ocasionando así la infección; pero, las condiciones ambientales y del hospedero tienen que ser óptimas para generar la enfermedad (Granados y Guevara, 2010).

Los autores antes mencionados, afirman que la granadilla, al igual que todas las plantas, tiene diversos mecanismos fisiológicos de defensa, es por este motivo que el agente causal de la

antracnosis puede permanecer en un estado de quiescencia en los tejidos del hospedero, es decir, permanece inactivo en la capa epidérmica de la granadilla, el tiempo necesario hasta que las condiciones sean las favorables para su crecimiento. En este punto *C. gloeosporioides* Penz se nutre de forma biotrófica (los nutrientes se obtienen de las células vivas de la granadilla) y necrotrófica (los nutrientes se obtienen de células muertas ya infectadas), creciendo y generando los síntomas característicos de la enfermedad.

3.2.3 Sintomatología

La humedad ayuda a la generación de esporas, las cuales se colocan en las ramas, frutos y demás órganos donde se produce la infección, generando la sintomatología pertinente. Los síntomas de la enfermedad son la presencia de manchas necróticas oscuras y de tamaño variable. En las etapas de desarrollo del hongo su micelio avanza de manera densa y presenta una tonalidad cada vez más oscura con el paso del tiempo. En las hojas se presentan márgenes y manchas circulares en el envés con halos de color verde oscuro que finaliza con un color pardo o casi negra (Carrillo, 2019).

La antracnosis puede presentarse en las ramas, siendo uno de los ataques más severos, ya que el ataque puede continuar a los peciolos y las hojas ocasionando un desprendimiento y la defoliación total. En los frutos ocasiona la caída prematura o la deformación general cuando la infección es en las etapas de desarrollo del mismo. En los brotes se presenta necrosis, totalmente negra, debido al marchitamiento y dependiendo de la severidad de la enfermedad se puede generar una muerte de las puntas (Granados y Guevara, 2010).

En todos los órganos que se presenta la enfermedad existe un polvillo de color salmón lo cual identifica a las masas conidiales del hongo y por ende la cantidad de esporas generadas. En este sentido el control es fundamental para mantener la granadilla, su vida productiva y la economía del productor.

3.3. Control de la enfermedad

3.3.1. Control químico

Tradicionalmente, se utiliza un control químico para cuidar el cultivo de granadilla de la antracnosis; pero, no existe un modelo correcto de aplicación. La efectividad del cuidado de la enfermedad disminuye debido a que no existe un manejo adecuado de los fungicidas. Los agricultores no utilizan una rotación del ingrediente activo y las dosis de los pesticidas no son correctas, considerando el proceso epidemiológico del hongo (Arias y Carrizales, 2007).

Entre los fungicidas más utilizados en el control de esta enfermedad se encuentran del grupo benzimidazol y estrobilurinas, los cuales afectan la división celular del hongo. Se utiliza también azoxistrobina, propiconazol, clorotalonil, tebuconazole, thiofanato de metil, mancozeb, entre otros de amplio espectro. La aplicación de fungicidas preventivos disminuye inóculos quiescentes (proceso infeccioso), y una posterior aplicación con agroquímicos curativos reduce la infección del ataque por este hongo, tal como afirman Pérez-León et al., (2015).

Los fungicidas son importantes para el control de enfermedades, siempre y cuando se apliquen de manera responsable y precautelando la salud humana; sin embargo, existen alternativas como el control biológico utilizados para disminuir el uso de agroquímicos evitando el desarrollo de resistencia y siendo amigables con el medio ambiente.

3.3.2. Control biológico

Según Carrillo et al., (2016) este se puede definir como la actividad que reduce el inóculo o el desarrollo del patógeno desencadenante de la enfermedad, gracias a la presencia de organismos externos. En la mayor parte el control biológico se realiza aplicando el antagonista en condiciones de humedad y temperatura controladas, siendo mínimas las investigaciones realizadas en campo. Debido a la incidencia de otros microorganismos y los cambios bruscos de temperatura afectan a la eficiencia de control por parte del agente biológico.

Existen diferentes modos de acción por el cual atacan los antagonistas a los agentes patógenos, por esto es importante seleccionar al microorganismo controlador en base a esta información. Sin embargo, el control biológico tiene un mercado con pequeño margen de utilidad, por lo que es imprescindible aplicar tratamientos con mezclas de antagonistas complementarios, más no competitivos entre ellos. Este proceso permite el aumento de efectividad, reducción de la cantidad de aplicaciones y el costo del tratamiento (Carrillo et al., 2016).

En el control biológico se presentan diversas formas in vitro para realizar este proceso, tales como pruebas de cultivos duales, cámaras húmedas, etc.

3.4. Métodos de control biológico con *Trichoderma spp*

3.4.1. *Trichoderma spp.* como controlador en antracnosis

Chiriboga et al., (2015) afirman que este es un hongo anaerobio facultativo cuyo hábitat es el suelo y que no presenta un estado sexual determinado. Es beneficioso para el control biológico ya que posee un rápido crecimiento, además desarrollan una gran cantidad de enzimas en la presencia del hongo patógeno.

Actúa degradando a los hongos fitopatógenos y tomando sus nutrientes, además de descomponer la materia orgánica de manera rápida actuando como saprófito.

Trichoderma spp se adapta fácilmente al sustrato, por ende, presenta un amplio control en patógenos foliares y aéreos, además estimula el crecimiento longitudinal de la planta y algunos orgánulos. Tiene una acción antagonista ya que controla al patógeno por tres formas, de manera directa en donde compite por el espacio y alimento, produciendo metabolitos antibióticos (volátiles o no volátiles) o realizando parasitismo directo (Valdés, 2014).

Las pruebas de acción antimicrobiana de *Trichoderma spp* miden la inhibición del halo del patógeno en los cultivos duales.

3.4.2. Pruebas de antagonismo

Andrade-Hoyos et al., (2019) afirman que estos mecanismos de control permiten identificar las reacciones que presentan los microorganismos entre sí y reconocer mediante diferentes pruebas el funcionamiento de un hongo antagónico contra un patógeno ocasionando la pérdida de actividad de al menos uno. Entre las pruebas existentes se encuentra la técnica de cultivos duales, la cual consiste en colocar en los extremos de una caja Petri los hongos o microorganismos a evaluar. En esta se determina el control en base al crecimiento del halo de los hongos en prueba.

La técnica de cámaras húmedas permite monitorear la presencia y reproducción de una enfermedad en específico.

Esto se basa en realizar un montaje de las especies o muestras del órgano a evaluarse, mediante un espacio saturado de humedad relativa. Además, se debe realizar una lectura frecuente del cambio presenciado en la cámara evaluando la presencia de la enfermedad y eliminando las muestras afectadas. El lugar de implementación debe tener las facilidades de asepsia, así como una humedad relativa estandarizada (Ramírez, 2018).

Se puede implementar tanto en hojas, brotes, flores u otros órganos de la planta. Tal como menciona Yumbay (2011) en su investigación realizada, en donde evidenció el control de diferentes cepas de *Trichoderma spp* frente al fitopatógeno *Botrytis cinerea,* en el cultivo de rosas, implementando también la técnica de cámaras húmedas para observar el desarrollo de la enfermedad.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales, equipos e insumos

4.1.1 Insumos

- Fundas de papel
- Guantes quirúrgicos
- Pipetas volumétricas
- Vasos de precipitación
- Asa
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Estilete
- Frasco boeco
- Gradillas
- Papel aluminio

4.1.2 Equipos

- Balanza analítica (modelo: adam PW254) (serie: AE4383736)
- Estufa (serie: 1210180008)
- Cámara de flujo laminar N_BIOTEK®
- Autoclave (ican clave)
- Congelador (thermoscientific™)
- Termociclador (Thermal cyclier PCR - 3000)
- Kit de extracción de ADN para hongos (OMEGA BIO TEK)

4.1.3 Reactivos

- Papa Dextrosa Agar (PDA TM MEDIA)
- Caldo nutritivo (TM MEDIA)
- Master Mix
- Primers (ITS 1, ITS 4)

4.2. Generalidades

4.2.1. Ubicación del área de estudio

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la PUCE-SI, ubicados en la provincia de Imbabura, cantón Ibarra (Figura 1).

La Figura 1 que se presenta a continuación, muestra la ubicación de la sede universitaria y de los laboratorios en donde se realizaron los procesos investigativos.

Figura 1

Ubicación de los laboratorios en la sede universitaria



4.2.2. Unidad experimental

Para la presente investigación cada caja Petri fue una unidad experimental, teniendo un total de 12 cajas Petri o unidades experimentales. Estas placas miden 9,5 cm de diámetro y 2cm de ancho. En cada plato petri se colocó la dosis respectiva de cada tratamiento y el hongo patógeno, para la prueba de antagonismo, cuyos procedimientos y cantidades utilizadas se explican más detalladamente en los siguientes apartados de este capítulo.

4.2.3. Tratamientos

Se utilizaron cuatro tratamientos, los cuales fueron: tres dosis de *Trichoderma spp* (variable independiente) y un control químico con Mancozeb como ingrediente activo (I.A) en dosis de 1000 ppm.

La Tabla 2 muestra los tratamientos que se aplicaron y la descripción de cada uno de estos.

Tabla 2

Descripción de tratamientos

Tratamiento	Simbología	Descripción
Uno	T1	$1x10^3$ ufc/ml
Dos	T2	$1x10^5$ ufc/ml
Tres	T3	$1x10^7$ ufc/ml
Cuatro	T4	Control químico con Mancozeb (1000 ppm)

Las dosis descritas se relacionan con las utilizadas por Varela (2021) en su investigación realizada con *Trichoderma spp* frente a *Fusarium*.

4.2.4. Diseño experimental

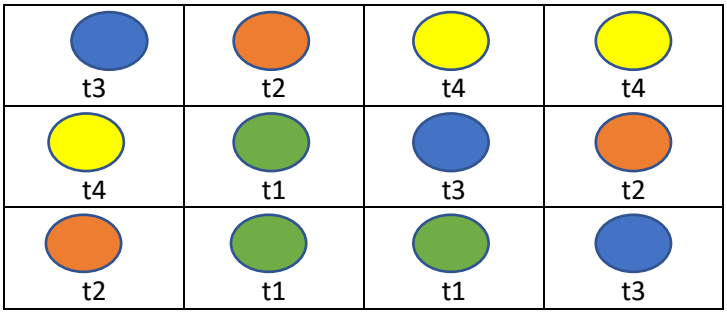
Se realizó un diseño completamente al azar (DCA), con 4 tratamientos y 3 observaciones teniendo un total de 12 unidades experimentales.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza con una prueba Tukey al 5%, con ayuda de R estudio versión 4.0.3 (AGPL v3), tanto para la prueba de antagonismo, como en cámaras húmedas.

La figura que se presenta a continuación muestra la aleatorización realizada en el software estadístico, para la distribución de los tratamientos en las unidades experimentales.

Figura 2

Distribución de tratamientos



Nota. Los círculos hacen referencia a las cajas Petri que son las unidades experimentales y t: tratamientos

4.3. Preparación de la investigación

4.3.1 Identificación de muestras

Para seleccionar las muestras se llevó a cabo una investigación bibliográfica para identificar los daños y la sintomatología que ocasiona este patógeno. Los daños del hongo se presentan en las hojas, en forma de manchas circulares necróticas, la cual es una sintomatología causada por el hongo en estudio, según Rodríguez-López et al., (2013).

4.3.2 Recolección de muestras

Las muestras fueron tomadas en la provincia de Imbabura, cantón Pimampiro, parroquia de San Francisco de Sigsipamba, comunidad San Antonio. Estas se cortaron en el pecíolo con tijera de poda y posterior a cada corte, se desinfectó el instrumento con alcohol.

Las muestras se sellaron en fundas plásticas herméticas y se trasladaron al laboratorio de Microbiologia la PUCE-SI, siguiendo el protocolo de Quintero-Mercado et al., (2019) en donde mencionan la toma de muestras y la conservación para su transporte.

4.4. Caracterización del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* Penz en plantas infectadas mediante secuenciación molecular

4.4.1 Aislamiento del patógeno *C. gloeosporioides* Penz

Se realizó un lavado de las hojas infectadas con agua esterilizada, luego se hizo un corte pequeño con bisturí en la zona con sintomatología y se colocó esta muestra en plato Petri, previamente esterilizado, con 20 ml de PDA para el crecimiento. Se dejó en incubadora a 27 °C por 5 días hasta observar el crecimiento del hongo según la técnica implementada por García-Mateos et al., (2021).

4.4.2 Purificación de la muestra

Después de la incubación, se tomó una muestra con asa de la zona con mayor micelio y se colocó en nuevas cajas petri con PDA teniendo resiembras sucesivas (3). Se seleccionaron los platos petri con mejor crecimiento del hongo de acuerdo a la caracterización macroscópica (color, textura del micelio y forma de la colonia) y se almacenó para realizar las pruebas de antagonismo y secuenciación molecular siguiendo la técnica de Trinidad-Ángel et al., (2017).

4.4.3 Extracción de ADN

Se utilizó el kit de extracción de ADN para hongos de "OMEGA BIO TEK". Inicialmente se hizo un raspado con asa de un plato purificado, se sembró en tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo (solución madre) y se dejó incubar por 48 horas a 30 ºC. Después de este período de tiempo se tomó 1 ml de la solución madre, se colocó en un microtubo y se centrifugó a 1000 rpm por 1 minuto.

Se botó todo el líquido del microtubo y se colocó nuevamente 1 ml de la misma solución repitiendo el proceso de centrifugado por 3 veces hasta tener presencia de pellet.

En el microtubo con pellet se añadieron 600 uL de FG1 Buffer y 5 uL de RNasa A, se mezclaron en el vortex por 1 minuto para tener una mezcla homogénea.

Se añadieron 10 uL de mercaptoethanol y se incubó a 65ºC por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 140 uL de FG2 Buffer y se dejó en el congelador por 5 minutos. Se centrifugó la muestra por 10 minutos a 10000 rpm y se transfirió todo el líquido a un nuevo microtubo con 0.5ml de FG3 Buffer y 1 ml de etanol al 100%. Se transfirió a un nuevo microtubo, se añadió 750 uL de ADN Wash Buffer, se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto, se botó el líquido y se repitió el proceso. Finalmente se añadió 100 uL de Elution Buffer, se dejó reposar por 5 minutos, se centrifugó y se almacenó el DNA a – 20 ºC para continuar con la PCR (Omega Bio-Tek, 2013).

4.4.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se aplicó 9 uL de agua estéril, se añadió 25 µL de master mix, se colocó 2 µL de cada primer (ITS 1 y ITS 4) y finalmente se agregó 10 µL de la muestra de ADN. Se dejó las muestras en la máquina de PCR estándar "Thermal cyclier PCR 3000" por 4 horas, se almacenó a temperaturas bajas y se empacó para enviar a realizar la secuenciación (Omega Bio-Tek, 2013).

Posteriormente, se enviaron las muestras obtenidas a un laboratorio privado "GEN" en donde se realizó la secuenciación molecular del hongo en estudio.

4.5. Análisis de la acción antimicrobiana de diferentes dosis de *Trichoderma spp* a través de pruebas en laboratorio

4.5.1. Crecimiento de colonias puras de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz

De las cajas purificadas se hizo un raspado con asa y se sembró en tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo, todo en un medio esterilizada. Estas muestras se dejaron en la incubadora a 30 ºC por 48 horas, siguiendo la metodología empleada por Aldas (2021).

4.5.2. Aislamiento y crecimiento de colonias puras de *Trichoderma spp.*

La cepa de *Trichoderma spp* se obtuvo en la provincia Pichincha, cantón Cayambe. Se preparó 10 ml de caldo nutritivo en tubos de ensayo previamente esterilizados en el autoclave. En 10 ml de agua destilada esterilizada se diluyó 1 gramo de la cepa de *Trichoderma spp*.

Posteriormente se tomó 100uL de la dilución y se colocó en cajas Petri con 20 ml de PDA. Se dejó reposar por 7 días en incubadora a 26 ºC. Al cabo de este período se hizo un raspado con asa de las zonas con mayor crecimiento del hongo y se colocó en los tubos con caldo nutritivo por 48 horas, con la finalidad de obtener un mejor crecimiento de esporas del posible antagonista (Acurio y España, 2017).

4.5.3. Preparación de las dosis del antagonista

Para este proceso se utilizó una cámara de Neubauer, en el cual se colocó una muestra de 100 uL del hongo preparado en caldo nutritivo. Se realizó el conteo de esporas con ayuda del microscopio compuesto y el lente de 40X. Se hizo el procedimiento en 5 cuadros medianos (cuatro esquinas y el centro), de cada uno de los hemisferios de la cámara (Figura 4) según lo establecido por Salinas (2019).

Posteriormente se utilizó el tubo con el mayor promedio de esporas y se realizaron diluciones para tener las dosis de los tratamientos. Para obtener las dosis de $1x10^3$ ufc/ml se colocó 1 ml del tubo seleccionado y se aforo con 9 ml de caldo nutritivo nuevo esterilizado, para la dosis $1x10^5$ se utilizó 3ml del tubo selecto y se aforo hasta 10 ml con el nuevo caldo nutritivo y finalmente para $1x10^7$ ufc/ml se colocó 7 ml del tubo determinado y de igual manera se aforó como en los otros tratamientos (Salinas, 2019).

La Figura 3 representa la cámara de Neubauer utilizada en el conteo de esporas de *Trichoderma spp.*

Figura 3

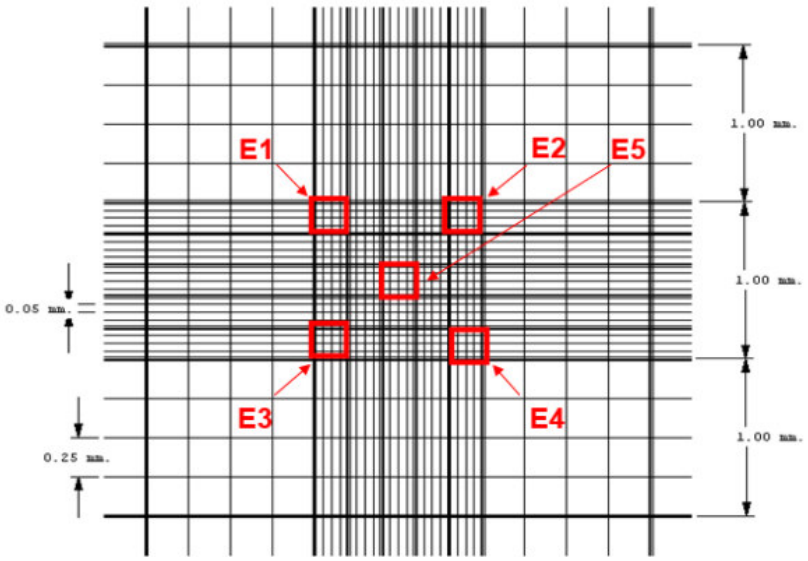
Cámara de Neubauer



La Figura 4 indica los cuadrados medianos de un solo hemisferio en los que se realizó el conteo de esporas del posible antagonista. Estos cuadros medianos se dividen en 16 pequeños, los cuales sirven para ubicar las esporas.

Figura 4

Cuadros de conteo de esporas



Nota. Adaptado de Salinas (2019).

4.5.4. Dosis del control químico

Se evaluó un control químico, siendo el ingrediente activo (I.A) Mancozeb. Se pesó una cantidad equivalente a 1 gramo del I.A, se disolvió en 5 ml de agua destilada y posteriormente se aforó hasta 100 ml. A partir de esta solución, se tomó 1 ml, siguiendo el protocolo de diluciones en plato agar de Rondón y Sanabria (2016). Se colocó en tubo de ensayo cuyo contenido inicial fue 9ml de agua destilada. Se utilizó 1 ml de esta dilución para la prueba de antagonismo (Rondón y Sanabria, 2016).

4.5.5. Análisis de la acción antimicrobiana

Se realizó la técnica de cultivos duales, para esto se colocó 20 ml de PDA en plato petri, posteriormente se sembró el patógeno colectado en los tubos de ensayo con caldo nutritivo, a

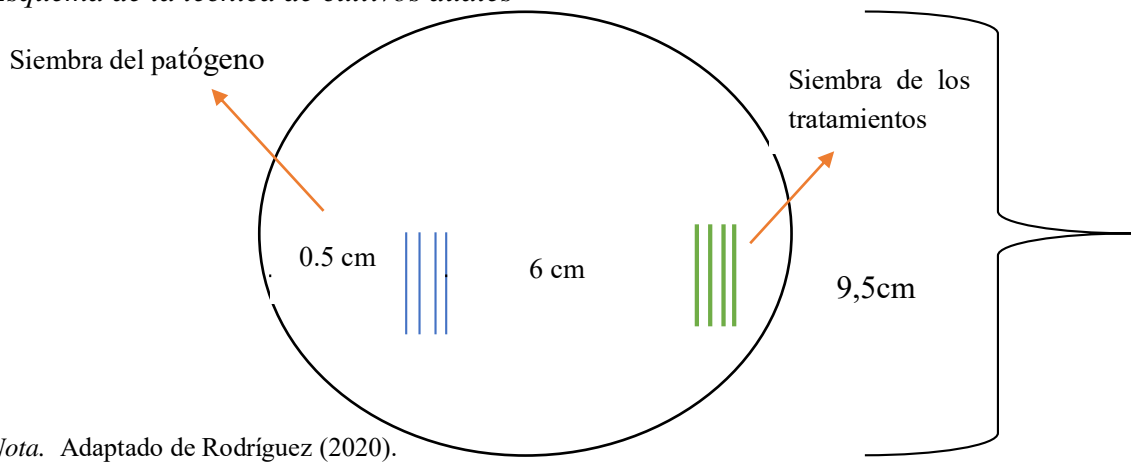
0.5 cm del borde de la caja y a 6 cm se colocó los tratamientos respectivos, igualmente almacenados en caldo nutritivo (Figura 5).

La siembra de los hongos y tratamientos se realizó con un asa estéril, en un diámetro de 0.5 cm considerando la concentración definida anteriormente para cada uno. Finalmente se dejó en incubación por 10 días a 25 ºC ± 2, siguiendo la metodología de Ramírez-Olier et al., (2019).

Se midió el crecimiento micelial (variable dependiente) de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, a partir del día tres de siembra de los tratamientos, con ayuda de una regla o pie de rey y se registró los datos del diámetro para su respectivo análisis estadístico (Rodríguez, 2020).

Figura 5

Esquema de la técnica de cultivos duales



Nota. Adaptado de Rodríguez (2020).

4.6. Determinación de la mejor dosis de *Trichoderma spp.* en hojas con síntomas de antracnosis mediante pruebas en cámaras húmedas

4.6.1. Descripción de tratamientos usados en las cámaras húmedas

Se evaluó las dos mejores dosis con mayor control en la técnica de cultivos duales, además se utilizó el control químico y un testigo (sin control), con tres repeticiones.

La Tabla 3 muestra los tratamientos que se utilizaron en las cámaras húmedas.

Tabla 3

Tratamientos de cámaras húmedas

Tratamiento	Simbología	Descripción
Uno	T1	$1x10^7$ ufc/ml
Dos	T2	$1x10^5$ ufc/ml
Tres	T3	Control químico con Mancozeb (1000 ppm)
Cuatro	T4	Sin ningún control

4.6.2. Elaboración de cámaras húmedas

Se colocaron en fundas plásticas herméticas. En el interior primero se colocó papel toalla mojado con agua destilada esterilizada y posteriormente se añadió la hoja infectada con síntomas de antracnosis. Finalmente, se cerró la funda y se tomó el registro del tamaño inicial de la lesión, relacionando el proceso con el realizado por Violeta et al., (2020) y López-Navarrete et al., (2018).

4.6.3. Evaluación de las mejores dosis

Se utilizó un atomizador manual y se aplicó 5 ml de cada tratamiento, de acuerdo a las dosis establecidas en la Tabla 3. Se dejó incubar por 10 días y se determinó la severidad de acuerdo al crecimiento diametral de la lesión (variable dependiente), en la zona infectada, siguiendo la metodología de Barrios et al., (2016) y López-Navarrete et al., (2018).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza

Se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad, para cada uno de los resultados de las variables evaluadas, con la finalidad de tener una validación del experimento. Los datos se observan en la Tabla 4, y se puede determinar que se encuentran distribuidos normalmente.

Tabla 4

Prueba de normalidad Shapiro Wilk y homogeneidad Bartlett test de las variables evaluadas

Variable	Observaciones	Promedio (cm)	Desviación estándar	W°	p value (Shapiro Wilk)	p value (Bartlett test)
Crecimiento micelial del patógeno						
Crecimiento a los 3 días						
Tratamiento 1	3	2,17	0,29	0,86	0,05	0,79
Tratamiento 2	3	1.83	0,29			
Tratamiento 3	3	1,67	0,29			
Tratamiento 4	3	2,33	0,29			
Crecimiento a los 5 días						
Tratamiento 1	3	3,17	0,29	0,86	0,05	0,62
Tratamiento 2	3	2.83	0,29			
Tratamiento 3	3	2,33	0,29			
Tratamiento 4	3	3,17	0,29			
Crecimiento a los 7 días						
Tratamiento 1	3	5	0	0,86	0,05	0,55
Tratamiento 2	3	3,33	0,29			
Tratamiento 3	3	2.7	0,36			
Tratamiento 4	3	4	0			
Crecimiento a los 10 días						
Tratamiento 1	3	6,83	0,76	0,97	0,94	0,46
Tratamiento 2	3	3,83	0,29			
Tratamiento 3	3	3	0,5			
Tratamiento 4	3	4,73	0,25			

Variable	Observaciones	Promedio (cm)	Desviación estándar	Wº	p value (Shapiro Wilk)	p value (Bartlett test)
Crecimiento del hongo en cámaras húmedas						
Crecimiento a los 3 días						
Tratamiento 1	3	2,27	0,68	0,96	0,79	0,17
Tratamiento 2	3	3	0,5			
Tratamiento 3	3	2,27	0,25			
Tratamiento 4	3	4,5	1,5			
Crecimiento a los 5 días						
Tratamiento 1	3	2,83	0,76	0,94	0,51	0,66
Tratamiento 2	3	3,83	0,29			
Tratamiento 3	3	4,33	0,58			
Tratamiento 4	3	6,67	0,76			
Crecimiento a los 7 días						
Tratamiento 1	3	3,33	0,76	0,96	0,78	0,75
Tratamiento 2	3	5	0			
Tratamiento 3	3	6,27	0,46			
Tratamiento 4	3	8,17	0,76			
Crecimiento a los 10 días						
Tratamiento 1	3	4	0,87	0.95	0.7	0,58
Tratamiento 2	3	6,17	0,29			
Tratamiento 3	3	7,5	0,5			
Tratamiento 4	3	9,67	0,76			

5.2. Caracterización del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* Penz en plantas infectadas

5.2.1 Caracterización macroscópica y microscópica

La caracterización macroscópica de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz se determinó de acuerdo a la forma y color de la colonia y micelio. La Figura 6 muestra el crecimiento observado a los 7 días del aislamiento de hojas infectadas con síntomas de antracnosis.

Figura 6

Cepa aislada con características similares para Colletotrichum gloeosporioides Penz

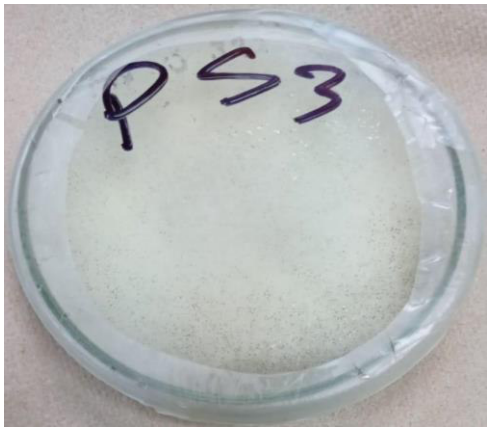


En la Figura 6 se observa el color salmón de la colonia en el envés del plato petri, que presenta características similares a *C. gloeosporioides* Penz Estas características concuerdan con las mencionadas por Flores (2019), en donde afirma que en el envés de la placa se presenta un color salmón en el centro.

La Figura 7 hace referencia al color del micelio del fitopatógeno aislado después de realizar una purificación del aislamiento inicial.

Figura 7

Cepa con características similares para Colletotricum gloeosporioides Penz, *purificada*

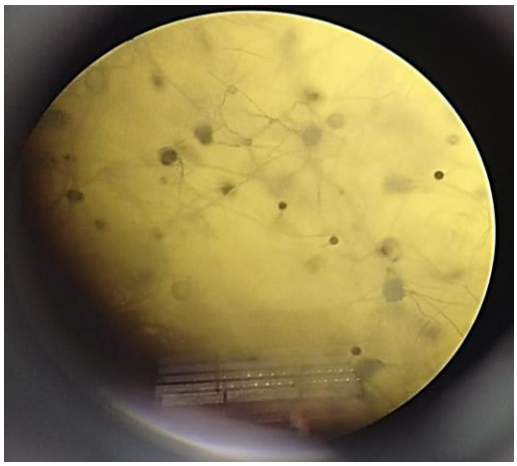


En la Figura 7 se muestra el crecimiento micelial del hongo en el haz del plato petri, el cual es de forma algodonosa con color blanco, cuyas características son similares a las mencionadas por Santacruz (2013) y Revelo (2014), los cuales afirman que el color del micelio es algodonoso y con el tiempo se vuelve grisáceo con un máximo de desarrollo a los 15 días.

La Figura 8 muestra características microscópicas similares para *C. gloeosporioides* Penz. Se presenta apresorios miceliales observados en el microscopio óptico con el lente de 40x, los cuales tienen similitud a los analizados por Flores (2019), en su investigación realizada.

Figura 8

Apresorios miceliales del fitopatógeno



5.2.2 Caracterización molecular

Se obtuvo un porcentaje de identidad de 99,45% entre la muestra aislada del patógeno y el espécimen de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz de acuerdo a la base de datos del NCBI. La Tabla 5 indica las características de la muestra ensamblada y la relación existente con la información del GenBank del sitio informático.

Tabla 5

Análisis de la muestra ensamblada de acuerdo a la caracterización molecular

N° Muestra	ID Accession	Descripción	Nombre científico	Porcentaje de identidad
1. Aislada	J4Z91W49016	M480 consensus sequence Hongo aislado de sintomatologia en hojas de granadilla		
2. NCBI	KT004429.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate GX016 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Colletotrichum gloeosporioides Penz	99.45%

Además, la muestra 1 (aislada), corresponde a la secuencia ensamblada de la amplificación de los primers ITS1 (Anexo 7) y el ITS4 (Anexo 8) del hongo patógeno en estudio.

5.3. Análisis de la acción antimicrobiana de diferentes dosis de *Trichoderma spp.* a través de pruebas en laboratorio.

5.3.1 Crecimiento micelial del fitopatógeno (cm)

En la Tabla 6, se muestra el crecimiento micelial del fitopatógeno obtenido tras los datos tomados en un período de 10 días.

Tabla 6

Crecimiento del patógeno en la evaluación in vitro del hongo Trichoderma spp como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis

Tratamientos	**Dosis de *Trichoderma spp* (ufc/ml)**	**Crecimiento micelial del patógeno (cm)**
T1	$1x10^3$	6,83
T2	$1x10^5$	3,83
T3	$1x10^7$	3
T4	Testigo (control químico)	4,73

Para la variable crecimiento micelial del hongo causante de la enfermedad, se observa que el tratamiento tres, T3 ($1x10^7$ ufc/ml de *Trichoderma spp*), presentó un mayor control, ya que se presenció un mínimo crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (3 cm); mientras que el T1 ($1x10^3$ ufc/ml de *Trichoderma spp*) presentó un menor control del fitopatógeno, debido a que este logró un crecimiento de 6,83 cm.

La tabla que se presenta a continuación muestra el análisis de varianza para la variable crecimiento micelial del fitopatógeno.

Tabla 7

Análisis de varianza para el crecimiento micelial de C. gloeosporioides Penz *en la evaluación in vitro del hongo Trichoderma spp como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis*

F.V	G.L	S.C	C.M	Fo	F0,05	
Total	11	26,42				
Tratamientos	3	24,46	8,15	33,28	4,066	*
Error	8	1,96	0,25			
CV (%)	10,76					
Promedio del crecimiento micelial	4,6 cm					

Nota. F.V: Fuentes de variación, G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de cuadrados, C.M: Cuadrados medios, Fo: valor de F calculado, F0.05: valor de F tabulado al 5% con un 95% de valor alfa de confiabilidad, *: Diferencias significativas.

Para la variable crecimiento micelial del patógeno, tras el análisis ANOVA, se detectó que existen diferencias significativas al 5% entre los tratamientos.

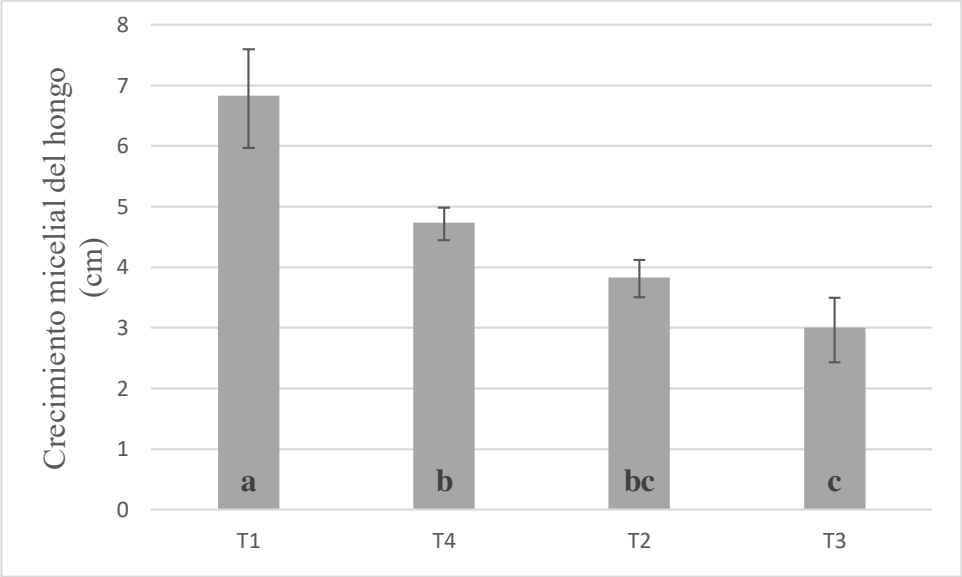
Esto indica que al menos un tratamiento fue diferente a los demás para la variable en estudio. De igual manera el coeficiente de variación fue de 10,76%, por lo que existe una baja desviación estándar de los datos con respecto a la media y demostrando que la investigación es viable. Además, el promedio general entre tratamientos fue de 4,6 cm.

La prueba Tukey al 5% para el crecimiento del patógeno (Figura 9), muestra que evidentemente existen cuatro rangos dentro de los cuales se encuentran los tratamientos en estudio. Se obtuvo que el tratamiento T3 se encontró en el rango “c”, siendo el mejor control inhibiendo el crecimiento micelial del patógeno. A diferencia del tratamiento T1, que se ubicó

en el rango “a” y presentó un menor control en el crecimiento micelial. El tratamiento T4 obtuvo el rango “b” y T2 el rango “bc”.

Figura 9

Rangos para el crecimiento micelial del patógeno (cm) por tratamiento en la evaluación in vitro del hongo Trichoderma spp como potencial antagonista en el control de la enfermedad antracnosis



Como se observa en la Figura 9, el tratamiento T3 se encontró en el rango “c”, debido a que presentó un crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* Penz de 3 cm, mientras que el tratamiento T4 (testigo) tuvo el rango “b” porque su inhibición fue menor, ya que el hongo causante de antracnosis obtuvo un crecimiento micelial de 4,73 cm; sin embargo, este obtuvo su máximo crecimiento (6.83 cm) con el tratamiento T1.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Peláez-Álvarez et al., (2016), quien demostró que el uso de *Trichoderma asperellum* inhibe el crecimiento de *Colletotrichum* en 91%; lo cual ratifica que el uso del hongo benéfico promueve una inhibición en el crecimiento del patógeno en estudio. También existe concordancia con los resultados obtenidos por Landero-Valenzuela et al., (2016), en donde el mayor control del hongo se presentó con glucosinolatos aislados de floretes de brócoli a concentraciones de 1,54 y 0,92 µg/µL logrando la inhibición

total de la germinación de esporas de *Colletotrichum gloesporioides* P, aislado de mango, ratificando el uso de extractos naturales y microorganismos benéficos como alternativas de control.

5.4 Determinación de la mejor dosis de *Trichoderma spp.* en hojas con síntomas de antracnosis mediante pruebas en cámaras húmedas

5.4.1 Crecimiento diametral de la lesión en la zona infectada

La Tabla 8 muestra el crecimiento diametral de la lesión ocasionada por *C. gloeosporioides* Penz y su desarrollo con los tratamientos evaluados, en un período de 10 días y la Tabla 9 presenta los datos de crecimiento antes de los tratamientos.

Tabla 8

Crecimiento diametral de la lesión en hojas infectadas por C. gloeosporioides Penz

Tratamiento	Dosis	Crecimiento de la lesión (cm)
T1	$1x10^7$ ufc/ml	4
T2	$1x10^5$ ufc/ml	6,17
T3	Mancozeb (1000 ppm)	7,5
T4	Sin control	9,67

Para la variable crecimiento diametral de la lesión en la zona infectada, se analiza que el tratamiento T1 ($1x10^7$ ufc/ml de *Trichoderma spp*), presentó un mayor control en el desarrollo de la enfermedad, esto debido a que el crecimiento de la infección al término de 10 días fue de 4 cm; mientras que en el tratamiento T4 (sin ningún control), el crecimiento fue de 9,67 cm, alcanzando un gran desarrollo de la lesión.

A su vez, la Tabla 9 presenta la relación existente en el desarrollo de la zona infectada desde el momento que se implementó las cámaras húmedas (día 0) y el último día del análisis de datos (día 10).

Tabla 9

Relación de crecimiento de la infección al día 0 y 10

Tratamiento	Diámetro inicial (cm)	Crecimiento al día 10 (cm)	Relación de crecimiento (cm)
T1	1,83	4	2,17
T2	1,5	6,17	4,67
T3	1,3	7,5	6,2
T4	2,17	9,67	7,5

Por tal motivo, considerando el diámetro inicial de la lesión, se muestra que el tratamiento T1 tuvo un mejor control en el desarrollo de la infección, ya que existió un crecimiento de 2,17 cm, al contrario que con el tratamiento T4 en donde la infección avanzó 7,5 cm (5,33 cm más) debido a que no se utilizó ningún control, logrando una inhibición del 71,07% en el desarrollo de la enfermedad.

A continuación, se presenta la Tabla 10 en donde se muestra el análisis de varianza para la variable crecimiento de la lesión considerando el diámetro inicial de la misma.

Tabla 10

Análisis de varianza para el crecimiento diametral de la lesión en la determinación de la mejor dosis en el control de Colletotrichum gloeosporioides Penz

FV	GL	SC	CM	Fo	F0,05	
Total	11	48,667				
Tratamientos	3	47,273	15,758	90,475	4,066	*
Error	8	1,393	0,174			
CV (%)	8,13					
Promedio del crecimiento	5,13 cm					

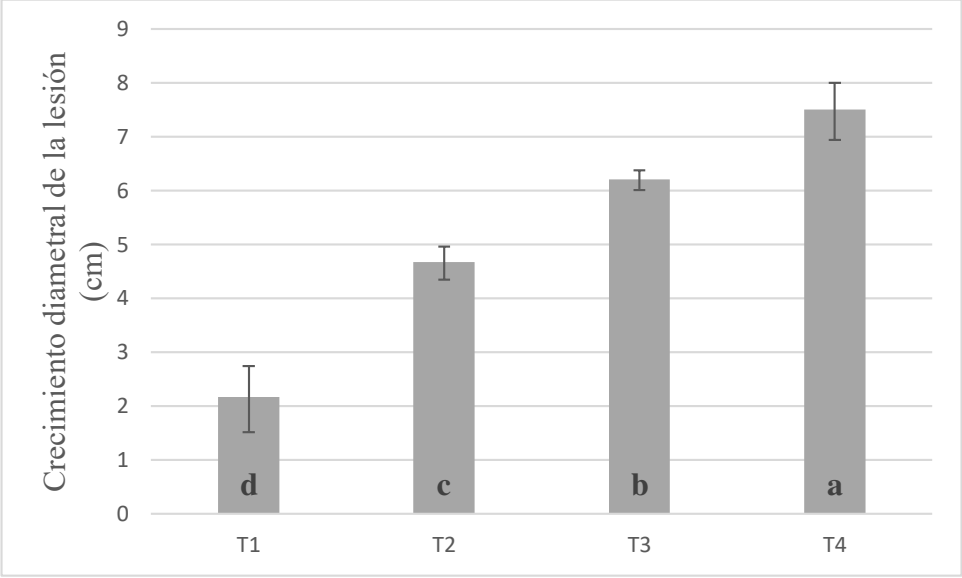
Nota. F.V: Fuentes de variación, G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de cuadrados, C.M: Cuadrados medios, Fo: valor de F calculado, F0.05: valor de F tabulado al 5% con un 95% de valor alfa de confiabilidad, *: Diferencias significativas.

Para la variable crecimiento diametral de la lesión, tras el análisis ANOVA, se determinó que existen diferencias significativas al 5% entre los tratamientos, por lo que se define que al menos un tratamiento fue distinto a los demás. Así mismo, el coeficiente de variación fue de 8,13%, por lo que existe una baja desviación estándar de los datos con respecto a la media y el promedio entre los tratamientos de 5,13 cm.

La prueba Tukey al 5% (Figura 10), para el crecimiento diametral de la lesión en la zona infectada indica que existen cuatro rangos entre los tratamientos evaluados. De tal forma, se determinó que el tratamiento T4 está en el rango "a", el T3 en el "b", el T2 en "c" y el T1 en rango "d".

Figura 10

Rangos para el crecimiento diametral (cm) de la lesión de la zona infectada por tratamiento en la determinación de la mejor dosis en el control de la enfermedad antracnosis



Como muestra la Figura 10, el tratamiento T1 obtuvo el rango "d", debido a que tuvo un crecimiento del diámetro de la infección de 2,17 cm; sin embargo, el tratamiento T4 que no tiene ningún control, se encontró en el rango "a" ya que su crecimiento diametral fue mayor que el mencionado anteriormente (7,5 cm).

Los resultados obtenidos tienen relación con los alcanzados por Landero (2013), en donde menciona que cepas de *Trichoderma spp* lograron la reducción de la severidad en el diámetro de la lesión causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de papaya, con una eficiencia de 77,40%, con lo cual se confirma la capacidad antagónica de *Trichoderma spp* frente al causante de antracnosis. Se reafirma el control de *Trichoderma spp* frente al fitopatógeno en estudio gracias a la investigación desarrollada por Gaviria-Hernández et al., (2013), en la cual mencionan que el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los productos a base de *Trichoderma lignorum* y *T. harzianum* osciló entre 61% y 65% para *C. gloeosporioides* Penz, y entre 77% y 79% para *C. acutatum,* consolidando los resultados de la presente investigación con la influencia de *Trichoderma spp* como antagonista.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- En la caracterización molecular se evidenció que el hongo aislado de la sintomatología en las hojas de *Passiflora ligularis* pertenecía al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz*,* ya que se encontró una similitud de 99,45% de acuerdo a la base de datos de especímenes del GenBank del NCBI.
- El análisis de la acción antimicrobiana de diferentes dosis de *Trichoderma spp.* con la prueba de cultivos duales permitió determinar que el tratamiento T3 ($1x10^7$ ufc/ml) presentó un crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz de 3 cm, siendo este el mejor control, debido a que con el tratamiento T4 (control químico) el patógeno alcanzó un crecimiento de 4,73 cm.
- En la determinación de la mejor dosis de *Trichoderma spp.* en hojas con síntomas de antracnosis en cámaras húmedas, se evidenció que en el tratamiento T1 ($1x10^7$ ufc/ml) el crecimiento diametral de la lesión fue de 2,17 cm, mientras que en hojas sin ningún control la lesión se desarrolló 7,5 cm. Logrando una inhibición del 71,07% del desarrollo de la enfermedad.
- Finalmente, la evaluación in vitro del hongo *Trichoderma spp.* como potencial antagonista de la enfermedad ocasionada por el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* Penz en granadilla *Passiflora ligularis* permitió concluir que esta tiene un efecto positivo en el control del hongo causante de antracnosis, por lo que se aprobó la hipótesis alternativa en donde se mencionó que al menos una dosis de *Trichoderma spp* tiene acción antimicrobiana frente al patógeno.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- La metodología aplicada para este estudio puede ser usada en futuras investigaciones, ya que es necesario profundizar en la actividad antifúngica de *Trichoderma spp* como potencial antagonista en el control de diferentes patógenos en productos agrícolas de interés comercial.
- Se recomienda continuar con la investigación de *Trichoderma spp* para conocer el metabolito secundario que controla el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz*,* con la finalidad de realizar réplicas de este componente omitiendo el proceso in vitro.
- Evaluar en campo abierto la mejor dosis de *Trichoderma spp* ($1x10^7$ ufc), en diferentes especies de la familia *Passiflora* con la finalidad de tener una alternativa de control frente a la enfermedad ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y así disminuir el uso excesivo de agroquímicos tóxicos.
- Es importante continuar con las investigaciones sobre los diferentes beneficios de los microorganismos, especialmente *Trichoderma spp,* tanto en el control de enfermedades como en mejoras de rendimiento, aportando así en brindar alternativas sanas de producción y también amigables con el medio ambiente, conociendo el funcionamiento de estos en las plantas.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acurio, R. y España, C. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de Trichoderma spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). *Revista de Ciencias de la Vida*, *25*(1), 53-61.

https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n25.2017.05

Aldás, B. (2021). *Control in vitro de la bacteria patógena (Xanthomonas arboricola pv. Pruni) y el hongo patógeno (Sclerotinia fructicola) en duraznero (Prunus persica) con diferentes soluciones de metilina* [Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra]. Repositorio Institucional – PUCESI.

Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N. y Barrales-Cureño, H. (2019). Antagonismo de Trichoderma vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 10*(6), 1259-1272.

https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326

Arias, B. y Carrizales, L. (2007). Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio Cedeño, estado Monagas, Venezuela. *Bioagro*, *19*(1), 19-25.

https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85719103

Atoche, C. (2021). *Extractos de residuos agroindustriales de Citrus spp. sobre el control de antranosis en frutos de poscosecha* [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Frontera]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional de Frontera.

Barrios, C., Bustillo, A., Ocampo, K., Reina, M. y Alvarado, H. (2016). Eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Leptopharsa gibbicarina* (Hemiptera: Tingidae) en palma de aceite. *Revista Colombiana de Entomología, 42*(1), 22-27.

http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v42n1/v42n1a05.pdf

Brito, B., Espín, S., Villacrés, E., Vaillant, F., Medina, G., y Picho, L. (2008). Granadilla *(Passiflora ligularis* L*.).* Características físicas y nutricionales de la fruta importantes en la investigación y elaboración de 44 pulpas, jugos, concentrados y postres. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad.

Bonilla, M., Aguirre, A. y Agudelo, O. (2015). Morfología de Passiflora: una guía para la descripción de sus especies. Revista De Investigación Agraria Y Ambiental, 6(1), 91–109.

https://doi.org/10.22490/21456453.1266

Carrillo, J., García, R., Muy, M., Sañudo, A., Márquez, I., Allende, R., de la Garza, Z., Patiño, M. y Galindo, E. (2005). Control Biológico de Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y su Efecto en la Calidad Poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *23*(1), 24-32.

https://www.redalyc.org/pdf/612/61223104.pdf

Carrillo, W. (2019). *Identificación de los principales daños ocasionados por la antracnosis en el cultivo de granadilla (Passiflora ligularis Juss) en la Parroquia de Cahuasquí, Cantón Urcuqui, Provincia de Imbabura* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Babahoyo]. http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/6403

Carvajal, L., Turbay, S., Álvarez, L., Rodríguez, A., Bonilla, K. y Restrepo, S. (2014). Relación entre los usos populares de la granadilla y su composición fitoquímica. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 12*(2), 185-196.

http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v12n2/v12n2a21.pdf

Chiriboga, H., Gómez, G. y Garcés, K. (2015). *Trichoderma para el control biológico de enfermedades.* Paraguay, Editorial IICA,

http://repositorio.iica.int/handle/11324/2647

Flores, L. (2019). *Comparación in vitro de la actividad antifúngica de aceite esencial de albahaca (Ocinicum basilicum) e hinojo (Foeniculum vulgare) frente a Colletotrichum gloeosporioides, agente causal de la antracnosis* [Tesis de Pregrado, Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca]. Repositorio Institucional – Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca

García-Mateos, M., Acosta-Ramos, M., Rodríguez-Pérez, E., Vásquez-Sánchez, J. y Hernández-Ramos, L. (2021). Extractos vegetales para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro, en período de floración y poscosecha. *Polibotánica*, (51), 213-228.

https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.14

Gaviria-Hernández, V., Patiño-Hoyos, L., y Saldarriaga-Cardona, A. (2013). Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de Colletotrichum spp., en mora de castilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *14*(1), 67-75.

http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v14n1/v14n1a08.pdf

Granados, G., y Guevara, Y. (2010). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos de Colletotrichum spp. obtenidos de frutales de clima moderado con síntomas de antracnosis* [Tesis de Pregrado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional - Pontificia Universidad Javeriana.

Izquierdo, J. (2017). *Contaminación de suelos agrícolas provocados por el uso de agroquímicos* [Tesis de Pregrado, Universidad Salesiana de Cuenca]. Repositorio Institucional - Universidad Salesiana.

Landero, N. (2013). *Extractos vegetales y Trichoderma spp. en el control de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz y Sacc. en frutos de papaya maradol (Carica papaya L.)*

en postcosecha [Tesis de Postgrado, Colegio de Postgraduados]. Repositorio Institucional – Colegio de Postgraduados.

Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. y Aguado, G. (2016). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *7*(5), 1189-1198.

https://www.redalyc.org/pdf/2631/263146723018.pdf

Llivicura, M. (2018). *Comparación in vitro de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de romero y cola de caballo frente al hongo Colletotrichum gloeosporioides* [Tesis de Pregrado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional - Universidad Politécnica Salesiana.

López, M., Beltrán, M., Cardona, J., y Yepes, H. (2012). La fruta de la pasión, potencial contribución de la naturaleza a la seguridad alimentaria. *Investigaciones Andina*, 8(12), 1-11.

https://www.redalyc.org/pdf/2390/239017506007.pdf

López-Navarrete, M., Arévalo-Galarza, M. y Nieto-Ángel, D. (2018). Uso de fungicidas y tratamiento térmico postcosecha para control de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Agro Productividad, 4*(3), 24-28.

https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/580

Omega Bio-Tek. (2013). *E.Z.N.A Fungal DNA mini kit.* Georgia, Editorial Omega Bio Tek.

https://www.omegabiotek.com/product/e-z-n-a-fungal-dna-mini-kit

Peláez-Álvarez, A., de los Santos-Villalobos, S., Yépez, E., Parra-Cota, F. y Reyes-Rodríguez, R. (2016). Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50 ® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 7*(6), 1401-1412.

https://www.redalyc.org/pdf/2631/263148193014.pdf

Pérez-León, G., Castillo-Matamoros, R., Chavarría-Pérez, L., Brenes-Angulo, A. y Gómez-Alpízar, L. (2015). Combate químico de la antracnosis de Sansevieria trifasciata var. Hahnii en un sistema de hojas separadas. *Agronomía Mesoamericana*, *26*(2), 305-313.

https://www.redalyc.org/pdf/437/43738993011.pdf

Puga-Muima, A. y Chalco-Sandoval, W. (2021). Manejo poscosecha de granadilla en la parroquia Yangana, cantón y provincia de Loja. *Revista Investigación Agraria, 3*(1), 7-15.

https://doi.org/10.47840/ReInA.3.1.1059

Quintero-Mercado, A., Dangon-Bernier, F. y Páez-Redondo, A. (2019). Aislamientos endofíticos de *Colletotrichum* spp. a partir de hojas y ramas de mango (*Mangifera indica* L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *43*(166), 65-77.

https://raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/788/544

Ramírez, D. (2018). *Detección temprana de Botrytis en dos variedades de clavel utilizando la cámara húmeda con dos rangos de humedad relativa en la compañía Sunshine Bouquets S.A.S.* [Tesis de Pregrado, Universidad de Cundinamarca]. Repositorio Institucional - Universidad de Cundinamarca.

Ramírez-Olier, J., Trujillo-Salazar, J., Osorio-Echeverri, V. y Jaramillo-Ciro, M. B.-B. (2019). In vitro antagonism of Trichoderma asperellum against Colletotrichum gloeosporioides, Curvularia lunata, and Fusarium oxysporum. *UIS Ingenierías, 18*(2), 159-165.

https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=553762533016

Realpe, M. (2020). *Efecto de dos niveles de N y K con fertirriego en el rendimiento de la granadilla (Passiflora ligularis Juss.) Fase I* [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Institucional - Universidad Central del Ecuador.

Revelo, E. (2014). *Caracterización genética de Colletotrichum spp. agente causal de antracnosis en tomate de árbol (Solanum betaceum) en el valle de Sibundoy, Putumayo* [Tesis de Pregrado, Universidad de Nariño]. Repositorio Institucional - Universidad de Nariño.

Rodríguez, G. (2020). *Concentraciones de aceite esencial de Rosmarinus officinalis sobre el crecimiento micelial de Colletotrichum gloeosporioides, in vitro, en Trujillo, La Libertad* [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio Institucional - Universidad Nacional de Trujillo.

Rodríguez-López, É., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Delgado, S., Guitiérrez-Diez, A. y Mayek-Pérez, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). *Jaboticabal*, *35*(3), 898-905.

https://www.scielo.br/j/rbf/a/3m6hHrsPpdKxZXb6bBw3qyF/?lang=es&format=pdf

Rondón, O., Sanabria, N. (2016). Respuesta in vitro a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía Trop, 56*(2), 219-235.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002192X2006000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Salinas, F. (2019). *Determinación de una dosificación de Trichoderma para tratamiento de suelos contaminados con piretroides* [Tesis de Pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Institucional - ESPOCH.

Santacruz, C. (2013). Caracterización morfológica, patogenia y molecular de especies de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *Capsicum* spp. en el valle del Cauca. *Journal of Chemical Information and Modeling, 53*(9), 1689-1699.

https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F., Ulloa, J., Ramírez-Ramírez, J., Ragazzo-Sánchez, J., Calderón, S. M. y Bautista, P. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (19), 3953-3964.

https://www.redalyc.org/pdf/2631/263153823009.pdf

Vaca, P. (2018). *Determinar la principal plaga del cultivo de granadilla (Passiflora ligularis), en la zona de Cahuasqui, cantón Urcuquí, provincia Imbabura* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Babahoyo]. Repositorio Institucional – Universidad Técnica de Babahoyo.

Valdés, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de Trichoderma como control biológico. *Agroecosistemas*, *2*(1), 254-264.

Varela, M. (2021). *Evaluación de la efectividad de Trichoderma spp para el control del complejo de hongos causantes de la pudrición basal en Gypshofilla (Gypshophila paniculata), parroquia Chávezpamba, San José de Minas* [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica del Norte]. Repositorio Institucional – Universidad Técnica del Norte.

Violeta, M., Cisterna, V. y France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos.* Chile, Editorial INIA.

https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/67165

Yumbay, R. (2011). *Evaluación de cepas de Trichoderma spp. en el control de Botrytis cinerea en el cultivo de rosas* [Tesis de Pregrado, Escuela Politécnica del Ejército]. Repositorio Institucional – ESPE.

ANEXOS

Anexo 1

Recolección de hojas con síntomas de antracnosis



Anexo 2

Siembra de la zona infectada en plato petri con medio de cultivo





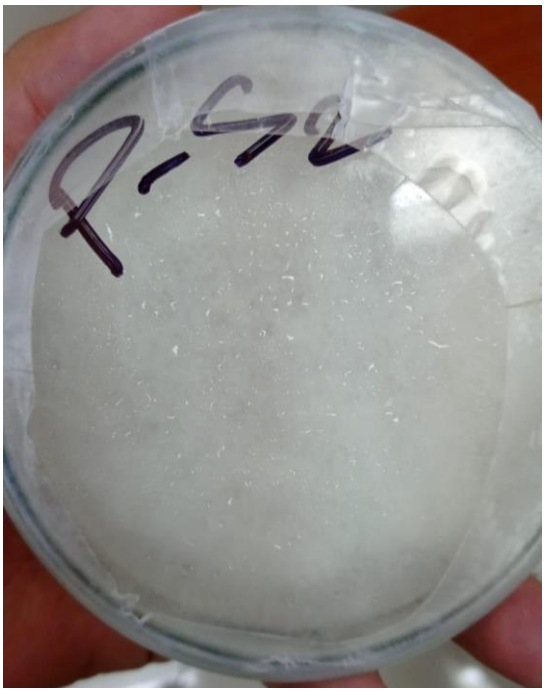
Anexo 3

Crecimiento del aislamiento de la zona infectada por C. gloeosporioides Penz



Anexo 4

Crecimiento de la muestra purificada del fitopatógeno



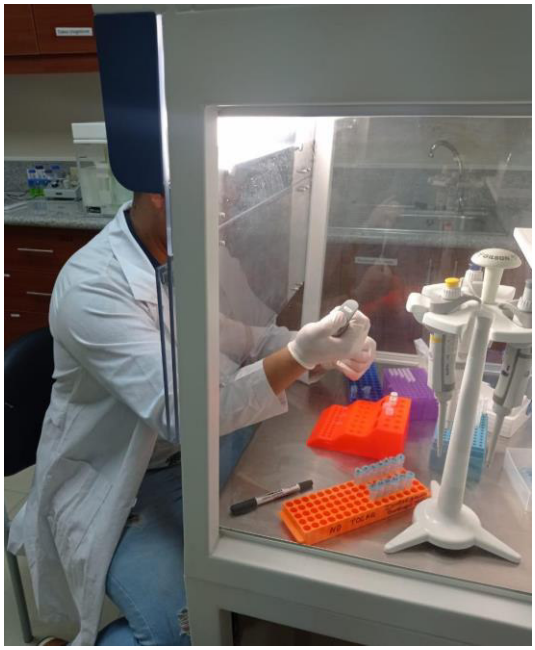
Anexo 5

Siembra de C. gloeosporioides Penz *en caldo nutritivo*



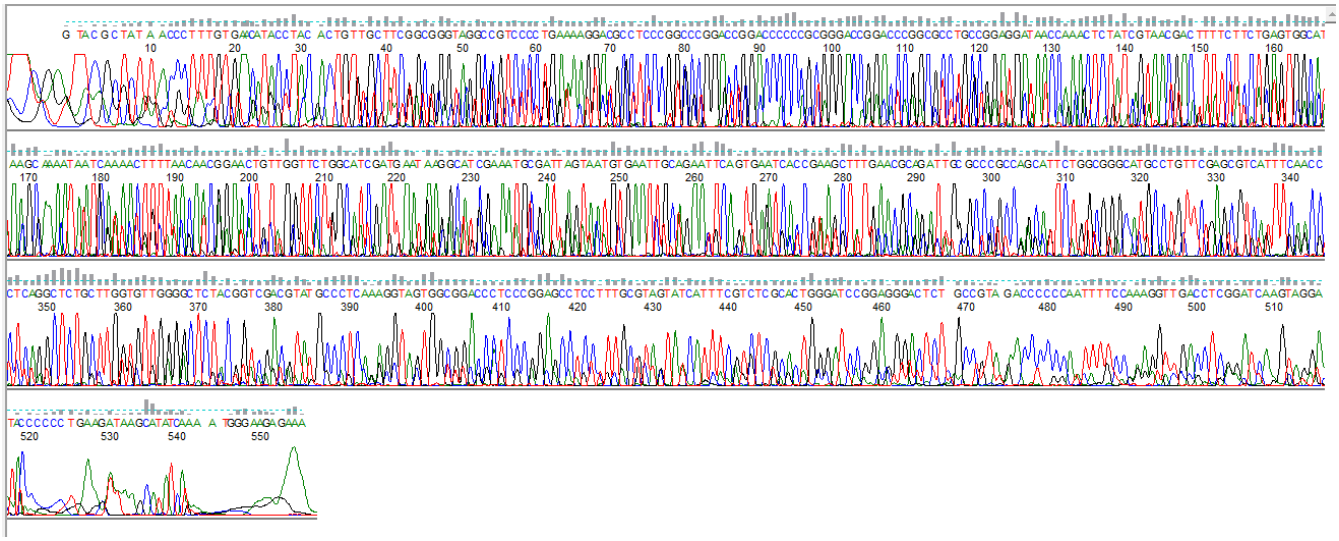
Anexo 6

Extracción de ADN del patógeno



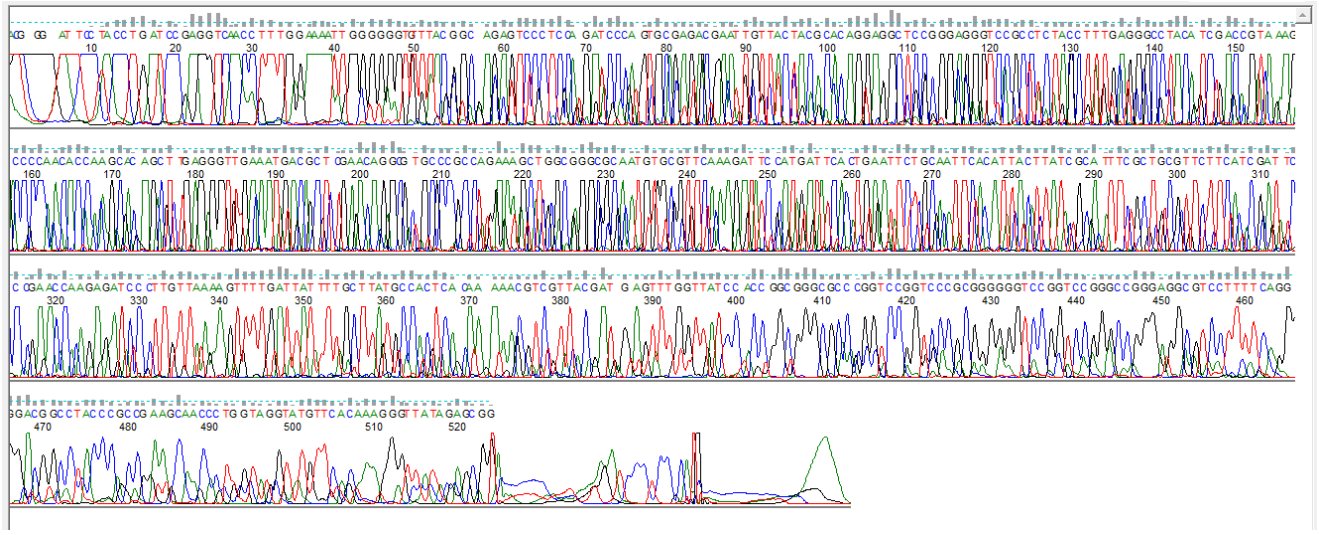
Anexo 7

Amplificación de la secuencia del primer ITS 1



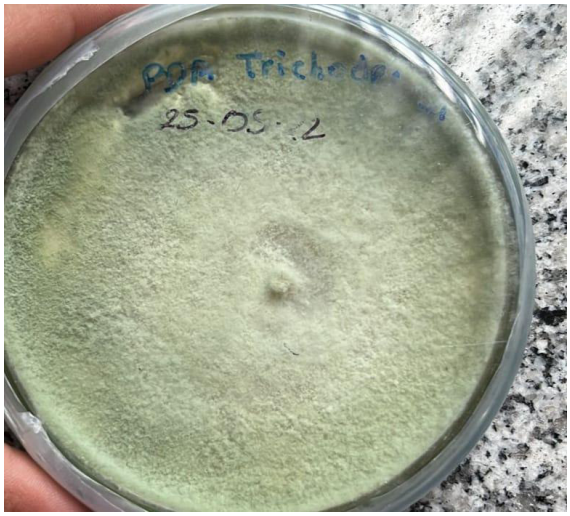
Anexo 8

Amplificación de la secuencia del primer ITS 4



Anexo 9

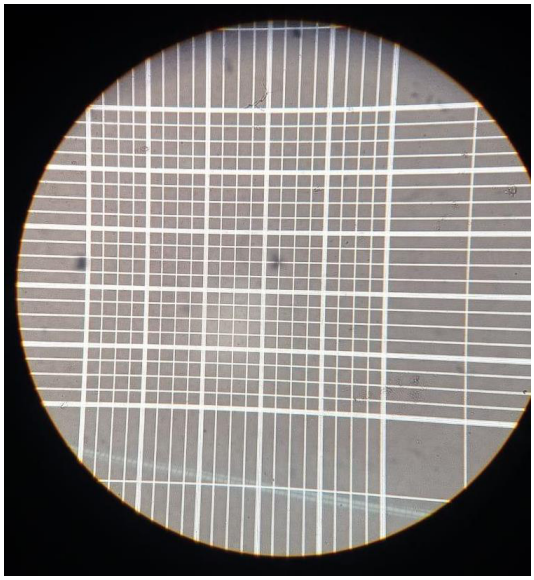
Cepa de Trichoderma spp. y crecimiento en caldo nutritivo





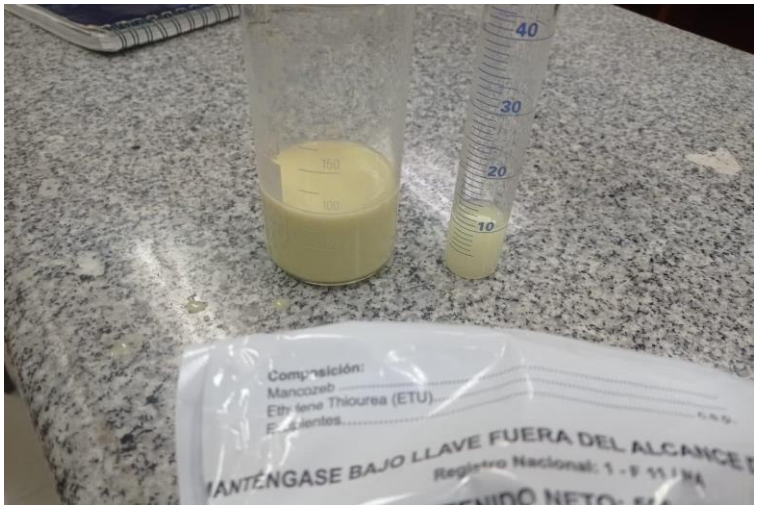
Anexo 10

Conteo de esporas del antagonista



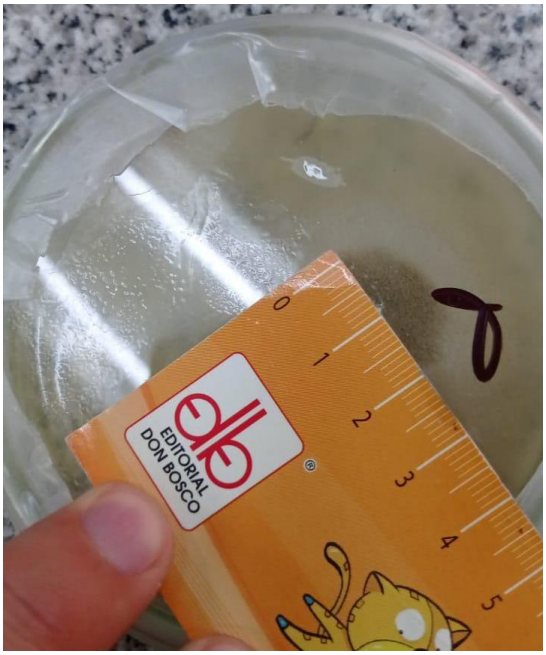
Anexo 11

Dosis del control químico



Anexo 12

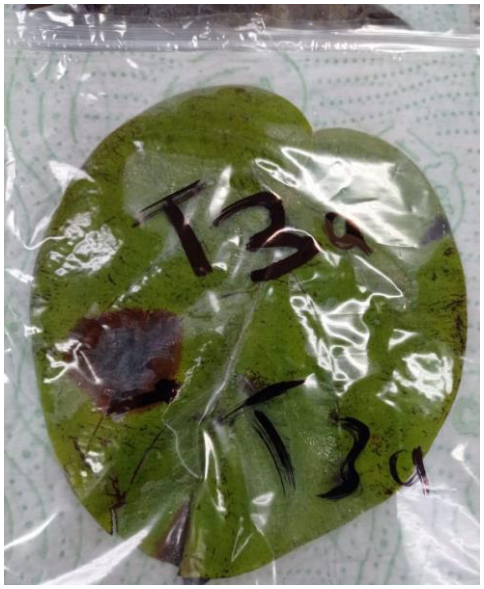
Medición del crecimiento micelial del patógeno



Anexo 13

Relación de crecimiento de la lesión (cm) en cámaras húmedas





Anexo 14

Tabla de crecimiento en la técnica de cultivos duales

	CRECIMIENTO MICELIAL (cm)						
	TRATAMIENTO	Rep 1	Rep 2	Rep 3	SUMA	PROMEDIO	SD
DÍA 3	T1	2	2,5	2	6,5	2,167	0,289
	T2	2	1,5	2	5,5	1,833	0,289
	T3	2	1,5	1,5	5	1,667	0,289
	T4	2	2,5	2,5	7	2,333	0,289
DÍA 5	T1	3	3	3,5	9,5	3,167	0,289
	T2	3	2,5	3	8,5	2,833	0,289
	T3	2,5	2,5	2	7	2,333	0,289
	T4	3	3,5	3	9,5	3,167	0,289
DÍA 7	T1	5	5	5	15	5,000	0,000
	T2	3,5	3	3,5	10	3,333	0,289
	T3	3	2,8	2,3	8,1	2,700	0,361
	T4	4	4	4	12	4,000	0,000
DÍA 10	T1	7	6	7,5	20,5	6,833	0,764
	T2	4	3,5	4	11,5	3,833	0,289
	T3	3,5	3	2,5	9	3,000	0,500
	T4	5	4,5	4,7	14,2	4,733	0,252

Anexo 15

Tabla de crecimiento de la lesión en cámaras húmedas

	CRECIMIENTO DIAMETRAL DE LA LESIÓN (cm)						
	TRATAMIENTO	Rep 1	Rep 2	Rep 3	SUMA	PROMEDIO	SD
DÍA 0	T1	1,5	2	2	5,5	1,833	0,289
	T2	2	1	1,5	4,5	1,500	0,500
	T3	1,2	2	0,7	3,9	1,300	0,656
	T4	1	2	3,5	6,5	2,167	1,258
DÍA 3	T1	1,5	2,5	2,8	6,8	2,267	0,681
	T2	3,5	3	2,5	9	3,000	0,500
	T3	2,8	3	2,5	8,3	2,767	0,252
	T4	3	4,5	6	13,5	4,500	1,500
DÍA 5	T1	2	3	3,5	8,5	2,833	0,764
	T2	4	4	3,5	11,5	3,833	0,289
	T3	4	5	4	13	4,333	0,577
	T4	6	6,5	7,5	20	6,667	0,764
DÍA 7	T1	2,5	3,5	4	10	3,333	0,764
	T2	5	5	5	15	5,000	0,000
	T3	6	6,8	6	18,8	6,267	0,462
	T4	7,5	8	9	24,5	8,167	0,764
DÍA 10	T1	3	4,5	4,5	12	4,000	0,866
	T2	6,5	6	6	18,5	6,167	0,289
	T3	7,5	8	7	22,5	7,500	0,500
	T4	9	9,5	10,5	29	9,667	0,764

Crecimiento final de la lesión	T1	1,5	2,5	2,5	6,5	2,167	0,577
	T2	4,5	5	4,5	14	4,667	0,289
	T3	6,3	6	6,3	18,6	6,200	0,173
	T4	8	7,5	7	22,5	7,500	0,500