PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* en flores de corte de la empresa Utopía Farms, Quito, Ecuador.

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

BRYAN ANDRÉS SANGOQUIZA CHUSÍN

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que, la disertación de Microbiología del candidato Bryan Andrés Sangoquiza Chusín, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Jeniffer Yánez Altuna

Directora de la Disertación Quito,

19 de agosto de 2023

DEDICATORIA

Para mis padres, Rolando Sangoquiza y Patricia Chusín quienes inculcaron sus valores en mí, me han enseñado a no darme por vencido, y con gran esfuerzo hicieron posible que termine mis estudios y que continúe con cada meta en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mis padres y hermano que siempre fueron los que me motivaron para que siguiera adelante, pese a las circunstancias en las que nos encontrábamos, me daban aliento y me recordaban la importancia que tenía esta carrera en mi vida.

A mi mamá que siempre estuvo apoyándome y regañándome para que diera mi máximo esfuerzo por la carrera. A mi padre que pese a las dificultades que atravesamos siempre estuvo ayudándome y apoyándome para que no me diera por vencido.

A mi hermano Dilan, que pese a su corta edad y llevarle una enorme diferencia de edad, siempre se interesó en cada proyecto que yo elaboraba, le interesa saber mucho más y es por él que investigaba más para tener una respuesta a cada pregunta que hacía.

También a la Mtr Jeniffer Yánez, mi directora de disertación, a quien agradezco por darme el apoyo y la confianza con este proyecto y por saber aconsejarme y darme seguimiento a lo largo de la carrera.

A mi novia Jessica Guevara, quien en mis últimos semestres me apoyó y me mostró lo que significa no rendirse, que con su esfuerzo me demostró que cada persona tiene su tiempo y su ritmo, no hay que presionarse por llegar, sino saber hacerlo.

A Alexis Quintana, quien ha sido un gran amigo, me ha apoyado con la realización de este proyecto, sin su ayuda seguramente me habría estancado.

A mis amigas Sharon Villamarín, Doménica Aguilar, Gaby Felicita, Ana Ortega, Daniela Guarderas. Sofía Quintana, Ivonne Iza y Shirma Caicedo quienes fueron un gran apoyo y me ayudaron a no sentirme solo.

Al grupo Esmeralda de la empresa UTOPIA FARMS UTF S.A.S quienes me suministraron todo lo necesario para que pueda realizar los ensayos pertinentes.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN 1

2. ABSTRACT 2

3. INTRODUCCIÓN 3

3.1 FLORES DE CORTE 3

3.2 PROBLEMAS FITOSANITARIOS 3

3.3 RIESGO BIOLÓGICO DE *SCLEROTINIA* 4

3.4 CONTROLADORES BIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA 5

4. OBJETIVOS 6

4.1 OBJETIVO GENERAL 6

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 6

5. MATERIALES Y MÉTODOS 7

5.1. ELABORACIÓN DE TRAMPAS, SIEMBRA Y RECOLECCIÓN 7

5.2. AISLAMIENTO DE BIOCONTROLADORES 8

5.3. EVALUACIÓN DEL HONGO BIOCONTROLADOR 9

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 10

5.5. ANÁLISIS MOLECULAR 10

5.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO 11

6. RESULTADOS 12

6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS 12

6.2. PRUEBAS PRELIMINARES DE ANTAGONISMO 14

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 16

6.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR..... 17

7. DISCUSIÓN..... 19

8. CONCLUSIONES..... 23

9. REFERENCIAS..... 24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de esclerocio trampa 7

Figura 2. Cultivos muestreados 8

Figura 3. Aislamiento de hongos. 9

Figura 4. Representación del cultivo dual 10

Figura 5. Purificación de hongos 12

Figura 6. Microscopia de hongos. 12

Figura 7. Enfrentamientos de hongos aislados contra la cepa P3 14

Figura 8. Comparación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los enfrentamientos de hongos 15

Figura 9. Pruebas duales de los mejores biocontroladores 15

Figura 10. Electroforesis 17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción macroscópica de los hongos aislados en plato Petri con APG 13

Tabla 2. Prueba de normalidad 16

Tabla 3. Prueba de homogeneidad de varianzas 16

Tabla 4. Esquema del ANOVA 16

Tabla 5. Prueba post hoc de Tukey $p<0.05$ 17

Tabla 6. Mejores cepas contra el fitopatógeno 18

1. RESUMEN

Los cultivos de flores de corte son uno de los productos más importantes por su alto valor en mercados internacionales. Las flores de Ecuador se encuentran entre las más solicitadas en el mercado mundial, por lo tanto, el cuidado de la calidad es indispensable. Las flores de corte al igual que otros cultivos de exportación son sensibles a plagas y enfermedades, las cuales en la mayoría de los casos son controladas con agentes químicos. El hongo del género *Sclerotinia* es uno de los mayores patógenos en las plantaciones de la Serranía ecuatoriana, con gran capacidad destructiva dentro de los campos. Por ello, la necesidad de identificar controladores biológicos endémicos capaces de inhibir el crecimiento de *Sclerotinia*, así como también, identificarlos morfológica y molecularmente. En este estudio se empleó la técnica de esclerocio trampa con esclerocios de *S. sclerotiorum* para capturar hongos benéficos que cuenten con predilección por dicho patógeno. Las trampas fueron instaladas de forma adyacente a plantas infectadas, se aislaron treinta y un hongos endémicos. Se empleó Agar Papa Glucosado para su cultivo y posterior identificación. El antagonismo fue evaluado mediante cultivos duales entre los aislados y la cepa de *S. sclerotiorum*. Los mejores antagonistas fueron identificados molecularmente como *T. asperellum (*P6, P5 y T13), *T. yunnanense* (P8) y *T. virens* (T1). Estos registraron valores superiores al 50% del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) frente al fitopatógeno *S. sclerotiorum* a nivel de laboratorio. Por tanto, se recomienda corroborar la información a nivel de campo, para el uso de estos microorganismos como controladores biológicos en cultivos de flores de corte.

PALABRAS CLAVE. – Flor de corte, control biológico, fitopatógenos, *Sclerotinia*, *Trichoderma* spp.

2. ABSTRACT

Cut flower crops are one of the most important products due to their high value in international markets. The flowers of Ecuador are among the most requested in the world market, therefore, quality care is essential. Cut flowers, like other export crops, are sensitive to pests and diseases, which in most cases are controlled with chemical agents. The fungus of the genus *Sclerotinia* is one of the major pathogens in the plantations of the Ecuadorian Andes, with great destructive capacity within the fields. Therefore, the need to identify endemic biological controllers capable of inhibiting the growth of Sclerotinia, as well as to identify them morphologically and molecularly. The sclerotia trap technique with *S. sclerotiorum* sclerotia was used to capture beneficial fungi that have a predilection for said pathogen. The traps were installed adjacent to infected plants, thirty-one endemic fungi were isolated. Potato Glucose Agar was used for culture and subsequent identification. Antagonism was evaluated by dual cultures between the isolates and the *S. sclerotiorum* strain. The best antagonists were molecularly identified as *T. asperellum* (P6, P5 and T13), *T. yunnanense* (P8) and *T. virens* (T1). These registered values higher than 50% of the percentage of inhibition of radial growth (PICR) against the phytopathogen S. sclerotiorum at laboratory level. Therefore, it is recommended to corroborate the information at the field level, for the use of these microorganisms as biological controllers in cut flower crops.

KEYWORDS. – Cut flower, biological control, phytopathogens, *Sclerotinia*, *Trichoderma* spp.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 FLORES DE CORTE

Las flores de corte son las flores o capullos que se usan para la decoración de interiores. Ejemplos de importantes de flores de corte son rosa, crisantemo, tulipán, lilium, clavel, girasol y orquídea (Cortez, 2013). Son un cultivo especializado que genera mayores ingresos por acre en comparación con la mayoría de las hortalizas (Villavicencio, Carrión, Salcedo-Muñoz y Sotomayor-Pereira, 2021)

Su cultivo en el Ecuador y en especial la rosicultura ha mantenido un crecimiento constante en los últimos años, incrementándose las hectáreas de siembra. En la actualidad se genera alrededor de 3284 hectáreas, y esta exportación coloca al país en el tercero a nivel mundial. En 2019, el país exportó aproximadamente $673 mil dólares en flores cortadas, convirtiéndose en el mayor exportador de este tipo de producto en el mundo. Ese mismo año, las flores cortadas fue el producto mayor demanda en nuestro país (Carrillo Criollo y Yumbla-Orbes, 2022).

3.2 PROBLEMAS FITOSANITARIOS

Como la gran mayoría de plantas en el mundo, las flores de corte tienden a estar en constante ataque de una gran variedad de patógenos, la mayoría de estos suelen ser algunos virus, el virus del Moteado del Clavel (CaMV) reduce la productividad del sembrío en flores de corte y el virus del Marchitamiento Punteado del Tomate (TSWV) que se puede encontrar en plantas del género *Chrysanthemum*, *Gypsophila* y *Aster* (Garces de Granada, Orozco de Amezquita y Zapata, 1999), bacterias como *Erwina, Pseudomonas, Xanthomonas,* etc (González y Echandi, 1989). También existen varios hongos como *Alternaria*, *Fusarium, Puccinia*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*, estos últimos son capaces de causar enfermedades a las plantas que producen flor de corte.

Sclerotinia sp. es un hongo que pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Discomycetes, orden Helotiales y familia Sclerotiniaceae (Patiño, Nieto-Ramirez, Chegwin-Angarita y Torres-Rojas, 2020). Los representantes de *Sclerotinia* no pueden producir conidios; sin embargo, tienen la capacidad de desarrollar esclerocios diploides de color negro, con contornos redondeados irregulares. *Sclerotinia* agrupa aproximadamente 250 especies que causan enfermedades en cultivos tropicales y subtropicales (Ding et al. 2021). *S. sclerotiorum* y *S. minor* son las especies más conocidas por causar la podredumbre húmeda o también

conocida como moho blanco. Los primeros síntomas de una infección son lesiones llenas de agua en la base del tallo. A su vez, el capítulo de la planta se marchita y pudre. En las lesiones crecen micelios fúngicos algodonosos y blancos, de allí el nombre de la enfermedad. En el micelio se forman esclerocios oscuros y grandes, estos se observan a simple vista y tienen apariencia a excremento de rata. Los síntomas pueden ocurrir en los tallos, en las hojas, los frutos y las vainas. Las infecciones radiculares suelen provocar un marchitamiento y muerte prematura de las plantas (Ayala Armenta. et al., 2015). Se trata de una enfermedad con la capacidad de atacar a un gran número de plantas, indiferentemente de que sean hortalizas, frutas u ornamentales (Filippi, 2015).

3.3 RIESGO BIOLÓGICO DE *Sclerotinia*

Esta enfermedad ocurre en la mayoría de las zonas de cultivos de girasol (*Helianthus annuus*), a pesar de ello también afecta a las plantas de los géneros *Hypericum*, *Aster*, *Trachelium* (Maldonado Arteaga, 2020). Esta enfermedad afecta marcadamente a la calidad de producción de las plantas y en los peores casos esta muere (Pieckenstain, 2002). El impacto económico es severo, de manera que cuando no se trata al patógeno *Sclerotinia* a tiempo se convierte en una barrera significativa para la productividad del cultivo. Sin duda, el moho blanco es muy perjudicial en caso de un fuerte ataque. Por ejemplo, se ha registrado pérdidas que alcanzan el 20 % en cultivos de soya, es decir, un perjuicio de centenares de millones de dólares (Ordóñez-Valencia, Ferrera-Cerrato, Alarcón, Hernández-Cuevas y Larsen, 2018). En el caso de las flores de corte, si las condiciones climáticas son favorables para el patógeno, puede comprometer hasta el 32 % de la cosecha (Maldonado Arteaga, 2020). La durabilidad que los esclerocios (forma infectiva del hongo patógeno) posee, puede durar hasta 10 años sin en el suelo sin afectar su estructura. Este antecedente, hace que el control de este fitopatógeno sea de cuidado, ya que la enfermedad del moho blanco es un gran peligro entre los agricultores (Sarlangue, 2007). Los métodos convencionales como el tratamiento químico con procimidona (fungicida más usado para los cultivos de flor de corte) o tratamiento físico (solarización) ayudan a disminuir la cantidad de esclerocios viables en el suelo con el objetivo de atenuar la incidencia de esta enfermedad. No obstante, los tratamientos químicos del suelo no han dado resultados positivos y son sumamente costosos, por no mencionar el daño que estos producen al planeta (Pieckenstain, 2002).

3.4 CONTROLADORES BIOLÓGICOS COMO ALTERNATIVA

En el marco del control biológico, se han identificado más de 30 especies de hongos y bacterias como antagonistas y micoparásitos de *S. sclerotiorum* (García, Estepa y Leal, 2019). La mayoría de los agentes antagonistas utilizados en control biológico son saprófitos gracias a su facilidad de adaptación al medio y a su alta capacidad de competencia por nutrientes frente a otros organismos (Pérez-Moreno, Belmonte-Vargas, Núñez-Palenius, Guzmán-Mendoza y Mendoza-Celedón, 2015).

El control biológico es una alternativa potencial para el manejo de la enfermedad producida por *Sclerotinia,* que involucra la utilización de hongos como *Trichoderma* spp. y *Coniothyrium minitans*. (Moreno, Aguilera y Pale, 2004). Los microorganismos más eficientes para un control biológico se hallan en el propio suelo y son importantes para tratar la enfermedad que se transmiten principalmente por este medio, gracias a que algunos de ellos poseen capacidades antagónicas (MorenoVelandia, Cotes, Beltrán-Acosta, Bettiol, y Elad, 2018). En este contexto, el presente trabajo de investigación tiene como propósito identificar los controladores biológicos más eficaces que se deben emplear en los cultivos de flor de corte para disminuir los daños causados por la enfermedad del moho blanco.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar biocontroladores con potencial inhibidor de *Sclerotinia* en flores de corte de las fincas de la empresa UTOPÍA Farms.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar la especie fitopatógena del género *Sclerotinia* que afecta a las flores de corte mediante esclerocio trampa y técnicas moleculares.

Determinar los mejores biocontroladores para *Sclerotinia* mediante cultivos duales y análisis moleculares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento de los controladores biológicos se realizó en las fincas Chivan, Perucho y La Tolita ubicadas en la Provincia de Pichincha, Cantón Quito, Parroquia El Quinche. Estos sitios fueron seleccionados por contar con cultivos de flores de corte como *Hypericum, Trachelium* y *Aster*. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Suelos de la empresa UTOPIA FARMS UTF S.A.S y en el Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontifica Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

5.1. ELABORACIÓN DE TRAMPAS, SIEMBRA Y RECOLECCIÓN

Previamente, el laboratorio de suelos del grupo Esmeralda realizó una recolección de material vegetal contaminado con esclerocios, semillas, raíces y tallos de plantas de girasol. Estos esclerocios fueron procesados en el laboratorio siguiendo la técnica del esclerocio trampa propuesta por Allori Stazzonelli, Yasem de Romero y Ploper (2017). Para la germinación de los esclerocios se ubicaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente (24°C±3) por tres semanas. Los esclerocios se identificaron morfológicamente como del género *Sclerotinia* sp. Las trampas se construyeron utilizando bolsas de nylon de malla fina de 1 mm de sección del poro. En cada bolsa se colocaron cinco esclerocios germinados de *Sclerotinia,* las cuales fueron enterradas a una profundidad de 5 a 10 cm (Figura 1). Se realizaron cuatro repeticiones por finca, llegando a un total de 20 esclerocios por sitio (Figura 2).

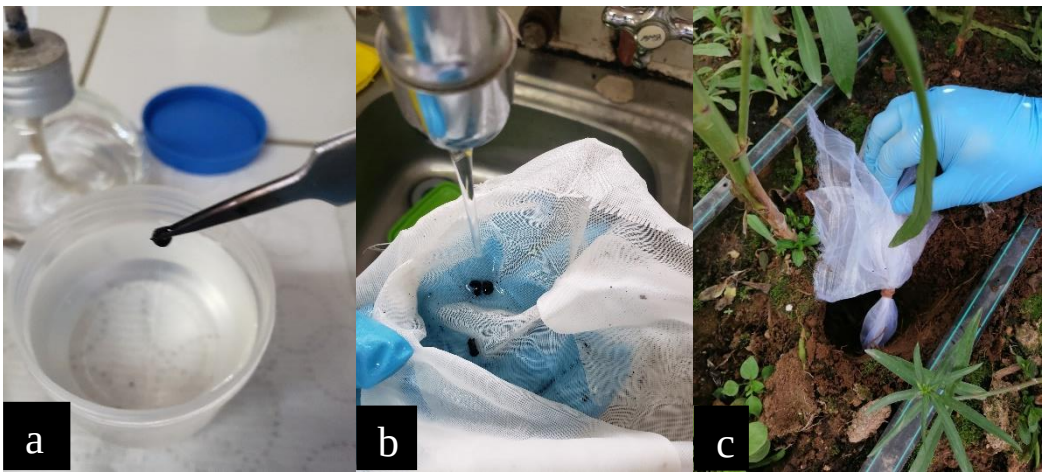


Figura 1. Técnica de esclerocio trampa. (a) Desinfección de esclerocios con hipoclorito de sodio al 1%. (b) Lavado de los esclerocios colectados luego de la siembra. (c) Siembra de las trampas en cultivos aledaños a la enfermedad.



Figura 2. Cultivos muestreados. Cultivos en los que se sembraron las trampas, sin fumigar por 2 semanas.

5.2. AISLAMIENTO DE BIOCONTROLADORES

Luego de dos semanas, las bolsas fueron retiradas y los esclerocios lavados con agua corriente y secados durante dos días a temperatura ambiente. Después se los desinfectó superficialmente, por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante cuatro minutos, seguido de cuatro inmersiones en agua destilada estéril para evitar el efecto residual del desinfectante (Allori Stazzonelli, Yasem de Romero y Ploper, 2017). Los esclerocios desinfectados se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG por sus siglas en inglés) e incubados a 25 ± 2 °C (Figura 3) (Ibarra-Medina, Ferrera-Cerrato, Alarcón, Lara-Hernández y Valdez-Carrasco, 2010).

Entre los 5 y 7 días posteriores a la incubación se realizó el aislamiento de los crecimientos miceliales que sobresalían en la superficie de los esclerocios y en el medio de cultivo circundante. El tejido fúngico se inoculó en medio de cultivo APG para su purificación. Se incubaron a 25 ± 2 °C hasta que el crecimiento de las colonias llegue a cubrir el 50% de la caja Petri (Ibarra-Medina et al., 2010). Se realizó una descripción macroscópica de las mismas colonias obtenidas (Tabla 1), además de tinción con azul de lactofenol para verificar las condiciones del cultivo y desarrollo de estructuras.

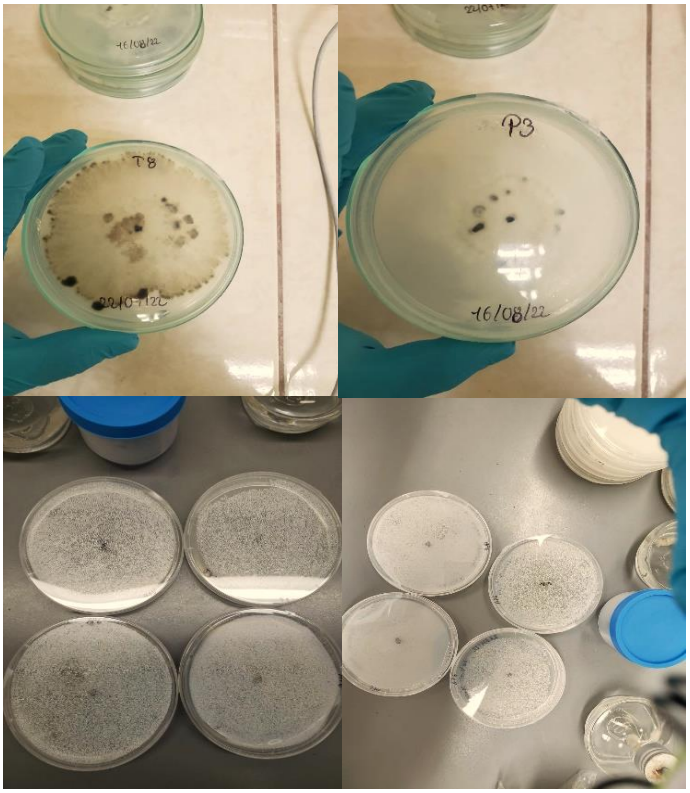


Figura 3. Aislamiento de hongos. Esclerocios sembrados en cajas Petri con agar APG, provenientes de cultivos aledaños a *Trachelium* infectados con *Sclerotinia*.

5.3. EVALUACIÓN DEL HONGO BIOCONTROLADOR

Cada hongo benéfico aislado se enfrentó a la cepa P3 de *Sclerotinia* sp. (hongo aislado previamente en el laboratorio de suelos de la empresa), en cajas de Petri con el medio de cultivo APG (cultivo dual). La siembra se realizó con discos de 5 mm del micelio de los distintos hongos a probar. Estos se ubicaron de manera equidistante con el patógeno y a una distancia de 1 cm del a los extremos del plato (Figura 4). Los cultivos se incubaron durante 5 a 7 días a 20 ± 3 °C (Pieckenstain, 2002). Se estableció como control un disco de 5 mm del fitopatógeno de tres semanas de crecimiento colocado a 1 cm del borde en una caja con APG.

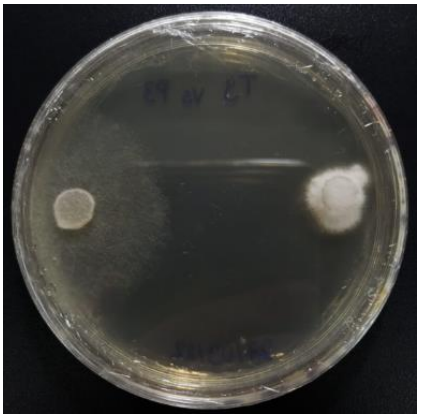


Figura 4. Representación del cultivo dual. Disco izquierdo (patógeno *Sclerotinia*) disco derecho (Potencial hongo benéfico).

Luego de los siete de incubación, se midió el radio de las colonias control y enfrentadas. La evaluación de la capacidad antagónica de los microorganismos aislados se realizó en base al protocolo empleado por Astorga-Quirós, Meneses-Montero, Zúñiga-Vega, Brenes-Madriz y Rivera-Méndez (2014). Los datos obtenidos se emplearon para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) en base a la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R2} . 100$$

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-control) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos se organizó un ensayo, donde se evaluó por triplicado a los hongos biocontroladores frente al hongo *Sclerotinia*. Se comprobó la homogeneidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y normalidad mediante la prueba de Levene. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey. Estas pruebas estadísticas se procesaron en el programa IBM SPSS Statistics 25, con un nivel de significancia de 95%.

5.5. ANÁLISIS MOLECULAR

La extracción de ADN de los hongos aislados se realizó en base al protocolo para plantas establecido en el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.). La calidad y concentración del ADN extraído de los hongos comprobó mediante espectrofotometría con el equipo *NanoDrop 2000* (ThermoScientific, 2015).

Se amplificó la región ITS (Internal transcribed spacers, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Castañeda, McEwen, Hidalgo y Castañeda, 2004). Los cebadores que se usaron fueron: ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' GGTCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White, Bruns, Lee y Taylor, 1990). A 20.5 µl de GoTaq polimerasa (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.) se añadió 1.25 µl de cada cebador y 2 µl de ADN hasta llegar a un volumen de 25 µl en cada tubo. La PCR se realizó en un termociclador *SimpliAmp* y se llevó a cabo 25 ciclos con los siguientes parámetros: desnaturalización a 95°C por un minuto, alineamiento a 95°C durante un minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C durante un minuto, extensión final a 72°C durante cinco minutos y se almacenó a 4°C (Bruns et al. 1999; Espinosa 2007).

Los productos amplificados se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 10), donde se usó una escalera molecular de 100pb, y se suministró una carga de 90 voltios durante una hora. El buffer de corrida fue una solución de acetato de tris EDTA (por sus siglas en inglés TAE) a 1X (Promega, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.) (Espinosa, 2007).

5.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La secuenciación se realizó por el método de Sanger en la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias recibidas se editaron y analizaron a través del programa MEGA X (Villegas-Rodríguez, et al., 2017). Posteriormente se comparó con las bases de datos disponibles en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y las secuencias que obtuvieron el mayor porcentaje de identidad se usaron para este estudio (Geer, et al., 2010).

6. RESULTADOS

6.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La técnica del esclerocio trampa recuperó varias especies de microorganismos adheridas a los esclerocios. Los microorganismos presentaron características fúngicas, lo que se determinó gracias a su visualización macroscópica (Figura 5). Las colonias se caracterizaron por su estructura algodonosa, de color verde y blanco. Los análisis de las características morfológicas determinaron la presencia del género *Trichoderma* al identificar hifas hialinas, conidióforos largos y fiálides en forma de matraz (Figura 6). Existieron cepas no identificadas morfológicamente por la nula presencia de estructuras al desarrollarse en el medio APG.

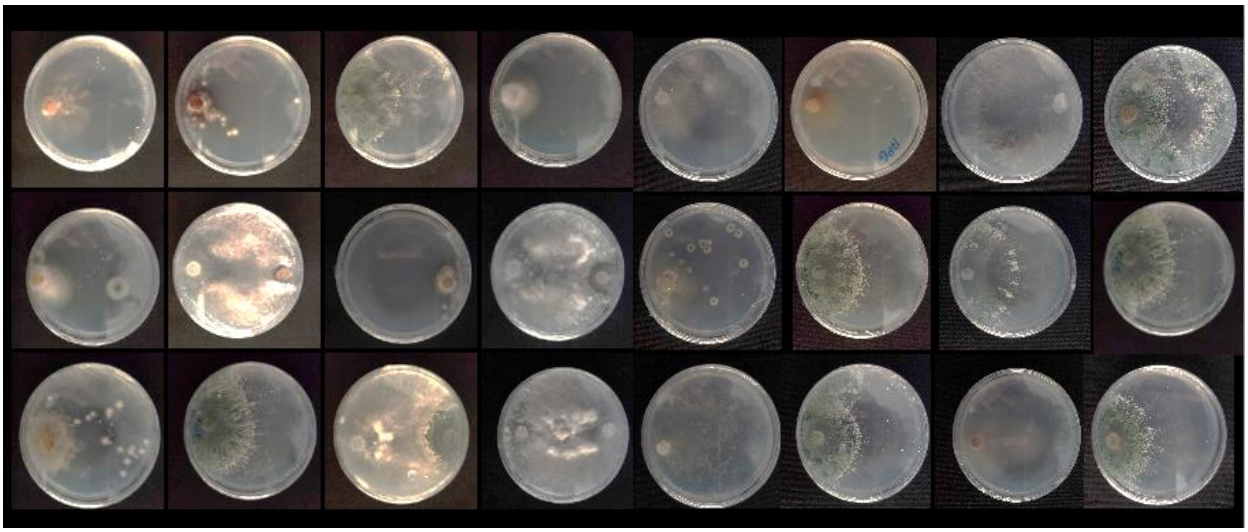


Figura 5. Purificación de hongos. Cajas Petri con cultivos fúngicos en agar APG, luego de tres semanas de crecimiento.

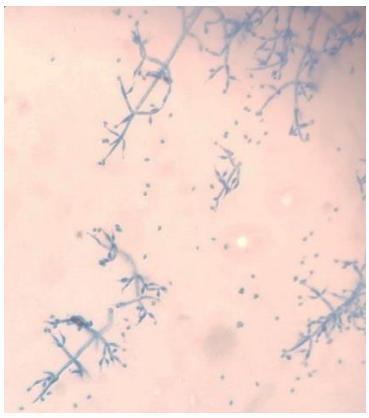


Figura 6. Microscopia de hongos. Estructuras de *Trichoderma* a un aumento de 40x.

Tabla 1. Descripción macroscópica de los hongos aislados en plato Petri con APG

Codificación	Crecimiento a 7 días	Color del anverso	Color del reverso	Característica del micelio	Forma de la colonia
C1	Limitado	Blanco	Café	Algodonoso	Circular
C2	Limitado	Blanco	Café	Algodonoso	Circular
C3	Invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
C4	Invasivo	Tomate/ Blanco	Café	Algodonoso	Irregular
C5	Invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
C6	Invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
C11	Limitado	Café	Café	Algodonoso	Circular
C12	Limitado	Rosado	Café	Algodonoso	Circular
C14	Limitado	Verde	Blanco	Algodonoso	Circular
P1	Limitado	Morado	Morado	Velloso	Irregular
P3	Invasivo	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
P5	Invasivo	Verde	Verde	Algodonoso	Circular
P6	Limitado	Verde	Verde	Algodonoso	Circular
P8	Invasivo	Verde	Blanco	Algodonoso	Circular
T2	Invasivo	Verde	Blanco	Algodonoso	Circular
T3	Limitado	Café	Café	Algodonoso	Circular
T4	Invasivo	Verde	Amarillo	Velloso	Circular
T5	Invasivo	Verde	Blanco	Algodonoso	Circular
T6	Limitado	Blanco	Amarillo	Algodonoso	Irregular
T8	Limitado	Blanco	Café	Velloso	Circular
T9	Limitado	Blanco	Café	Algodonoso	Circular
T11	Limitado	Amarillo	Café	Algodonoso	Irregular
T12	Invasivo	Blanco	Café	Algodonoso	Circular
T13	Invasivo	Verde	Blanco	Velloso	Irregular
T14	Invasivo	Verde	Blanco	Algodonoso	Circular
T15	Limitado	Rosado	Rosado	Algodonoso	Circular

Z7	Invasivo	Naranja	Blanco	Algodonoso	Circular
Z11	Limitado	Blanco	Blanco	Algodonoso	Circular
Z15	Limitado	Blanco	Blanco	Velloso	Circular

Los códigos asignados a los hongos aislados corresponden a las fincas donde fueron colectados C: Chivan, P: Perucho, T: La Tolita y Z: finca Chivan última siembra.

6.2. PRUEBAS PRELIMINARES DE ANTAGONISMO

Los hongos resultantes del aislamiento fueron enfrentados contra el hongo fitopatógeno. Se utilizó la cepa P3 (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Figura 7), que presentó un crecimiento masivo en placa a comparación de las demás cepas que generaron esclerocios, por lo que se decidió usarla para los ensayos.

La cepa C10 se registró como mejor antagonista al obtener 75.17% de inhibición al enfrentar a la cepa de *S. sclerotiorum*. Las cepas T13 y Z7 también registraron un porcentaje alto bordear el 70% (Figura 8). Con estos resultados se tomó a los hongos que obtenían un PICR de 50% o superior para ser aislados (Figura 9).

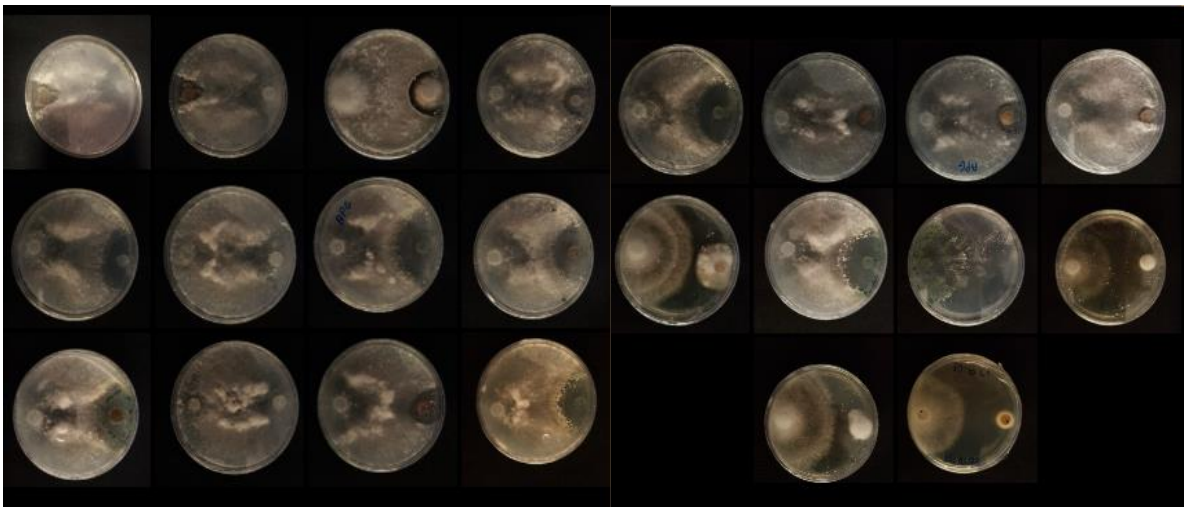


Figura 7. Enfrentamientos de hongos aislados contra la cepa P3. Cajas Petri con agar APG con cultivos duales.

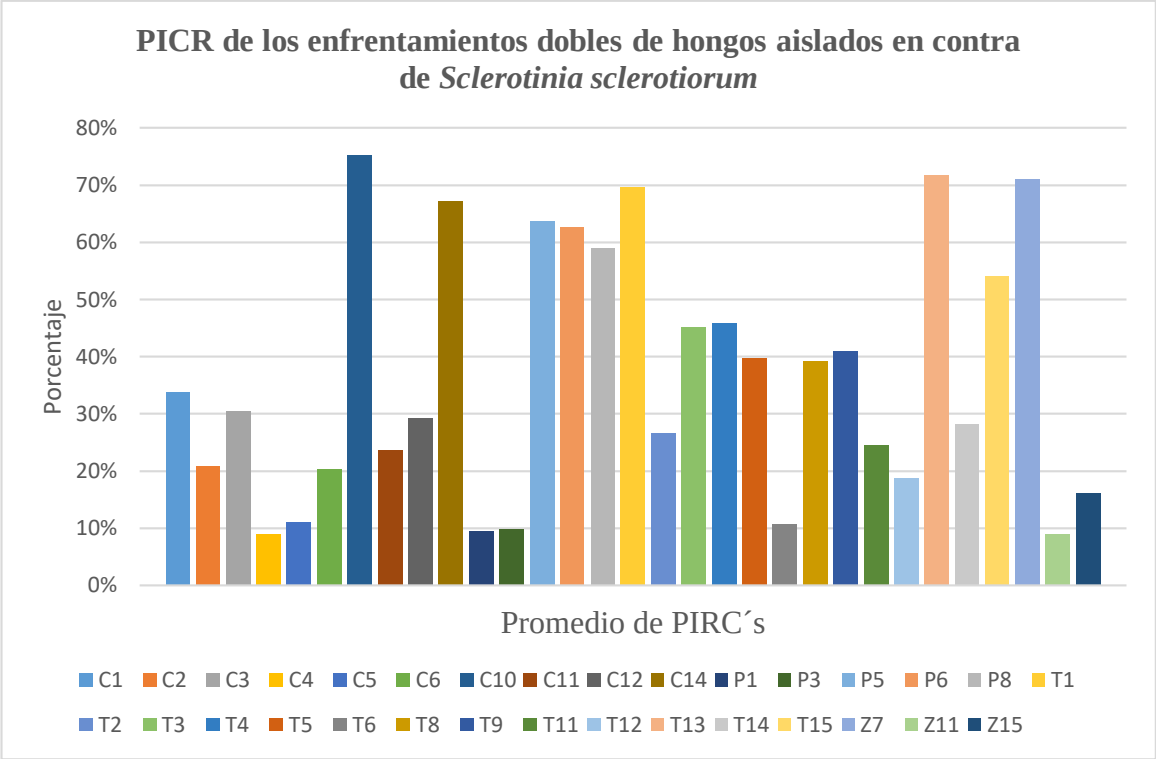


Figura 8. Comparación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los enfrentamientos de hongos. Los valores corresponden al porcentaje de inhibición de cada hongo con potencial controlador biológico ante *S. sclerotiorum* (cepa P3).

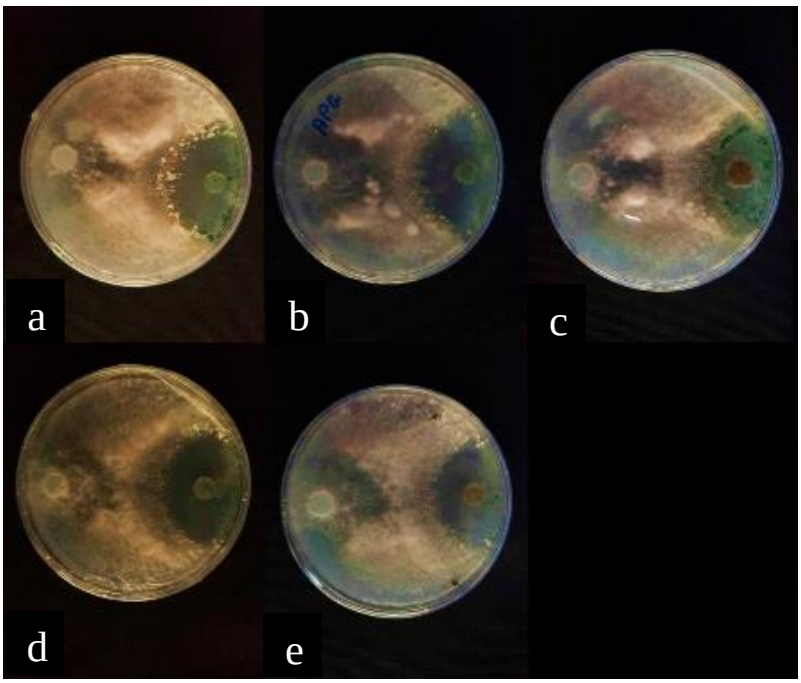


Figura 9. Pruebas duales de los mejores biocontroladores. (a) P8 contra P3, (b) P5 contra P3, (c) T13 contra P3, (d) P6 contra P3 y (e) T1 contra P3. Enfrentamiento de los hongos seleccionados por su alto potencial antagónico frente a *S. sclerotiorum* (cepa P3).

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos resultaron normales y homogéneos (Tabla 2 y 3), por lo cual se procedió a realizar el ANOVA, donde se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al compararlos con el control (Tabla 4). La prueba *post hoc* de Tukey reportó dos grupos a los valores de las medias obtenidas, que indica que tienen el mismo valor de significancia obtenida entre las medias. Además, se ubica a la cepa C10 como la más eficaz, mientras que menor rendimiento generó fue la cepa P8 (Tabla 5).

Tabla 2. Prueba de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
PIRC	,110	24	,200*	,927	24	,085

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla 3. Prueba de homogeneidad de varianzas

		Levene	gl1	gl2	Sig.
PIRC	Se basa en la media	1,376	7	16	,281
	Se basa en la mediana	1,376	7	16	,281
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,376	7	6,845	,344
	Se basa en la media recortada	1,376	7	16	,281

Tabla 4. Esquema del ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	614,793	7	87,828	3,614	,016
Dentro de grupos	388,831	16	24,302		
Total	1003,624	23			

Tabla 5. Prueba post hoc de Tukey p<0.05

TRATAMIENTO	N	1	2
P8	3	58,9417	
P6	3	62,5780	62,5780
P5	3	63,7449	63,7449
C14	3	67,1506	67,1506
T1	3	69,7151	69,7151
Z7	3	70,9498	70,9498
T13	3	71,6961	71,6961
C10	3		75,1696
Sig.		,086	,092

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

6.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los hongos que presentaron mejor respuesta inhibitoria ante *S. sclerotiorum* fueron seleccionados para la identificación molecular. La amplificación del ADN genómico reportó amplicones de ~500 pb (Figura 10) y las secuencias consenso resultantes correspondieron a distintas especies de hongos, los cuales se resumen en la Tabla 6.

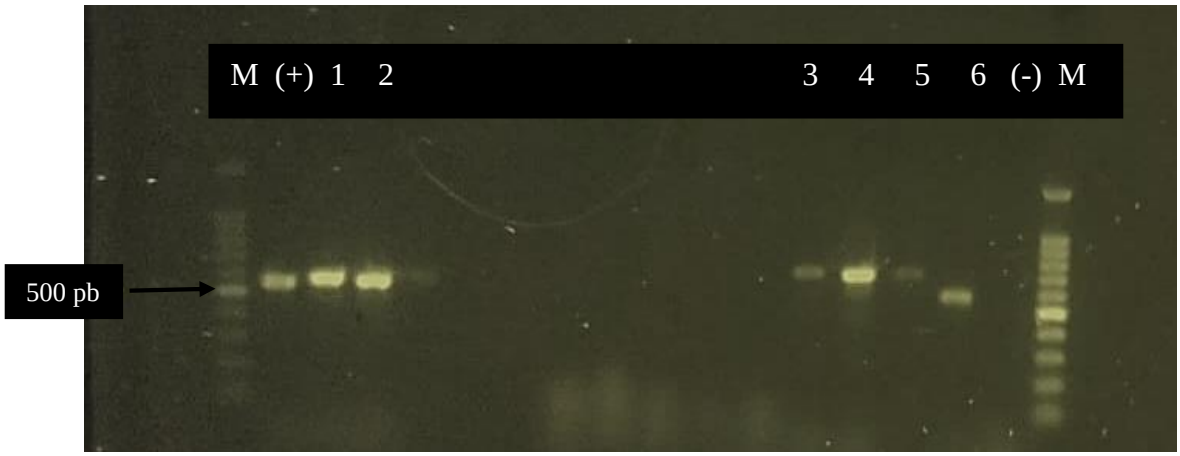


Figura 10. Electroforesis. Gel de agarosa de productos de PCR a partir de ADN obtenido de los hongos aislados. (M) Marcador molecular de 100pb; (-) control negativo (agua libre de nucleasas); (+) control positivo; carril 1 (*T. asperellum*); carril 2 (*T. virens*), carril 3(*B. bassiana*), carril 4 (*C. hyalocarpum*), carril 5 (*F.tonkinense*) y Carril 6 (*T. asperellum*).

El análisis que se realizó en la herramienta Blast de la base de datos del GenBank del NCBI, identificó género y especie de los hongos aislados. Entre las cepas encontradas está el género *Trichoderma*, el cual tiene historial de inhibición ante hongos fitopatógenos. El orden de las cepas se presenta de manera descendente según su efectividad en la Tabla 6.

Tabla 6. Mejores cepas contra el fitopatógeno

Controladores seleccionados	Porcentaje de PICR	Hongo identificado	Porcentaje de identidad
P8	58.94	*T. yunnanense*	98.46
P6	62.58	*T. asperellum*	95.76
P5	63.74	*T. asperellum*	98.74
C14	67.15	*P. lilacinum*	98.42
T1	69.72	*T. virens*	100
Z7	70.95	*A. gephyropaga*	78.57
T13	71.70	*T. asperellum*	99.63
C10	75.17	*C. hyalocarpum*	100

La tabla 6, además presenta los hongos identificados a nivel de género y especie. En los casos en que el porcentaje de identidad llega a un 99% o superior, se puede afirmar su especie. Para los valores que presentan un menor porcentaje se debe analizar otros genes, como el gen EF-1α o el gen GAPDH para hallar la especie (Granados-Montero, Chaves-Barrantes, Chaverri, Hernández-Fonseca, y Escudero-Leyva, 2021).

7. DISCUSIÓN

Sclerotinia sclerotiorum y *S. minor* son las responsables de causar la podredumbre en las plantas y son las especies que se encuentran con más frecuencia en plantaciones de flores de corte y económicamente son de sumo cuidado. Estas especies en particular se diferencian del resto por el tamaño de sus esclerocios y la gran cantidad de hospedadores que pueden afectar (Delhey, et al., 2009). Estos esclerocios pueden permanecer en el suelo por mucho tiempo y al ser ambas especies polífagas, su rango de contagio es mayor y puede tornar grandes problemas.

Patiño, Nieto-Ramirez, Chegwin-Angarita y Torres-Rojas (2020), mencionan que entre los organismos reportados como biocontroladores se encuentran los hongos. Estos pueden ser una fuente potencial de compuestos bioactivos, generalmente metabolitos secundarios con actividad antifúngica, es importante recalcar el hecho de que cada hongo tiene distinta capacidad antagónica y que en este estudio lo contempla guiándose en hechos de evaluación, ya sea por competencia o parasitismos, los hongos muestran distintas capacidades para enfrentar a otros y de esto puede salir un beneficio a las plantas ya que, en ciertos casos, no afectan a estas.

El medio de cultivo APG fue eficiente para el aislamiento de hongos en este estudio, se observó el crecimiento de colonias diferentes a *Sclerotinia*, y la selección como biocontrolador fue efectiva y las colonias crecen mucho más rápido que en PDA, según Olivos Terrones y Osorio Salazar (2021), el APG está diseñado para aislar y enumerar a los microorganismos de diversos tipos de preparados farmacéuticos y en diferentes tipos de alimentos. La composición del APG se basa en infusión de papa, glucosa y agar, que genera un abundante desarrollo de hongos y levaduras. Lo que lo hace óptimo para el aislamiento de *Sclerotinia* (Pieckenstain, 2002).

Sánchez-García, Espinosa-Huerta, Villordo-Pineda, Rodríguez-Guerra y Mora-Avilés (2017), mencionan que los hongos con la capacidad de inhibir el crecimiento de otros hongos patógenos deben superar el 50% del PICR. En el presente estudio se encontró ocho cepas (P8, P6, P5, C14, T1, Z7, T13, Y C10) que logran superar el 50% por lo que se decidió tomar en cuenta estos como un control eficaz contra *S. sclerotiorum*,

Para la caracterización molecular se amplificó la región ITS del ADN ribosomal (ADNr), estas zonas tienen mayor interés en estudios de taxonomía y filogenia de hongos, mientras que las zonas no codificantes del ARNr, son más utilizadas en investigaciones de

identificación y tipificación de estas especies (Iturralde, 2005). Las regiones ITS son consideradas como una secuencia universal de códigos de barras para especies fúngicas (Allende-Molar, Báez-Parra, Salazar-Villa, y Rojo-Báez, 2022).

En este estudio, obtuvimos organismos como *B. bassiana, F. equiseti, C. hyalocarpum, P. lilacinum,* y algunas especies de *Trichoderma* con porcentajes de identidad superiores al 98.5%, al igual que Suárez-Contreras y Peñaranda-Figueredo (2022), donde toman como referencia hongos que tengan un porcentaje de similitud de identidad superior o igual al 98% para un correcto estudio. No obstante, se obtuvo algunas especies que no superaron el valor requerido como el caso del hongo *T. asperellum* que solo obtuvo un 95.76%, en estos casos se opta por usar otros marcadores moleculares para tener un mejor resultado, tales como el gen EF-1α, que codifica para una proteína involucrada en la síntesis de proteínas y que presenta un nivel de variación intermedia (Granados-Montero, et al., 2021), el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), que codifica para una enzima involucrada en el metabolismo energético y que presenta un nivel de variación bajo (González-Molotla, Félix-Gastélum, Leyva-Madrigal, Quiroz-Figueroa, y Maldonado-Mendoza, 2021). Estos marcadores se pueden amplificar por PCR y secuenciar para compararlos con bases de datos genéticos y así determinar la identidad de los hongos (Leyva, Echandi, Vargas y Jiménez, 2020).

Los hongos *F. tonkinense* y *F. equiseti*que que obtuvieron un 8.95% de PICR cada uno, fueron seleccionados debido a que en un inicio se quiso hallar un hongo en específico y estos cumplían con toda la característica morfológica, tanto micro como macroscópica y se decidió enviar a secuenciar. La bibliografía es escasa en torno al caso de que el género *Fusarium* sea un potencial controlador, pero en este caso podemos aseverar de que la finca tiene problemas con este fitopatógeno al igual que *Sclerotinia*, y que ambos compitieron en el medio de cultivo APG y no se observó que tuvieran potencial de competencia ninguno de los dos.

La cepa *Cladorrhinum hyalocarpum* (C10) resultó ser la que mayor capacidad antagónica registró, con un PICR de 75.17%. Fue seleccionado por su capacidad de inhibitoria ante *S. sclerotiorum*, en tan poco tiempo logró colonizar la placa y no dejó respuesta al fitopatógeno. Según Barrera et al. (2019), el género *Cladorrhinum* es un agente con alto potencial en el biocontrol de fitopatógenos. Gasoni y Stegman de Gurfinkel (2009), informaron que dos aislamientos de *Cladorrihinum,* obtenidos del suelo y de las raíces de alfalfa presentaron comportamiento endofítico. Los autores los probaron en cámara de crecimiento para el control de la podredumbre del tallo y de la raíz, causada por *R. solani* en plantas de

algodón (*Gossypium hirsutum L.*). Las plantas cultivadas en el ensayo mostraron una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad que varía de 33,4 % a 70 %. Sin embargo, algunas especies también se han asociado con enfermedades oportunistas humanas y animales, es por esto que se necesitan más estudios para su implementación en campo.

Los hongos *T. asperellum* (P6, P5 y T13), *T. yunnanense* (P8) y *T. virens* (T1) obtuvieron los mejores resultados con un PICR que supera el 50%, demostraron que fueron los más eficaces contra *S. sclerotiorum*. Es muy conocido que *Trichoderma* es un género por excelencia para realizar controles biológicos, a su vez es uno de los más comercializados. Según Sánchez-García, Espinosa-Huerta, Villordo-Pineda, Rodríguez-Guerra, y Mora-Avilés (2017), se trata de un género fúngico con gran potencial para el control de enfermedades en cultivos de importancia económica. El efecto micoparasitario de las cepas de *Trichoderma* sobre los esclerocios tiene implicaciones ecológicas, ya que, no solo destruye su estructura, sino que también este ataque fúngico puede prevenir significativamente la germinación de los esclerocios (Ibarra-Medina et al. 2009).

En esta investigación, el hongo *A. gephyropaga* (Z7) presentó un PIRC de 70.95%, sin embargo, es considerado de acción nematicida. En el estudio de Labastida y Angulo (2019), se recalca que el género *Arthrobotrys* es considerado nematófago facultativo y su habilidad depredadora se centra en atrapar a los nematodos. Estos hongos crecen en material vegetal en descomposición, estiércol y también en excrementos de conejo y de gallina. El hongo realiza su trabajo de destrucción de los nematodos formando ramificaciones, las cuales forman lazos circulares y estos lazos en movimiento forman redes que secretan una sustancia pegajosa cuando entra en contacto con los nematodos, estos son capturados y después emite ramificaciones que penetran dentro del nematodo y se desarrollan dentro de él y simplemente absorben sus tejidos (Piedra-Naranjo, 2008).

El hongo *P. lilacinum* (C14) representó una inhibición del crecimiento del 67.15%. Este microorganismo es reconocido por su potencial para el control de nematodos agalladores de la raíz (Gortari y Hours, 2015). Este hongo demostró ser más capaz de adaptarse al medio, por lo que fue seleccionado para ser un controlador del fitopatógeno *S. sclerotiorum.* El estudio de Elsherbiny, Taher y Elsebai (2019) mostró que los filtrados de *P. lilacinum* inhiben la formación de esclerocios y la germinación miceliogénica y carpogénica en todas las concentraciones. Los resultados indicaron aumentos significativos en la permeabilidad de la membrana celular del micelio de *S. sclerotiorum* después del tratamiento con los filtrados a una concentración del

75%, lo que provocó un daño severo en la estructura de la membrana de *S. sclerotiorum* a través de una mayor fuga de plasma intracelular, por lo que el presente estudio proporciona una valiosa perspectiva sobre la aplicación del hongo *P. lilacinum* como agente de control biológico contra el moho blanco. No obstante, en caso de este hongo, se ha hallado casos en los que puede ser causante de infecciones en humanos, pese a ser mínimas, lo pone alerta para ser usado (Acosta, Rodríguez, Cárdenas, Martínez y Pacheco, 2021), así que se recomendarían más estudios previos al uso de esta cepa.

Se identificó a la cepa C2 como *B. bassiana*, esta cepa se caracterizó debido a que esta presentó un crecimiento similar al hongo *C, minitans*. Según varios estudios el hongo *B. bassiana* es usado para el control de un gran número de insectos plaga y es la especie de entomopatógeno más comercializado en el mundo (Góngora, Marín y Benavides, 2013). Por lo que no se puede descartar su uso en la finca a futuro.

S. sclerotiorum mostró una alta sensibilidad al control ejercido por las cepas de *Trichoderma*, los resultados dados por la prueba de Tukey mostraron que son una gran opción, como Guigón-López et al. (2010), quien reportó el crecimiento de micelio de este género que casi siempre supera el 70% y en sus pruebas de Tukey las posiciona como los mejores tratamientos. Tanto *T. yunnanense* (P8) y *T. asperellum* (P5, P6 y T13) tuvieron valores superiores al 50% en la prueba de Tukey y se evidenció que, de las cuatro cepas, la que tuvo mejor rendimiento fue T13 superando el 70 %, mientras que *T. virens* (T1) logró superar el 69%.

8. CONCLUSIONES

La cepa P3 del hongo fitopatógeno que afecta plantaciones de flores de corte fue identificada molecularmente como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los hongos biocontroladores de *S. sclerotiorum* fueron identificados como *T. asperellum*, *T. yunnanense* y *T. virens*, los cuales inhibieron el crecimiento del fitopatógeno en más de un 50% en pruebas *in vitro*.

En este estudio, se encontraron hongos benéficos como *B. bassiana*, *Arthrobotys* sp. y *P. lilacinum* los cuales son biocontroladores de insectos y nematodos, pero presentaron potenciales antagónicos con *S. sclerotiorum*.

Es necesario ensayos en invernadero y campo para concluir la verdadera eficacia en el control de la enfermedad del moho blanco en flores de corte.

9. REFERENCIAS

Acosta, I., Rodríguez, A., Cárdenas, J. F., Martínez, V. M., y Pacheco, N. C. (2021). Producción de inulinasas extracelulares por el hongo *Purpureocillium lilacinum*. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, *12*(3), 31-43.

Aguilar-García, L., Escalante-Estrada, J. A., Fucikovsky-Zak, L., Tijerina-Chávez, L., y Engleman, E. M. (2005). Área foliar, tasa de asimilación neta, rendimiento y densidad de población en girasol. *Terra Latinoamericana*, *23*(3), 303-310.

Allende-Molar, R., Báez-Parra, K. M., Salazar-Villa, E., y Rojo-Báez, I. (2022). Biodiversity of *Trichoderma* spp. In mexico and its potencial use in agriculture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *25*(3).

Allori Stazzonelli, E., Yasem de Romero, M. G., y Ploper, L. D. (2017). Aislamiento e identificación de antagonistas asociados al parasitismo de esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* en la provincia de Tucumán, Argentina. *Revista agronómica del noroeste argentino*, *37*(2), 123-132.

Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. A., y Rivera-Méndez, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Revista Tecnología en Marcha*, *27*(2), 82.

Ayala Armenta, Q. A., Cortez Mondaca, E., Apodaca Sánchez, M. Á., Leal León, V. M., Valenzuela Escoboza, F. A., y Palacios Mondaca, C. A. (2015). Efectividad de fungicidas convencionales y biorracionales sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *6*(SPE11), 2149-2156.

Barrera, V. A., Martin, M. E., Aulicino, M., Martínez, S., Chiessa, G., Saparrat, M. C., y Gasoni, A. L. (2019). Carbon-substrate utilization profiles by *Cladorrhinum* (Ascomycota). *Revista Argentina de Microbiología*, *51*(4), 302-306. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.09.005

Bruns T, Lee S, White TJ, y Sninsky J. 1999. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. https://www.researchgate.net/publication/262687766.

Carrillo Criollo, J. F., y Yumbla-Orbes, M. (2022). Caracterización morfológica y análisis de crecimiento de tres cultivares de *Helianthus annuus L.* para flor de corte. *Siembra*, *9*(1).

Castañeda, A., McEwen, J., Hidalgo, M., y Castañeda, E. (2004). Evaluación de varias técnicas de extracción de ADN de *Cryptococcus* spp. a partir de muestras ambientales. *Biomédica*, *24*(3), 324-331.

Cortez, P. (2013). Las flores de corte: un rubro que florece. *Oficina de estudios y políticas agrarias*. Las flores de corte: un rubro que florece (odepa.gob.cl)

Delhey, R., Kiehr, M., Allievi, M. I., Lusto, J., Frayssinet, S., Sidoti Hartmann, B., y Servera, A. (2009). *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas cultivadas e invasoras del sur pampeano y norte patagónico, Argentina. *Phyton (Buenos Aires)*, *78*(2), 111-115.

Ding, L, N., Li, T., Guo, X, J., Li, M., Liu, X, Y., Cao, J., y Tan, X, L. (2021). Resistencia a la pudrición del tallo por *Sclerotinia* en colza: avances recientes y perspectivas futuras. *Revista de química agrícola y alimentaria*, *69*(10), 2965-2978.

Elsherbiny, E. A., Taher, M. A., y Elsebai, M. F. (2019). Activity of *Purpureocillium lilacinum* filtrates on biochemical characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* and induction of defense responses in common bean. *European Journal of Plant Pathology*, *155*, 39-52.

Espinosa L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR 517 Guía práctica sobre la técnica de PCR. In: Las herramientas moleculares. p. 517–536. http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/parkes_.

Filippi, C. V. (2015). *Diversidad genómica y mapeo por asociación para la resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo causada por Sclerotinia sclerotiorum en girasol* (tesis doctoral), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Garces de Granada, E., Orozco de Amezquita, M., y Zapata, Á. C. (1999). Fitopatología en flores. *Acta Biológica Colombiana*.

García, K. T. F., Estepa, D. C. S., y Leal, L. C. S. (2019). Alternativas de manejo biológico de la pudrición producida por *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivos de lechuga en el municipio de Cota, Cundinamarca en las veredas Parcelas, La Moya y Pueblo Viejo. *Biociencias*, *3*(1), 1-26.

Gasoni, L., y de Gurfinkel, S. (2009). Biocontrol of Rhizoctonia solani by the endophytic fungus *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton plants. *Australasian Plant Pathology*, *38*, 389-391.

Geer, L. Y., Marchler-Bauer, A., Geer, R. C., Han, L., He, J., He, S., y Bryant, S. H. (2010). The NCBI biosystems database. *Nucleic acids research*, *38*(suppl_1), D492-D496.

Góngora, C. E., Marín, P., y Benavides, P. (2013). *Claves para el éxito del hongo Beauveria bassiana como controlador biológico de la broca del café*. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Colombia.

Gortari, M. C., y Hours, R. A. (2015). Producción del hongo nematofago *Purpureocillium lilacinum* LPSC# 876 en fermentación sobre sustrato sólido. In *V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata)*.

González, L. C., y Echandi, E. (1989). *Introducción a la fitopatología* (No. 581.2). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

González-Molotla, I. A., Félix-Gastélum, R., Leyva-Madrigal, K. Y., Quiroz-Figueroa, F. R., y Maldonado-Mendoza, I. E. (2021). Etiología de la mancha foliar en soya (Glycine max) en Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología*, *39*(3), 371-390.

Granados-Montero, M. D. M., Chaves-Barrantes, N., Chaverri, P., Hernández-Fonseca, J. C., y Escudero-Leyva, E. (2021). Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica. *Revista mexicana de fitopatología*, *39*(2), 289-301.

Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L., y Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, *28*(2), 87-96.

Ivancovich, A. J., y Lavilla, M. (2016). *Diagnóstico y manejo de enfermedades en girasol*. Ediciones INTA.

Ibarra-Medina, V. A., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Lara-Hernández, M. E., y Valdez-Carrasco, J. M. (2010). Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. *Revista mexicana de micología*, *31*, 53-63.

Labastida, M. R., y Angulo, M. M. G. (2019). *Evaluación nematicida in vitro de filtrados obtenidos a partir de hongos nematófagos cultivados en medios elicitados con extracto larval del parasito Haemonchus contortus* (tesis doctoral), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Leyva, E. E., Echandi, P. C., Vargas, M. M., y Jiménez, J. C. U. (2020). Análisis filogenético de secuencias ITS provenientes de hongos endófitos utilizando Inferencia Bayesiana Paralela de Árboles con Exabayes. *Tecnología en Marcha*, *33*(5), 74-79.

Maldonado Arteaga, R. M. (2020). *"Principales enfermedades en el cultivo de girasol (Helianthus annuus)" en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Babahoyo* (tesis de grado), Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo, Ecuador.

Moreno, L. P., Aguilera, A. R., y Pale, J. R. S. (2004). Efecto de *Coniothyrium minitans* Campbell en Esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *22*(3), 429-434.

Moreno-Velandia, C. A., Cotes, A. M., Beltrán-Acosta, C., Bettiol, W., y Elad, Y. (2018). Control biológico de fitopatógenos del suelo. *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico*, *1*, 144-220.

Olivos Terrones, B. J., y Osorio Salazar, J. G. (2021). *Preparación del Agar BLIM a partir de Oreocallis grandiflora (Cucharilla) para detectar Cándida albicans* (tesis de grado) Universidad privada de Huancayo, Lima, Perú.

Ordóñez-Valencia, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L. V., y Larsen, J. (2018). Desarrollo morfológico temprano de esclerocios por *Sclerotinia sclerotiorum* en presencia de bicarbonato de potasio. *Revista mexicana de fitopatología*, *36*(3), 363-378.

Patiño, M., Nieto-Ramirez, I. J., Chegwin-Angarita, C., y Torres-Rojas, E. (2020). ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA IN VITRO DE MACROHONGOS CONTRA DIFERENTES HONGOS FITOPATÓGENOS. *Acta Biológica Colombiana*, *25*(2), 265-279.

Pérez-Moreno, L., Belmonte-Vargas, J. R., Núñez-Palenius, H. G., Guzmán-Mendoza, R., y Mendoza-Celedón, B. (2015). Sensibilidad in vitro de dos especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. *Revista mexicana de fitopatología*, *33*(2), 256-267.

Pineda Giraldo, J. M., Calderón Quintero, A., & Castaño Zapata, J. (2020). *Guía ilustrad de enfermedades y patógenos en cultivos hortícolas*. Editorial Universidad de Caldas.

Promega. (2017). Escalera de ADN 100pb. Recuperado de: https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight%20markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101

Promega. (2019). Manual técnico del kit de purificación de ADN genómico. Recuperado de: Protocolo del kit de purificación de ADN genómico Wizard® (promega.com) (2023).

PCR Master Mix. Recuperado de: PCR Master Mix (promega.com)

Pieckenstain, F. L. (2002). *Control biológico de enfermedades causadas por Sclerotinia Sclerotiorum en el girasol y estudio del rol de las poliaminas en las distintas etapas del ciclo de vida de este patógeno* (tesis doctoral), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Piedra-Naranjo, R. (2008). Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. *Revista Tecnología en Marcha*, *21*(1), 123.

Poverene, M. M., Cantamutto, M. A., Carrera, A. D., Ureta, M. S., Salaberry, M. T., Echevarria, M. M., y Rodríguez, R. H. (2002). El girasol silvestre (*Helianthus* spp.) en la Argentina: Caracterización para la liberación de cultivares transgénicos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, *31*(2), 97-116.

Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R., y Mora-Avilés, M. A. (2017). Identificación molecular y evaluación antagónica in vitro

de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia*, *51*(1), 63-79.

Sarlangue, A. T. y Argentina, P. (2007). *Pudrición del capítulo de girasol por Sclerotinia sclerotiorum* (Conocimientos Agrícolas, noviembre). Argentina: Pioneer Argentina S.A.

Sarmiento, M. M., Mangiaterra, M., Bojanich, M. V., Basualdo, J. Á., y Giusiano, G. (2016). Hongos queratinofílicos en suelos de parques de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, *33*(1), 7-12.

Suárez-Contreras, L. Y., y Peñaranda-Figueredo, F. A. (2022). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, *20*(1), 194-206.

ThermoScientific. (2015). *NanoDrop 2000/ 2000c espectrofotómetros*. Recuperado de: NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (thermofisher.com)

ThermoScientific. (2021). *Termociclador SimpliAmp*. Recuperado de: Termociclador SimpliAmp de Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific - CE

Villegas-Rodríguez, F., Díaz-Gómez, O., Casas-Flores, J. S., Monreal-Vargas, C. T., Tamayo-Mejía, F., y Aguilar-Medel, S. (2017). Actividad de dos hongos entomopatógenos, identificados molecularmente, sobre *Bactericera cockerelli*. *Revista Colombiana de Entomología*, *43*(1), 27-33.

Villavicencio, C. J. C., Carrión, C. M. G., Salcedo-Muñoz, V. E., y Sotomayor-Pereira, J. G. (2021). El sector florícola del Ecuador y su aporte a la Balanza Comercial Agropecuaria: período 2009–2020. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, *8*(1), 74-82.

White, T., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN ribosómico fúngico para filogenia. Estados Unidos: Prensa Académica. Recuperado de: (PDF) White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee y J. W. Taylor. Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN ribosómico fúngico para filogenética (researchgate.net)

Zhiqiang, A. (2005). Manual de micología industrial. Nueva York, Estados Unidos: Micología. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=GXumDwAAQBAJ&pg=PT236&dq=mycology+pda+agar&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwiwir2hzL70AhUbnWoFHdUPCq4Q6AF6BAgLEAI#v=onepage&q=mycology%20pda%20agar&f=fals