



ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 17 JUNIO DEL 2014

HORA: 4:00 P.M.

LUGAR: SALA 3 DEL CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE AISLAMIENTOS FÚNGICOS NATIVOS EN EL CONTROL DE *Botrytis* sp., AGENTE CAUSAL DEL MOHO GRIS EN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.) VARIEDAD *Cimabue*".

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

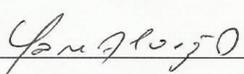
JURADOS: YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA
ALINA KATIL SIGARROA RIECHE
LILIAN TRINIDAD RAMIREZ CAICEDO

DIRECTOR: JENNY SIRLEY VARGAS LIZARAZO

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
ÁLVARO ANDRÉS ARDILA SANDOVAL	1610187	4.3
LILIANA CAROLINA CASTELLANOS QUINTERO	1610348	4.3

OBSERVACIONES: APROBADA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Vo. Bo. Coordinador Comité Curricular



Evaluación del potencial biocontrolador de aislamientos fúngicos nativos en el control de *Botrytis* sp., agente causal del Moho Gris en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) variedad *Cimabue*.

**Álvaro Andrés Ardila Sandoval
Liliana Carolina Castellanos Quintero**

**Universidad Francisco de Paula Santander
Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente
Plan de Estudios de Ingeniería Biotecnológica
San José de Cúcuta
2014**

Evaluación del potencial biocontrolador de aislamientos fúngicos nativos en el control de *Botrytis* sp., agente causal del Moho Gris en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) variedad *Cimabue*.

**Álvaro Andrés Ardila Sandoval
Liliana Carolina Castellanos Quintero**

Proyecto de Grado modalidad trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de Ingeniero(a) Biotecnológico(a).

**Director(a)
Jenny Sirley Vargas Lizarazo
Ingeniera de Producción Biotecnológica**

**Universidad Francisco de Paula Santander
Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente
Plan de Estudios de Ingeniería Biotecnológica
San José de Cúcuta
2014**

Resumen

La causa más frecuente de pérdidas económicas en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), es la aparición de las enfermedades de origen fúngico. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial biocontrolador de 10 aislamientos fúngicos nativos, siete pertenecientes al género *Trichoderma* sp., y tres al género *Gliocladium* sp., en el control de *Botrytis* sp., agente causal del Moho Gris en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) variedad *Cimabue*. La capacidad antagonista de los aislados frente al patógeno fue evaluada en condiciones *in vitro* e *in vivo*. La evaluación *in vitro* se realizó mediante la técnica de cultivos duales, con un diseño experimental completamente al azar, por medio del cual se determinó que la cepa CNC-9 perteneciente al género *Gliocladium* sp., es un competidor eficiente de nutrientes y espacio, presentando una velocidad de crecimiento radial de 1,05 cm/día y un porcentaje de inhibición micelial de 77,78% generando diferencias significativas ($p < 0,0001$) con los demás tratamientos evaluados. En el estudio de la capacidad micoparasitaria la cepa CNC-10 presentó el mayor porcentaje de micoparasitismo 100%, clasificándose en el grado 1 de la escala Royse y Ries, (1978). Mediante un diseño experimental completamente al azar se realizó previo a la evaluación *in vivo*, una estandarización de la concentración de conidios de *Botrytis* sp., de mayor patogenicidad. Encontrándose que la concentración 1×10^7 conidios/ml genera mayor grado de severidad de la enfermedad. La evaluación *in vivo* se realizó por medio de un diseño experimental de bloques completos al azar, determinándose que la cepa CNC-9 a una concentración de 1×10^6 fue el tratamiento que mejor control ejerció sobre la enfermedad del Moho Gris en clavel generando diferencias significativas ($p < 0,0001$) y superando a tratamientos de síntesis química como el Captan, Mancozeb y Propineb. Con respecto al control del porcentaje de esporulación el

tratamiento T12 Captan fue el tratamiento que mejores resultados presentó con una media de 50,10% ($p < 0,0001$) seguido de la cepa CNC-9 a una concentración de 1×10^6 conidios/ml.

Palabras claves: Antagonismo, competencia, inhibición y micoparasitismo.

Abstract

The most frequent causes of economic losses in carnation crop (*Dianthus caryophyllus* L.), are the diseases of fungal origin. The aim of this investigation was to evaluate the biocontrol potential of 10 fungal isolates natives, 7 belonging to the genus *Trichoderma* sp., and 3 to the genus *Gliocladium* sp., in the control of *Botrytis* sp., causal agent of Gray Mold in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) variety Cimabue. The antagonist capacity of the isolates against the pathogen was assessed under conditions *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* evaluation was performed by dual culture technique with a completely randomized experimental design, whereby the CNC-9 strain belonging to the genus *Gliocladium* sp., was determined., is an efficient competitor for nutrients and space, presenting a radial growth rate of 1,05 cm / day and a mycelial percent inhibition of 77,78% generating significant differences ($p < 0,0001$) with the other treatments evaluated. In the study of mycoparasitic capacity, the strain CNC-10 had the highest percentage of mycoparasitism 100%, ranking in grade 1 of the scale Royse and Ries (1978). Using a completely randomized experimental design was performed prior to the evaluation *in vivo*, a standardization of the concentration of conidia of *Botrytis* sp., high pathogenicity. Found that the concentration to 1×10^7 conidia / ml leads to greater severity of disease. The *in vivo* evaluation was performed by means of an experimental design of randomized complete block, determining that the CNC-9 strain at a concentration of 1×10^6 was the treatment that better control exerted over Grey Mold disease in

carnation generating significant differences ($p < 0,0001$) and exceeding to treatments of synthesis chemical Captan, Mancozeb and Propineb. Regarding the sporulation percentage, the T12 treatment was the treatment that presented best results with an average 50,10% ($p < 0,0001$), followed by the CNC-9 strain at a concentration of 1×10^6 conidia / ml.

Keywords: Antagonism, competition, mycoparasitism and inhibition

Dedicatoria

A Dios por darme la fortaleza y sabiduría para cumplir mis sueños
A la memoria de mi Padre Álvaro Ardila Blanco (1960-2014), Papá te amo demasiado vivirás
por siempre en mi corazón
A mi Madre Xiomara Sandoval Torres por brindarme su amor, cariño y comprensión todos los
días de mi vida, “Te amo Mamá”.

Andrés Ardila

“A ti DIOS Mío, por estar siempre a mi lado, por demostrarme su inmenso amor... Gracias por ayudarme a levantarme de mis fracasos, por aprender de ellos y principalmente por iluminar mi camino todos los días.

A mi mama, porque sin ti no sería lo que soy, no tengo palabras para agradecer todo lo que me has dado, simplemente gracias. Te amo.
Con todo mi cariño y mi amor para mi Papá, hermanos y sobrino.

Liliana Castellanos.

Agradecimientos

En primer lugar agradecemos a Dios, por habernos dado fuerza y valor para culminar esta etapa de nuestras vidas.

A la familia Colibrí Flowers por su colaboración en la elaboración de este proyecto.

A Naysla Yurley Torres Hernández por estar siempre en los momentos que más necesitamos y guiarnos en el desarrollo de este proyecto.

A la M.Sc., Ing. Yaneth Muños por toda la colaboración brindada.

A Ricardo Alarcón por toda la colaboración brindada.

Tabla de Contenido

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INTRODUCCIÓN	1
1. Problema	4
1.1 Título	4
1.2 Planteamiento del Problema	4
1.3 Formulación del Problema	5
1.4 Justificación	6
1.5 Objetivos	8
1.5.1 Objetivo General	8
1.5.2 Objetivos Específicos	8
1.6 Delimitaciones	9
1.6.1 Espacial	9
1.6.2 Temporal	9
1.6.3 Conceptual	10
2. Marco Referencial	11
2.1 Antecedentes	11
2.2 Marco Teórico	20
2.2.1 El cultivo del clavel	20

2.2.1.1 Origen	20
2.2.1.2 Taxonomía	20
2.2.1.3 Morfología	21
2.2.1.4 Requerimientos edafoclimáticos	21
2.2.1.5 Aspectos fitosanitarios	22
2.2.2 <i>Botrytis</i> sp.	25
2.2.2.1 Clasificación taxonómica	25
2.2.2.2 Morfología	27
2.2.2.3 Micelio	28
2.2.2.4 Conidióforos o macroconidióforos	28
2.2.2.5 Conidios o macroconidios	29
2.2.2.6 Microconidiofóros y microconidios	30
2.2.2.7 Clamidosporas	31
2.2.2.8 Esclerocios	32
2.2.2.9 Apotecios	33
2.2.2.10 Ciclo de vida del hongo	33
2.2.2.11 Factores de crecimiento para <i>Botrytis</i> sp.	35
2.2.2.12 Ciclo de infección	35
2.2.2.13 Sintomatología	37
2.2.3 Control del Moho Gris <i>Botrytis</i> sp.	39
2.2.3.1 Control químico	39
2.2.3.2 Control cultural	40
2.2.3.3 Control biológico	41

2.2.3.4 Mecanismos de control biológico	42
2.2.4 Géneros fúngicos utilizados en el control de <i>Botrytis</i> sp.	44
2.2.4.1 <i>Trichoderma</i> sp.	44
2.2.4.1.1 Clasificación taxonómica <i>Trichoderma</i> sp.	45
2.2.4.1.2 Condiciones de crecimiento	46
2.2.4.1.3 Características macroscópicas de <i>Trichoderma</i> sp.	46
2.2.4.1.4 Características microscópicas de <i>Trichoderma</i> sp.	47
2.2.4.1.5 <i>Trichoderma</i> sp., como controlador biológico	49
2.2.4.2 <i>Gliocladium</i> sp.	50
2.2.4.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Gliocladium</i> sp.	50
2.2.4.2.2 Condiciones de crecimiento de <i>Gliocladium</i> sp.	51
2.2.4.2.3 Característica macroscópicas de <i>Gliocladium</i> sp.	51
2.2.4.2.4 Característica microscópicas de <i>Gliocladium</i> sp.	52
2.2.4.2.5 <i>Gliocladium</i> sp., como controlador biológico	53
3. Metodología	54
3.1. Tipo de Investigación	54
3.2 Población y Muestra	54
3.2.1 Evaluación <i>in vitro</i>	54
3.2.1.1 Población	54
3.2.1.2 Muestra	54
3.2.2 Estandarización de la concentración de conidios de <i>Botrytis</i> sp., de mayor patogenicidad	55
3.2.2.1 Población	55

3.2.2.2 Muestra	55
3.2.3 Evaluación <i>in vivo</i>	55
3.2.3.1 Población	55
3.2.3.2 Muestra	55
3.3 Hipótesis	56
3.3.1 Evaluación <i>in vitro</i>	56
3.3.2 Estandarización de la concentración de conidios de <i>Botrytis</i> sp., de mayor patogenicidad	56
3.3.3 Evaluación <i>in vivo</i>	57
3.4 Variables	57
3.4.1 Evaluación <i>in vitro</i>	57
3.4.2. Estandarización de la concentración de conidios de <i>Botrytis</i> sp., más patogénica	58
3.4.3 Evaluación <i>in vivo</i>	58
3.5 Fases de la Investigación	59
3.5.1 Selección del área de muestreo	59
3.5.2 Georreferenciación	60
3.5.3 Muestreo	61
3.5.4 Aislamiento de cepas fúngicas nativas	62
3.5.5 Aislamiento del fitopatógeno	63
3.5.6 Purificación de los aislamientos	64
3.5.7 Identificación macro y microscópica de los aislamientos	64
3.5.8 Prueba de patogenicidad	65
3.5.9 Evaluación <i>in vitro</i>	66

3.5.10 Estandarización de la concentración de conidios de <i>Botrytis</i> sp., de mayor patogenicidad	69
3.5.11 Evaluación <i>in vivo</i>	72
3.5.12 Análisis estadístico	76
4. Resultados y Discusiones	77
4.1 Estudio del área de muestreo	77
4.1.2 Generalidades del área de muestreo	77
4.1.3 Análisis de pH y conductividad de las muestras de suelo endémico	78
4.2 Obtención y aislamientos de los hongos	79
4.3 Identificación del género de los aislamientos evaluados	82
4.3.1 Identificación macroscópica	82
4.3.2 Identificación microscópica	84
4.4 Obtención e identificación del fitopatógeno	86
4.5 Prueba de patogenicidad	87
4.6 Evaluación <i>in vitro</i>	90
4.6.1 Estudio de la velocidad de crecimiento radial de los aislamientos y fitopatógeno	90
4.6.2 Inhibición del crecimiento radial de <i>Botrytis</i> sp.	92
4.6.3 Estudio del porcentaje de micoparasitismo	95
4.7 Estandarización de la concentración de conidios de <i>Botrytis</i> sp., de mayor patogenicidad	97
4.8 Evaluación <i>in vivo</i>	101
4.8.1 Evaluación del porcentaje de afección	101
4.8.2 Evaluación del porcentaje de esporulación	105

CONCLUSIONES	109
RECOMENDACIONES	111
GLOSARIO	112
REFERENCIAS	115
ANEXOS	124