

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE
Phytophthora infestans

PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR:

GALO FERNANDO GARCÍA BEDÓN

DIRECTORA:

Ing. MARÍA CRISTINA ECHEVERRÍA, PhD.

Ibarra, 2022

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
ESCUELA DE INGENIERIA EN
BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE *Trichoderma spp.* EN EL CONTROL
DE *Phytophthora infestans*”**

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como
requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADO:

Ing. María Cristina Echeverría, PhD.

DIRECTOR



FIRMA

Ing. Tania Sulca, PhD.

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

Ing. Santiago Zárate Baca, MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	040186452-5		
APELLIDOS Y NOMBRES:	GARCÍA BEDÓN GALO FERNANDO		
DIRECCIÓN:	La Victoria		
EMAIL:	gfgarciab@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	2615741	TELÉFONO MÓVIL:	0998229463

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE <i>Trichoderma spp.</i> EN EL CONTROL DE <i>Phytophthora infestans</i>
AUTOR (ES):	GARCÍA BEDÓN GALO FERNANDO
FECHA: DD/MM/AAAA	24/ 06/2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. María Cristina Echeverría, PhD.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 27 Días del mes de junio del 2022

EL AUTOR



.....
Galo Fernando García Bedón

C.I.: 0401864525

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a la Universidad Técnica del Norte y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, que fueron mi segundo hogar, donde conocí personas que aportaron en mi formación tanto profesional como personal.

A mi director, la Doctora María Cristina Echeverría por el tiempo y dedicación impartidos en las aulas y durante la realización del trabajo de titulación, al Magister Gabriel Chimbo por el apoyo y conocimientos brindados durante toda la ejecución de la investigación. De igual manera a la Doctora Tania Sulca y Magister Santiago Zarate por los conocimientos, el interés en mi trabajo de titulación y por el apoyo incondicional brindado durante todo el tiempo de realización del proyecto.

A mis padres y hermana quienes son el pilar fundamental en mi vida por inculcarme valores que han hecho de mí la persona que soy. A mis compañeros tesisistas por su amistad, dentro y fuera del laboratorio.

A todos quienes conforman los Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Biotecnología Vegetal por la colaboración prestada en el tiempo que duro la experimentación.

Galo García

DEDICATORIA

A Dios, por la vida, por permitirme enfrentar cada uno de retos impuestos a lo largo de mi preparación académica.

A mis padres Galo y Narcisa, por todo su amor, confianza y apoyo incondicional durante toda mi vida estudiantil, por estar conmigo en cada instante de mi vida, sus consejos de aliento para nunca dejarme caer y cumplir con cada uno de mis propósitos. Hoy para mí es de gran satisfacción dedicarles el esfuerzo de todos estos años.

A mi hermana Valeria, por confiar en mí, brindarme su apoyo y hoy todo ese esfuerzo trae su recompensa.

A mis compañeros, por todos los momentos que hemos compartido estos años dentro y fuera de las aulas.

A cada uno de mis maestros por sus conocimientos, por compartir su pasión hacia la carrera que ha sido fundamentales durante toda mi formación académica y personal.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
CAPÍTULO I	14
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Antecedentes	14
1.2 Planteamiento del problema	15
1.3 Justificación	17
1.4 Pregunta directriz	19
1.5 Objetivos	19
1.5.1 Objetivo general.	19
1.5.2 Objetivos específicos	19
1.6 Hipótesis	19
CAPÍTULO II	20
MARCO TEÓRICO	20
2.1 El cultivo de Papa (<i>Solanum tuberosum</i>).	20
2.2 Condiciones agroecológicas para el cultivo de papa	20
2.3 Desarrollo fenológico	21
2.4 Manejo agrícola, fertilización del cultivo de papa.	23
2.5 Factores bióticos y abióticos que afectan al cultivo.	24
2.5.1 Tipos de enfermedades de acuerdo al organismo causal.	25
2.5.1.1 Nematodos	25
2.5.1.2 Hongos	25
2.5.1.3 Bacterias	27
2.5.1.4 Virus	28
2.5.1.5 Plagas	29
2.6 Importancia del tizón tardío en el Ecuador	30
2.6.1 Organismo causal	31
2.6.2 Ciclo de vida	31
2.6.3 Sintomatología	32
2.6.4 Epidemiología	33

2.7 Manejo del tizón tardío.....	34
2.7.1 Control Genético.....	34
2.7.2 Control Químico.....	34
2.7.3 De contacto.....	35
2.7.4 Control Cultural.....	35
2.8 Control biológico.....	37
2.8.1 Trichoderma como organismo biocontrolador.....	37
2.8.1.2 <i>Trichoderma viride</i>	37
2.8.1.3 <i>Trichoderma harzianum</i>	38
2.8.2 Mecanismos de acción.....	39
2.8.2.1 Competencia.....	40
2.8.2.2 Micoparasitismo.....	40
2.8.2.3 La antibiosis.....	41
2.9 Biorreactores.....	41
2.9.1 Medio de cultivo y requerimientos de operación.....	41
2.10 Aplicaciones.....	43
2.10.1 Fermentación sumergida (líquida).....	43
CAPÍTULO III.....	45
METODOLOGÍA.....	45
3.1. Descripción del área de estudio.....	45
3.2. Aislamiento: <i>Phytophthora infestans</i>	47
3.3. Obtención de <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>	47
3.3. Elaboración de cámara húmeda, selección de plantas.....	47
3.3.2. Inoculación y evaluación de la patología.....	48
3.4. Fermentación líquida.....	48
3.4.1 Condiciones de crecimiento.....	48
3.4.2 Obtención de extractos de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	49
3.4.3 Actividad antifúngica de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	49
3.5. Bioensayos efectividad fungicida de los extractos.....	50
3.5.1 Siembra de plantas de papa.....	50
3.5.2 Análisis de la efectividad fungicida.....	50
3.6 Análisis estadístico.....	51
3.6.1 Pruebas de actividad inhibitoria.....	51
3.6.2 Bioensayos para determinar la efectividad de los extractos.....	51
CAPÍTULO IV.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53

4.1 Aislamiento y purificación de <i>Phytophthora infestans</i>	53
4.2 Crecimiento de <i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i> en biorreactores	54
4.3 Análisis de la actividad inhibitoria de los extractos producidos por <i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i>	55
4.4 Evaluación de la efectividad de los extractos mediante ensayos <i>in vivo</i>	58
4.5 Análisis de la severidad de la zona aérea de las plantas de papa, evaluada por tercios.....	60
CAPÍTULO V.....	64
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
5.1 Conclusiones.....	64
5.2 Recomendaciones	65
REFERENCIAS	66
ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso de insumos químicos.....	16
Figura 2. Intensidad de fertilizantes en los cultivos transitorios	16
Figura 3. Desarrollo fenológico, A) Emergencia o brotación, B), crecimiento de brotes laterales, C), Inicio de la tuberización, D) Fase de llenado de tubérculos, E) maduración	22
Figura 4. Ciclo de la enfermedad (epidemia policíclica).....	32
Figura 5. Sintomatología de tizón tardío, A) hoja, B) tallo, C) tubérculo.....	33
Figura 6. Manejo integrado de Tizón tardío	34
Figura 7. Hifas y conidióforos de <i>T. viride</i>	38
Figura 8. Hifas y conidióforos de <i>T. harzianum</i>	39
Figura 9. Diseño de biorreactor air-lift.....	44
Figura 10. Lugar de muestreo del tejido vegetal con sintomatología de Tizón tardío. ..	45
Figura 11. Campus Antiguo Hospital San Vicente de Paúl.....	46
Figura 12. Ubicación del invernadero	46
Figura 13. Aislamiento del hongo <i>P. infestans</i> en hojas de planta de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) con sintomatología de Tizón tardío.....	53
Figura 14. Colonia pura de <i>P. infestans</i> , concluido el proceso de resiembras en medio de cultivo agar centeno.....	53
Figura 15. Características morfológicas del aislado de <i>P. infestans</i> , los esporangios de los aislamientos fueron en su mayoría ovoides y semipapilados (A) Colonia aislada (B) Morfología referencial. Fuente: Agrios, GN (1988).....	54
Figura 16. Incremento de biomasa cada 12 días durante los 36 días de operación (A) <i>T. harzianum</i> : R1=reactor 1, R2=reactor 2, R3=reactor 3, R4=reactor 4, B) <i>T. viride</i> : R1=reactor 1, R2=reactor 2, R3=reactor 3, R4=reactor 4.	55
Figura 17. Crecimiento del hongo <i>P. infestans</i> con aplicación de cada uno de los tratamientos (A) Día 5, (B) Día 6, (C) Día 7, (D) Día 8, (E). Día 9, (F) Día 10.	57
Figura 18. Porcentaje de severidad con la aplicación de los tratamientos en plantas de papa, (A) Día 2, (B) Día 3, (C) Día 4, (D) Día 5, (E). Día 6, (F) Día 7, (G) Día 8, (H) Día 9, (I) Día 10.....	59
Figura 19. Control de la infección de <i>P. infestans</i> en plantas de papa en los días 5, 7 y 9 de los tratamientos T1 (10% <i>T. harzianum</i>) y T4 (10% <i>T. viride</i>).	61
Figura 20. Severidad evaluada en las plantas de papa por cada tercio de la parte aérea en el día 10, (tercio 1 = zona alta (letras minúsculas), tercio 2 = zona media (letras capitales), tercio 3 = zona baja (letras capitales en cursiva).....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fertilización para papa	24
Tabla 2. Distribución de los tratamientos	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Solicitud para acceder al cultivo de papa a realizar el muestreo de tejido vegetal infectado.....	76
Anexo 2. Autorización para tomar muestras de tejido vegetal que sea necesario.....	77
Anexo 3. Solicitud al Ministerio del Ambiente para la realización de investigación científica.....	78
Anexo 4. Permiso de investigación científica por parte del ministerio del ambiente	78
Anexo 5. Autorización para realizar investigación científica por parte del ministerio del ambiente.....	80
Anexo 6. Cultivo y toma de muestra de tejido vegetal infectado, en plantas papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	82
Anexo 7. Microscopia de muestras recolectadas (hojas) observación de estructuras fúngicas.....	82
Anexo 8. A) Recolección de plantas sanas, B) Elaboración de cámara húmeda.	82
Anexo 9. Preparación y esterilización de sustratos	83
Anexo 10 . Desinfección y siembra de semillas de papa var. Superchola	83
Anexo 11. Metodología general para el aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i>	84
Anexo 12. Esquema de elaboración de cámara húmeda en planta viva	84
Anexo 13. Esquema de escalado y preparación de soluciones de los extractos obtenidos de cada uno de los reactores de <i>Trichoderma</i>	85
Anexo 14. Esquema del proceso para la evaluación de la actividad antifúngica de <i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i>	85
Anexo 15. Esquema del proceso de siembra de papa hasta los dos meses de edad	86
Anexo 16. Esquema del proceso para la evaluación de la actividad fúngica.	86
Anexo 17. ANOVA, análisis de la actividad inhibitoria de los extractos día 10	87
Anexo 18. Prueba de Tukey, análisis de la actividad inhibitoria de los extractos día 10.....	87
Anexo 19. ANOVA, análisis de la efectividad fungicida de los extractos día 10.....	87
Anexo 20. Prueba de Tukey, análisis de la efectividad fungicida de los extractos día 10	88
Anexo 21. Prueba de Tukey, análisis de la severidad en el tercio 1 de la planta del día 10	88
Anexo 22. Prueba de Tukey, análisis de la severidad en el tercio 2 de la planta del día 10	88
Anexo 23. Prueba de Tukey, análisis de la severidad en el tercio 3 de la planta del día 10	89
Anexo 24. Entrega de informe de las actividades realizadas durante el periodo de investigación.....	90
Anexo 25. Informe de análisis del sustrato para elaborar el plan de fertilización.....	91
Anexo 26. Plantilla de control del cultivo de papa en el invernadero	93
Anexo 27. Registro de asistencia de las actividades realizadas en el invernadero.....	94

RESUMEN

El cultivo de papa (*S. tuberosum*), es una actividad productiva que genera importantes ingresos a familias campesinas de la Sierra Ecuatoriana. En Carchi, el cultivo de *S. tuberosum*, es una de las principales actividades agrícolas. Sin embargo, existen varias enfermedades principalmente fúngicas que atacan la planta y por ello los agricultores utilizan productos de naturaleza química que alteran la composición del suelo. El control biológico surge como una alternativa amigable con el ambiente. Las especies de *Trichoderma harzianum* y *viride* por su interacción eficiente con el huésped ayuda a la producción de metabolitos secundarios y enzimas celulares. Las propiedades antibióticas constituyen uno de los principales biocontroladores que inhiben el crecimiento y mata a los agentes fitopatógenos. En el presente estudio se realizó el aislamiento del hongo patógeno *P. infestans* a partir de tejido vegetal infectado de plantas de papa que presentaron la sintomatología de tizón tardío. Para la obtención de los extractos de *Trichoderma* se adaptaron/construyeron reactores de tipo air-lift, los cuales operaron durante 36 días. Los extractos obtenidos fueron sometidos a experimentaciones *in-vitro* evaluando la actividad fungicida sobre *P. infestans*, además de los ensayos *in-vivo* se evaluó la efectividad de los extractos en invernadero con aplicación directa sobre la planta como método preventivo ante la infección de *P. infestans*. Los ensayos *in-vitro* mostraron resultados favorables en cuanto a la inhibición del crecimiento del patógeno *P. infestans*, en un 62% a comparación del testigo absoluto. A nivel de invernadero se obtuvo que los extractos poseen efectividad fungicida ya que demostró reducir la severidad en un 70% y a su vez ser considerado un potencial medio de prevención ante la infección de *P. infestans*. Los ensayos determinaron que la aplicación de los extractos T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*), redujeron el crecimiento micelial de *P. infestans*, por lo cual dichos extractos representarían una alternativa agroecológica en el control del tizón tardío.

Palabras clave:

Phytophthora infestans, *Trichoderma*, Control biológico, Agricultura Sustentable

ABSTRACT

Potato (*S. tuberosum*) cultivation is a productive activity that generates important income for farming families in the Ecuadorian Sierra. In Carchi, the cultivation of *S. tuberosum* is one of the main agricultural activities. However, there are several diseases, mainly fungal, that attack the plant, so farmers use chemical products that alter the soil composition. Biological control emerges as an environmentally friendly alternative. The species of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* by their efficient interaction with the host helps the production of secondary metabolites and cellular enzymes. Antibiotic properties constitute one of the main biocontrols that inhibit growth and kill phytopathogens. In the present study, the pathogenic fungus *P. infestans* was isolated from infected plant tissue of potato plants showing symptoms of late blight. To obtain *Trichoderma* extracts, air-lift reactors were adapted/constructed and operated for 36 days. The extracts obtained were subjected to in-vitro experiments to evaluate their fungicidal activity on *P. infestans*. In addition to the in-vivo trials, the effectiveness of the extracts was evaluated in the greenhouse with direct application on the plant as a preventive method against *P. infestans* infection. The in-vitro trials showed favorable results in terms of inhibiting the growth of the pathogen *P. infestans* by 62% compared to the absolute control. At the greenhouse level, it was found that the extracts have fungicidal effectiveness, since they showed a 70% reduction in severity and are considered a potential means of prevention of *P. infestans* infection. The trials determined that the application of extracts T1 (10% *T. harzianum*) and T4 (10% *T. viride*) reduced the mycelial growth of *P. infestans*, so these extracts represent an agroecological alternative in the control of late blight.

Key words:

Phytophthora infestans, *Trichoderma*, Biological control, Sustainable agriculture.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El Ecuador es un país el cual su sistema productivo de cultivos es altamente diferenciado por el tamaño de las Unidades Productivas Agrícolas (UPA). Cada UPA presenta diferentes factores edafoclimáticos que varían dependiendo de la región donde se encuentren y pueden o no favorecer el desarrollo de diversos patógenos (Vallejo, 2014). Se ha identificado que las enfermedades producidas por patógenos generan pérdidas que superan el 20% del costo total de producción, creando así la necesidad de implementar estrategias eficaces en el control de agentes causantes de enfermedades en los cultivos.

Entre las estrategias propuestas, el control biológico es una opción que cada vez atrae más la atención de científicos y agricultores debido a que permite reducir el uso de agroquímicos que son costosos, nocivos para la salud, contaminan el ambiente, no son específicos para el organismo blanco y que con el tiempo generan resistencia. El control biológico se basa en el uso de microorganismos que son enemigos naturales de determinados patógenos, por lo tanto, son más específicos hacia el organismo blanco y no contaminan el ambiente (Bettioli, 2014).

El cultivo de papa (*S. tuberosum*), es fundamental dentro del sistema de producción y principal fuente de ingreso para las familias campesinas en de la zona norte de la Sierra ecuatoriana (Méndez, 2015). La papa es un cultivo que necesita de condiciones como, altitudes entre 2700 y 3400 m.s.n.m., temperaturas entre 9 y 11°C (Ministerio de Agricultura, 2016). Uno de los problemas fitosanitarios más significativos de la papa es el control de hongos fitopatógenos entre ellos tenemos los causados por, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. (Guchi, 2015).

El Tizón tardío causado por el hongo *P. infestans*, se encuentra posicionado como la enfermedad que más pérdidas causa al cultivo de papa en Ecuador, estas van desde el 30 y 100% (Oyarzun, Taipe, & Forbes, 2001). En base a las estadísticas, las provincias de Chimborazo y Tungurahua han presentado más del 90% de presencia de tizón tardío

en sus cultivos (Monteros, 2016). Estos datos explican el uso indiscriminado de agroquímicos en la producción de la papa (ESPAC, 2019).

Los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* son los que se utilizan con mayor frecuencia para el control biológico debido a: su versatilidad, adaptabilidad, fácil manejo y alta capacidad de controlar una gran cantidad de microorganismos patógenos causantes de enfermedades en los cultivos (Falconi, 2010). Sus mecanismos de control incluyen: parasitismo, competencia, antibiosis y producción de compuestos volátiles bioactivos (Hernández, 2014). Una investigación previa describe que el uso de *Trichoderma* en el control de agentes patógenos han sido altamente eficaz, entre ellos se menciona a los patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Sclerotinia trifoliorum* (Kandula, 2015).

La agricultura sustentable es la consolidación de tres objetivos principales: salud ambiental, rentabilidad económica y equidad social que se puede lograr mediante la aplicación de diversas prácticas agrícolas, como la diversificación de cultivos, la diversidad genética, el manejo integrado de nutrientes, el manejo integrado de plagas, el manejo sostenible del agua y la tecnología de postcosecha (Verma, et al., 2015). En vista de las limitaciones mencionadas anteriormente, el aumento de la productividad agrícola debe lograrse mediante la aplicación de tecnologías sostenibles, tanto económica, como ambientalmente que permitan responder a la creciente demanda de alimentos y las demandas del mercado (Sumpsi, 2012).

1.2 Planteamiento del problema

En la provincia del Carchi, el cultivo de papa *S. tuberosum*, es una de las principales actividades agrícolas. Sin embargo, para obtener rentabilidad los agricultores utilizan altas dosis de fertilizantes. Estos con el paso del tiempo han dado resultados negativos como la pérdida de la diversidad microbiana, además, la pérdida de la fertilidad del suelo (Vallejo, 2014).

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), menciona que las variedades de papa var. Superchola y la Unica, son las más producidas en Carchi, lo cual, convierte a la provincia del Carchi en uno de los grandes productores de papa, representando un 28.28% de la producción anual en año 2020 (ESPAC, 2020).

Es así que, en el año 2020, en el 79.0% de la superficie se aplicaron insumos de síntesis química, el 7.9% no usa ningún tipo de insumo, el 9.2% usa insumos orgánicos en combinación con químicos, mientras, que en el 3.9% usa únicamente insumos orgánicos. Los datos revelan que los agricultores continúan con el uso desmedido de insumos químicos para la producción de los cultivos (ESPAC, 2020).

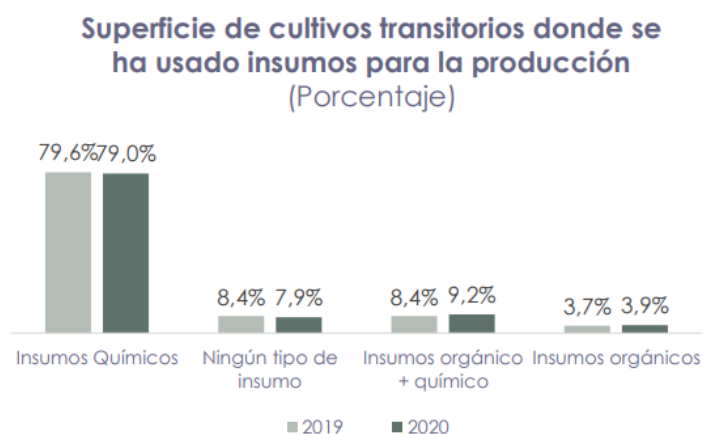


Figura 1. Uso de insumos químicos (INEC- ESPAC, 2020)

El Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), en el 2020 determinó que el cultivo con mayor aplicación de fertilizantes es la papa con 468 Kg/ha, a comparación, del año 2019 el cual tuvo una aplicación de 458 Kg/ha, estos valores reflejan que se ha venido dando un excesivo uso de productos químicos durante la producción de papa (Figura 2) (INEC, 2020).

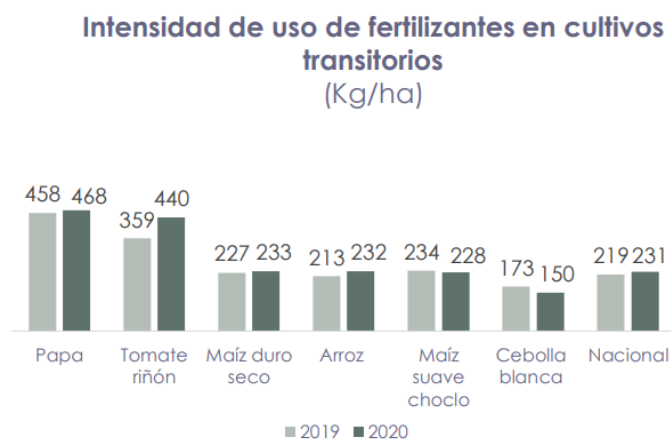


Figura 2. Intensidad de fertilizantes en los cultivos transitorios (INEC- ESPAC, 2020)

El desconocimiento sobre el manejo integral de plagas y el plan de fertilización por parte de los productores, han llevado al uso desmedido de agroquímicos. Ignorando que está provocando el desgaste, contaminación por el efecto residual, desequilibrio de nutrientes y por ende daños al medio ambiente. Además de reducir la carga microbiana, generar resistencia en plagas y enfermedades como resultado de la excesiva aplicación de fungicidas para controlar la severidad de los ataques (Ecoclimático, 2008).

El Tizón tardío (*P. infestans*), es considerado la enfermedad que más pérdidas causa al cultivo de la papa en Ecuador, esta enfermedad debido a su rápida diseminación ha logrado generar pérdidas que van desde un 30% hasta el 100 % del rendimiento total del cultivo (Oyarzun et al., 2001).

En cuanto a factores económicos el controlar y superar el ataque de tizón tardío en el cultivo de papa ha superado el 20% de los gastos totales durante la producción. Para ello se ha considerado a el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas sobre los patógenos como una alternativa amigable con el medio ambiente y de alguna manera reducir la aplicación productos de síntesis química (Bettioli, 2014).

Además, se ha determinado que la exposición prolongada a productos químicos puede causar en los seres humanos trastornos cardiopulmonares, neurológicos, hematológicos, enfermedades de la piel y trastornos endocrinos (Campos, 2016).

El presente estudio se enfoca en evaluar la actividad fungicida de *T. harzianum* y *T. viride* sobre *P. infestans* causante de la enfermedad tizón tardío, la cual genera un impacto negativo en los cultivos de papa de la provincia del Carchi. Mediante la experimentación en laboratorio y en invernadero, se evaluará la actividad fungicida de los extractos que *Trichoderma* producen. Los productos a base de microorganismos ofrecen proteger contra el ataque de patógenos, mayor aprovechamiento de los nutrientes del suelo, mayor captación de agua, estimulación del crecimiento aéreo, radical y el incremento de sus rendimientos (Vargas, 2012).

1.3 Justificación

La principal amenaza biológica que ataca al cultivo de papa es el oomycete *P. infestans* causante de la enfermedad del tizón tardío además, es considerado el responsable de causar cuantiosas pérdidas en la producción global que han alcanzado valores de hasta el 15% por año (Gebhardt y Valkonen, 2001). El mecanismo para

contrarrestar estas pérdidas es la aplicación de fungicidas de síntesis química. Sin embargo, aplicar estos métodos de control generan un sin número de desventajas entre ellas se mencionan: difícil acceso a los productos, costo elevado para los pequeños agricultores, efectos nocivos en la salud, uso inadecuado de productos químicos y la aparición de nuevas cepas resistentes (Fry 2008; Barona 2009). *P. infestans* posee elevada capacidad evolutiva debido a la flexibilidad de su genoma (McDonald y Linde 2002), generando variaciones genéticas y la aparición de poblaciones nuevas y agresivas (Raffaele et al. 2010).

La Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB), ha definido al control biológico como, "la aplicación de microorganismos vivos o productos derivados de los mismos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos" (UNAB, 2017). Los hongos del género *Trichoderma* han sido empleados en una serie de investigaciones previas en las cuales ha mostrado resultados favorables y de importancia en cuanto a la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Fusarium* spp. y *Phytophthora* spp, principales causantes de enfermedades (Fuentes, 2016; Amaral, 2008). *P. infestans* ha desarrollado resistencia a fungicidas lo cual determina una menor sensibilidad del patógeno hacia los productos químicos. La resistencia es resultado de mutaciones estables y heredables. *P. infestans* ha generado resistencia al ingrediente activo metalaxyl componente principal de productos agroquímicos empleados para el control de tizón tardío. Además, otras fenilamidas que han sido reportadas como causantes de variaciones genéticas dentro de las poblaciones de *P. infestans* a nivel mundial.

Esto ha limitado la efectividad de los fungicidas como métodos de control sobre la enfermedad. Razón por la cual se considera que *Trichoderma* por su alta capacidad reproductiva, tolerancia a condiciones desfavorables, capacidad de modificar la rizosfera y su fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos. Como un controlador biológico y antagonista natural de patógenos, tales como: *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Sclerotinia* spp, *Pythium* spp, *Phytophthora* spp, *Alternaria* spp, y *Phytophthora capsici* entre otros (Medina, 2013).

1.4 Pregunta directriz

¿Puede *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* disminuir la incidencia y severidad de *Phytophthora infestans*?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general.

Evaluar la actividad fungicida de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en el control de *Phytophthora infestans*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Aislar el agente causal del tizón tardío en cultivo de *Solanum tuberosum*.
- Analizar la actividad inhibitoria de los extractos producidos por los hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en el control de *Phytophthora infestans*.
- Evaluar la efectividad fungicida de los extractos mediante bioensayos.

1.6 Hipótesis

Trichoderma harzianum y *Trichoderma viride* influyen en el crecimiento de *Phytophthora infestans*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 El cultivo de Papa (*Solanum tuberosum*).

El INIAP (2006), menciona que la var. Superchola fue desarrollada por el señor Germán Bastidas, agricultor del cantón Montúfar, provincia del Carchi. La variedad Superchola proviene de los cruzamientos entre las variedades Curipamba negra y *Solanum demissum*, dando origen a Curicana con características como papa roja, ojos blancos y forma de plancha. Posteriormente Curicana fue cruzada con *Solanum phureja* dando un híbrido el cual se cruza con Chola. De tres genotipos escogidos los cuales expresaron similitud en cuanto a características correspondientes a la variedad Chola. Los clones obtenidos se cruzaron entre sí siendo su mejor descendencia quien dio origen a la variedad Superchola (Huamán, 1990). Esta variedad posee características superiores en comparación con la variedad Chola, en cuanto a calidad, rendimiento, tolerancia a enfermedades y características de calidad culinaria. (Saquina, 2012).

2.2 Condiciones agroecológicas para el cultivo de papa

Suelo: El suelo adecuado para el cultivo de papa requiere una textura fina y profundidad superior a los 40 cm, lo cual permite el desarrollo de las raíces. Sin embargo, dentro de los requerimientos del cultivo se encuentra que el suelo debe contar con una porosidad del 50% distribuida y equilibrada entre microporos, macroporos y mesoporos, los cuales se encargaran de mantener el agua y aireación en el área radicular en el nivel adecuado. Prever que el contenido de materia orgánica supere el 5%, permitiendo así aumentar la actividad biológica, manteniendo la sanidad y el riesgo de erosión del suelo (Cruces et al., 2001).

pH: El pH del suelo es importante para el desarrollo del cultivo y se establece entre 5.5 a 7.0. En suelos con pH inferior a 5.5 pueden aumentar los niveles de aluminio y manganeso, siendo tóxicos para la planta. Por otro lado, con pH superior a 7.5 se ve limitada la capacidad de absorción de hierro, manganeso y zinc (Rojas y Alvarado, 2006).

Condiciones agroecológicas: El cultivo de papa, para su desarrollo requiere altitudes entre los 2000 hasta los 3500 m.s.n.m. La altura es determinante en la temperatura ambiente y sus efectos generan problemas en el desarrollo de la planta y en

el rendimiento del cultivo (Pietrarelli, et al., 2014). Las temperaturas óptimas para el cultivo de papa se encuentran entre los 12°C y los 14°C. Además, el cultivo debe contar con un suministro de agua entre 600 a 800 mm por año, correctamente distribuidos (Monómeros, 1980).

Reacción a enfermedades: La papa con el paso del tiempo ha logrado adquirir resistencia a enfermedades patógenas, sin embargo, es susceptible a lancha (*P. infestans*), moderadamente resistente a roya (*Puccinia pittieriana*) y tolerante ante el nematodo del quiste de la papa (*Globodera pallida*) (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.3 Desarrollo fenológico

El cultivo de papa se encuentra establecido en el siguiente ciclo fenológico el cual se encuentra segmentado en 5 etapas, partiendo de la etapa 1: emergencia o brotación, 2: crecimiento de brotes laterales, 3: inicio de la tuberización, 4: Llenado de tubérculos hasta concluir su ciclo con la maduración y la cosecha (Novagro-AG, 2021).

Emergencia o brotación: Etapa en la cual ya se ha realizado la preparación del suelo y la colocación del tubérculo semilla en el surco destinado para su crecimiento. El tiempo de duración de esta etapa se encuentra ligada a las condiciones en la cual fue almacenada la semilla, variedad y estadio de los brotes en el tubérculo semilla. Así inicia el crecimiento de la planta presentando un crecimiento inicial de raíces, seguido de tallos y hojas (Figura 3, A) (Novagro-AG, 2021).

Crecimiento de brotes laterales: La etapa de crecimiento se da a partir de que la plántula realiza procesos fotosintéticos para dar lugar al crecimiento de la parte aérea: tallos, ramas y hojas de la nueva planta. Además, en la parte subterránea da inicio al alargamiento de los estolones (Figura 3, B) (Novagro-AG, 2021).

Inicio de la tuberización: La planta sigue su crecimiento vegetativo en su parte aérea, consecuentemente en la parte subterránea se están formando los tubérculos que comienzan su desarrollo en la punta de los estolones (Figura 3, C) (Novagro-AG, 2021).

Llenado de tubérculos: El llenado de tubérculos se da cuando estos inician el proceso de expansión como producto de la acumulación de líquidos, nutrientes y carbohidratos. Así mismo en esta etapa se da el inicio de la floración de la planta (Figura 3, D) (Novagro-AG, 2021).

Maduración: Maduración es la finalización del proceso de crecimiento de la planta y la fase durante la cual realiza la fotosíntesis debido a que la planta toma un color amarillo como señal de que la planta está cumpliendo su ciclo de vida. Además, los tubérculos finalizan la formación de la piel externa así como su preparación para la cosecha (Figura 3, E) (Novagro-AG, 2021).



Figura 3. Desarrollo fenológico de la papa, A) Emergencia o brotación, B) crecimiento de brotes laterales, C) Inicio de la tuberización, D) Fase de llenado de tubérculos, E) maduración (Pérez, 2015)

2.4 Manejo agrícola, fertilización del cultivo de papa.

El suelo agrícola posee la capacidad de aportar a la planta los nutrientes requeridos por las plantas, sin embargo, la planta necesita una nutrición apropiada y balanceada, por ende, se necesita solventar en déficit con fertilizantes (Torres, Valverde y Andrade, 2012).

El Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) poseen un efecto evidente sobre la producción y una mejora positiva al aplicar de manera simultánea estos elementos (Pérez, Rodríguez y Gómez, 2008). Para alcanzar el correcto desarrollo radicular y aéreo, el cultivo de papa requiere una alta disponibilidad de P en el suelo, mientras que en época de mayor crecimiento vegetativo necesita N y para el desarrollo y calidad de tubérculos requiere K por su participación en el transporte de fotosintatos desde las hojas (Alvarado et al. 2008).

Urea, La urea es un fertilizante sólido granulado que proporciona altas cantidades de Nitrógeno (N), originalmente no contiene amonio (NH_4), sin embargo, por efecto de la enzima “ureasa” se hidroliza con rapidez lo que produce amonio y bicarbonato (Fertinova, 2015). Este es ampliamente utilizado por su rápida disponibilidad y propiedades químicas que le hacen compatible con otros agroquímicos (QuimiNet, 2008).

Fosfato Diamónico, El fosfato de amonio (DAP de sus siglas en inglés) es el fertilizante de fósforo (P) más utilizado. Se considera un complejo químico por contar con dos nutrientes primarios (fósforo, nitrógeno) en su formulación. Al realizar la aplicación en plantas, genera un incremento momentáneo del pH del suelo. Sin embargo, con el paso del tiempo el suelo se vuelve ácido como efecto de la nitrificación del amonio (IPNI, 2012).

Muriato de Potasio, Los fertilizantes potásicos se aplican para corregir el déficit nutricional de las plantas. La humedad del suelo hace que el KCl se disuelva rápidamente y el K es retenido con la materia orgánica del suelo. Sin embargo, el Cl se mueve rápidamente con el agua del suelo (IPNI, 2013). El K es indispensable en los procesos fotosintéticos, así como también en la síntesis de proteínas y la descomposición de carbohidratos para la producción de energía, (Pumisacho y Sherwood, 2002).

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) menciona que, es fundamental realizar previamente un análisis de suelo con la finalidad de conocer las características que posee y adecuar el plan de fertilización necesario de acuerdo con los

requerimientos nutricionales. Las cantidades de fertilizantes necesarias para obtener rendimientos favorables en el cultivo de papa están detallados en la Tabla 1 (INIAP 2009).

Tabla 1.

Fertilización para papa

Análisis de suelo	N	P ₂ O ₅	K	S
(kg/ha)				
Bajo	150 – 200	300 – 400	100 – 150	20 – 30
Medio	100 – 150	200 – 300	60 – 100	10 - 20
Alto	50 – 100	100 - 200	30 - 60	0 - 10

Fuente: INIAP (2009). Guía de recomendaciones de fertilización.

2.5 Factores bióticos y abióticos que afectan al cultivo.

Factores abióticos: Las pérdidas causadas por heridas mecánicas pasan desapercibidas, esto hace que estas pérdidas sean difíciles de estimar. En la mayoría de casos, las pérdidas por daños mecánicos se dan en la cosecha y poscosecha debido a la manipulación de los tubérculos (selección, clasificación, ensacado y transporte). Se estima que un 75% del total de los tubérculos afectados es porque han sufrido algún tipo de daño durante la poscosecha (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Factores bióticos: Las pérdidas por daños fisiológicos en su mayoría se dan al exponer los tubérculos a temperaturas extremadamente altas. Que alteran los procesos de respiración natural de los tubérculos lo cual genera la pérdida del agua por efecto de la transpiración. El daño que se genera por factores fisiológicos depende totalmente de las condiciones y el ambiente de la bodega de almacenamiento de los tubérculos (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Cuando los tubérculos son almacenados en espacios donde la cantidad de oxígeno es deficiente estos son propensos a sufrir una serie de daños, entre ellos se menciona los siguientes: fermentación, pérdida de sabor, colapso del tejido y muerte (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.5.1 Tipos de enfermedades de acuerdo al organismo causal.

A lo largo de los años han existido factores patológicos los cuales son causantes de pérdidas tanto en tubérculos como pérdidas económicas en la fase de poscosecha en los cultivos de papa, sin embargo, no se descarta a los factores físicos y fisiológicos quienes predisponen a que la enfermedad ataque a los tubérculos una vez haya finalizado la cosecha. Los patógenos generalmente realizan una infección inicial antes de ser detectada como una invasión masiva de los productos y se hacen presentes como la sarna común, sarna polvorienta o deformaciones en el tubérculo como en las verrugas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.5.1.1 Nematodos

Los nematodos poseen forma cilíndrica, cuerpo alargado sin segmentación, aparato digestivo completo y una cutícula altamente resistente. Estos organismos generalmente no se los puede identificar a simple vista ya que su tamaño va de 0.2 a 7 mm, lo cual requiere de un microscopio para facilitar su identificación y reconocimiento. (Pumisacho y Sherwood, 2002).

El nematodo del quiste (*Globodera pallida*)

Esta especie de nematodo es considerado el más importante dentro del Ecuador ya que se encuentra distribuida en la mayor parte de la región andina. La afectación depende de la variedad de papa, calidad de semilla y época de siembra y estos atacan a todas las variedades de papa nativa y mejorada (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.5.1.2 Hongos

Las enfermedades causadas por hongos en el cultivo de papa pueden manifestarse con muchos síntomas diferentes, tales como: necrosis de la raíz, marchitez de la hoja debido a la invasión vascular, deformación del tubérculo y aglomeración debido al daño en la base del tallo. En general, las técnicas de supervivencia de los patógenos se basan en su capacidad para infectar cultivos, lo que les otorga una ventaja competitiva. Actualmente, existe una gran presión para limitar el uso de agroquímicos. El Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria (SESA), prohíbe el uso de la mayoría de los pesticidas utilizados para combatir las enfermedades del suelo. Por lo tanto, el manejo de estas enfermedades debe enfocarse en el manejo integrado de la salud del suelo.

Enfermedades de la papa causadas por hongos

Tizón tardío, *Phytophthora infestans*: Enfermedad de mayor impacto sobre el cultivo de papa a nivel nacional y por tal razón el riesgo de desarrollar esta patología es sumamente elevado. Sin embargo, se ha determinado que las condiciones más favorables para el desarrollo del tizón se encuentran a 2.800 y 3.400 msnm (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Tizón temprano, *Alternaria solani*: Enfermedad propia de lugares con clima templado, el tizón temprano afecta principalmente a cultivos de papa en estadios tiernos o tempranos. Sin embargo, sus ataques son frecuentes con una distribución general a lo largo del cultivo y rara vez es poco severo el ataque al cultivo (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Oidiosis, oidium o mildiu polvoso, *Erysiphe chichoracearum*: Enfermedad que aparece cuando los cultivos de papa se encuentran expuestos a condiciones de alta humedad. El ataque es mucho más severo cuando el cultivo se encuentra con deficiencias nutricionales, el agente causal puede desarrollarse en cualquier fase del cultivo sin distinción alguna (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Roya, *Puccinia pittieriana*: Enfermedad que afecta a los cultivos de papa, generalmente a los que se encuentran en terrenos altos o páramos en la región sierra, estos comprenden las provincias de Carchi hasta Loja. La roya ataca al cultivo cuando se encuentra en fase de floración, sin embargo, las pérdidas económicas por afectación de la roya son relativamente bajas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Septoriosis, *Septoria lycopersici*: Hongo patógeno con una distribución sumamente amplia en el Ecuador, Sin embargo, a pesar de que posee una incidencia baja esta enfermedad no ha sido de mayor consideración debido a los efectos epidemiológicos que este produce (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Lanosa o torvo, *Rosellinia sp.*: Enfermedad que genera un importante daño económico y de mayor preocupación principalmente en la provincia del Carchi. Este hongo tiene una particularidad, la ausencia de estructuras fructificantes este hongo se desarrolla en condiciones de alta humedad y contenido de materia orgánica (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Rhizoctoniasis o costra negra, *Rhizoctonia solani* Kühn: Enfermedad considerada los más comunes y dañinos de los suelos paperos en el Ecuador, posee tolerancia a la acidez lo cual le permite sobrevivir en condiciones precarias. Además, ataques moderados pueden generar pérdidas de un 20% de los suelos (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Pudrición seca, *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Fusarium sulphureum*: Pudrición seca es una enfermedad que se da en los tubérculos en el periodo de dormancia. Son hongos que se los encuentran en heridas causadas por la manipulación en la cosecha, transporte, clasificación y siembra (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Marchitez, *Fusarium* spp.: Enfermedad no frecuente en la Sierra ecuatoriana las temperaturas moderadas y las precipitaciones abundantes no favorecen su desarrollo (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Marchitez por verticillium, *Verticillium dahlia*, *V. Albo-atrum*: Enfermedad que más daño causa a nivel mundial, sin embargo en el Ecuador se ha encontrado en varios cultivos. Su incidencia en la Sierra presenta una fase saprófita muy activa, produce estructuras de latencia (micro-esclerocios) muy persistentes que sobreviven más de cinco años (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Roña o sarna polvorienta, *Spongospora subterranea*: Enfermedad con amplia distribución en la sierra, en los últimos años ha aparecido con más frecuencia en las zonas su aparición ha sido en la zona Centro y Sur donde se practica el monocultivos y se siembra de manera intensiva (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Pudrición acuosa, *Pythium* spp.: Enfermedad que se presenta en los tubérculos, en el Ecuador esta enfermedad es muy poco reconocida. El hongo infecta al tubérculo por daños mecánicos producidos durante la cosecha. Se desconoce que este patógeno posea resistencia genética ni productos para su control (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.5.1.3 Bacterias

Son causantes de todo tipo de pudriciones húmedas en el cultivo de papa. Las enfermedades bacterianas identificadas son pocas, sin embargo, son capaces de sobrevivir en los tubérculos y materia vegetal infectada. Estas enfermedades se hacen presentes cuando las condiciones de almacenamiento de los tubérculos cosechados no cuentan con una ventilación adecuada (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Enfermedades de la papa causadas por bacterias:

Pierna negra o pie negro, *Erwinia spp.*: Posee una amplia distribución en las zonas paperas del Ecuador, esta bacteria es un habitante común del suelo. Sin embargo, puede infectar a las semillas y rumas de papa en almacenamiento. La bacteria puede sobrevivir en los tubérculos y materia infectada y su control es sumamente complicado (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Sarna común, *Streptomyces scabies, Streptomyces spp.*: El agente causal se encuentra en el suelo y su afectación es directamente a la calidad de los tubérculos. La bacteria posee mejor adaptabilidad a condiciones de pH de 6.5 a 8.0 en la sierra Ecuatoriana (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Marchitez bacteriana, *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum.*: Ecuador país donde no se ha reportado esta enfermedad a pesar de haber detectado síntomas en tubérculos importados de Colombia. Esta bacteria puede permanecer en el suelo de dos a tres años y se transmite por el contacto entre raíces, y se moviliza por efecto del agua (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.5.1.4 Virus

Estas son partículas minúsculas que requieren microscopía electrónica para su detección. En papa, las enfermedades virales reducen el rendimiento y son un serio obstáculo para el comercio de semillas y germoplasma. Se dice que existen 24 virus y un viroide que parasitan los cultivos de papa, sin embargo, no todos están en el país. En cuanto a los vectores se han identificado a los siguientes (insectos, nematodos, hongos, plantas y humanos con sus herramientas agrícolas), Los síntomas más comunes causados por enfermedades virales son el mosaico, pero también manchas, marchitez de las hojas, arrugas, atrofia y necrosis (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Enfermedades de la papa causadas por virus:

Amarillamiento de las venas de la papa (*PYVV*), *Crinivirus*: El virus apareció en el país en 1998, su ingreso fue hace muchos años con la importación de variedades extranjeras. La mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) ha sido identificada como el principal vector. No hay evidencia de transmisión mecánica y los síntomas no siempre están presentes en las plantas afectadas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Virus del enrollamiento de las hojas (PLRV), *Potato Leaf Roll Virus*: El luteovirus es la enfermedad viral más importante en el cultivo de la papa, se está propagando a todas las regiones productoras de papa del mundo y puede reducir seriamente la eficiencia de la producción. En Ecuador, su presencia es poco frecuente y la extensión del daño varía según el lugar donde se cultive (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Virus leves o latentes (PVX, PVYS), *Potato virus X y S*: El PVX es un virus que en el Ecuador las infecciones son muy comunes en cualquier condición de cultivo. Durante muchos años se consideraron inofensivos debido al carácter latente de sus síntomas. Sin embargo, pueden causar pérdidas en la producción de alrededor del 10% (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Mosaico severo (PVY), *Potato virus Y*: Considerado el segundo virus de mayor importancia en el país. Se ha descubierto que este puede ocasionar reducciones de hasta un 60% en el rendimiento cuando se utilizan semillas muy infectadas. Su recurrencia en Ecuador es similar a la del PLRV y puede causar diferentes síntomas dependiendo de la cepa del virus, la cepa y las condiciones ambientales (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.5.1.5 Plagas

Las plagas causan pérdidas significativas en el rendimiento y la calidad de las papas. Estas plagas dañan hojas, tallos o tubérculos; alteran el crecimiento de las plantas; causan pudriciones o malformación y afectan la apariencia comercial y calidad culinaria de los tubérculos. Las plagas tienen el potencial de causar grandes pérdidas a la industria de la papa, afectar los medios de subsistencia de los agricultores, especialmente de los pequeños, e incluso afectar negativamente al medioambiente debido al incremento del uso de plaguicidas y al movimiento de cultivos a zonas altoandinas (CIP, 2020).

Enfermedades de la papa causadas por plagas:

Gusano blanco, *Premnotrypes vorax*: En Ecuador se le llama gusano blanco o arrocillo. La presencia de larvas de pulgón aumenta los costos de producción debido al uso excesivo de pesticidas. El daño a los tubérculos es visible durante la cosecha. En las provincias de Cañar, Carchi, Chimborazo y Cotopaxi, el valor comercial de los tubérculos afectados disminuye entre un 20% y un 50% (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Polilla de la papa, *Tecia solanivora* (Povolny): Lepidópteros que se alimentan de los tubérculos de la papa, es un insecto endémico que se propaga rápidamente debido al comercio de papa entre países. En 1996 se confirmó la presencia de una polilla de la papa en la provincia de Carchi en Ecuador. En el mismo año, SESA anunció una amenaza fitosanitaria en sus operaciones fitosanitarias (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Pulgón, *Myzus persicae* y *Macrosiphun euphorbiae*: El pulgón posee cuerpo blando en forma de pera, y las poblaciones de áfidos a menudo consisten en individuos sin alas, agrupados alrededor de una hembra. A veces aparecen con alas cuando invaden otros cultivos. Sin embargo, podrían ser un vector de virus (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Pulguilla, *Epitrix spp.* La pulguilla, es una especie de escarabajo de la familia Crysomelidae de color negro que salta con mucha facilidad. Se encuentra en la mayoría de las regiones productoras de papa, se alimentan de las raíces y regiones externas de los tubérculos, produciendo cicatrices en las papas cosechadas. El rendimiento comienza a disminuir cuando la infección se da en los primeros 60 días de crecimiento de la planta (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Trips, *Frankliniella tuberosi*: Insecto pequeño de cuerpo delgado y ventosas. Este insecto es amarillo cuando está inmaduro y negro cuando está maduro y se mueve por toda la planta, mayormente en el envés de las hojas inferiores y flores. Donde se alimenta, aparecen manchas plateadas y en algunos casos, manchas rojas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Mosca minadora, *Liriomyza huidobrensis*: La mosca minadora fue reportada en 1997 como una plaga de cultivos de papa en Carchi. Durante sequías prolongadas, el número de insectos aumenta significativamente. Cuando son adultas, las hembras hacen agujeros en las hojas donde ponen huevos, las orugas dejan las hojas y se entierran en el suelo, se convierten en pupa hasta tomar la forma de una mosca y crear un nuevo ciclo (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.6 Importancia del tizón tardío en el Ecuador

El tizón tardío es una de las enfermedades fúngicas que se presenta en casi todos los lugares donde la principal actividad es el cultivo de papa. En varias oportunidades el tizón tardío ha alcanzado proporciones desastrosas, en las afectaciones a los cultivos de

papa. La biología de la enfermedad y sus métodos de control eran desconocidos, el tizón tardío continuo siendo uno de los principales factores que limitan la producción de papa. Las plantaciones que presentan infección por *P. infestans* se destruyen por completo en poco tiempo, por lo que se consideran el problema más grave para la producción mundial (Agris, 2004). Si la enfermedad no es controlada las perdidas pueden ser del 100% e incluso con niveles bajos de infección la cosecha puede resultar no sea apta para su almacenamiento. En diversas localidades donde la producción de papa en su medio de subsistencia, el acceder al control químico es poco factible debido al elevado costo de los fungicidas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.6.1 Organismo causal

P. infestans, es un patógeno hemibiotrófico que bajo condiciones agrícolas y naturales su ciclo asexual permite a la población crecer rápidamente en el tejido del hospedero susceptible, los esporangios son producidos en esporangióforos y son de fácil diseminación con cambios en la humedad relativa, Los esporangios germinan a partir de los 20 a 25°C a partir del tubo germinativo o también liberan zoosporas a bajas temperaturas de 10 a 15°C (Ramírez y Zuluaga, 2013).

2.6.2 Ciclo de vida

El hongo *P. infestans* es una enfermedad que afecta a las hojas y tallos jóvenes de la planta. Es una de las enfermedades más agresivas en ataque severo y en condiciones adecuadas puede cubrir todo el cultivo en menos de una semana como se muestra en la Figura 4. Ataca en condiciones de temperaturas frescas (17 a 21°C) y de alta humedad relativa alrededor del 10% (Hernández, 2007). Su peligrosidad está siempre latente, ya que es una de las enfermedades más destructivas que existen, por la rapidez al diseminarse por el aire, su capacidad reproductiva y la gran afectación que caracteriza a este hongo.

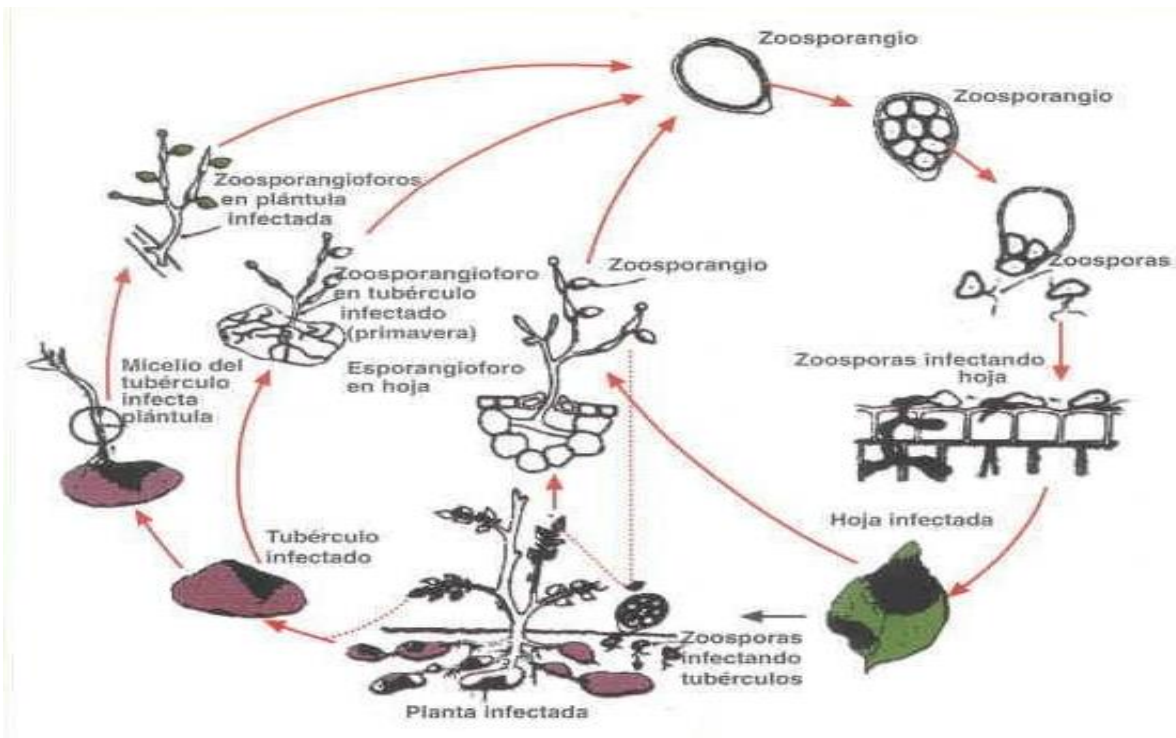


Figura 4. Ciclo de la enfermedad (epidemia policíclica) (Agrios, 2005)

2.6.3 Sintomatología

En las hojas las lesiones son de color marrón claro a marrón oscuro, de apariencia húmeda, de forma irregular, a veces se encuentran rodeadas por un halo amarillo que no se limita por las nervaduras de las hojas. Estos síntomas aparecen inicialmente en los bordes y puntas de las hojas. En condiciones de alta humedad, en el envés de las hojas se forman vellosidades de color blanquecino que son las estructuras fúngicas del patógeno (esporas y esporangios). Las lesiones crecen rápidamente, son de color marrón oscuro, aparecen manchas necróticas lo cual genera la muerte del tejido. En el campo, las plantas severamente infectadas exudan un olor característico debido al tejido de la hoja que se descompone rápidamente como lo describe la Figura 5, A (Pérez y Forbes, 2008).

En cuanto a tallos y peciolos se presentan lesiones necróticas, alargadas, de 5-10 cm de largo, de color marrón a negro, generalmente ubicadas en el tercio medio o superior de la planta. Cuando la enfermedad alcanza todo el diámetro del tronco, es susceptible a ser derribado por personas, implementos agrícolas o vientos fuertes. En condiciones de alta humedad, la esporulación se da en las lesiones, pero no tanto como en las hojas como lo muestra la Figura 5, B (Pérez y Forbes, 2008).

Los tubérculos infectados tienen manchas irregulares ligeramente hundidas y la corteza marrón rojiza. La sección transversal muestra una delgada extensión desde la superficie exterior hasta el núcleo en forma de aguja (Pérez, Forbes, 2008). En la última etapa, se produce una descomposición granular de color marrón oscuro a marrón. En este caso, la caries secundaria es causada por otro hongo (*Fusarium*) y bacterias (*Erwinia Clostridium*), provocando la pudrición del tubérculo y dificultando el diagnóstico así como se puede apreciar en la Figura 5, C (Torres, 2011).

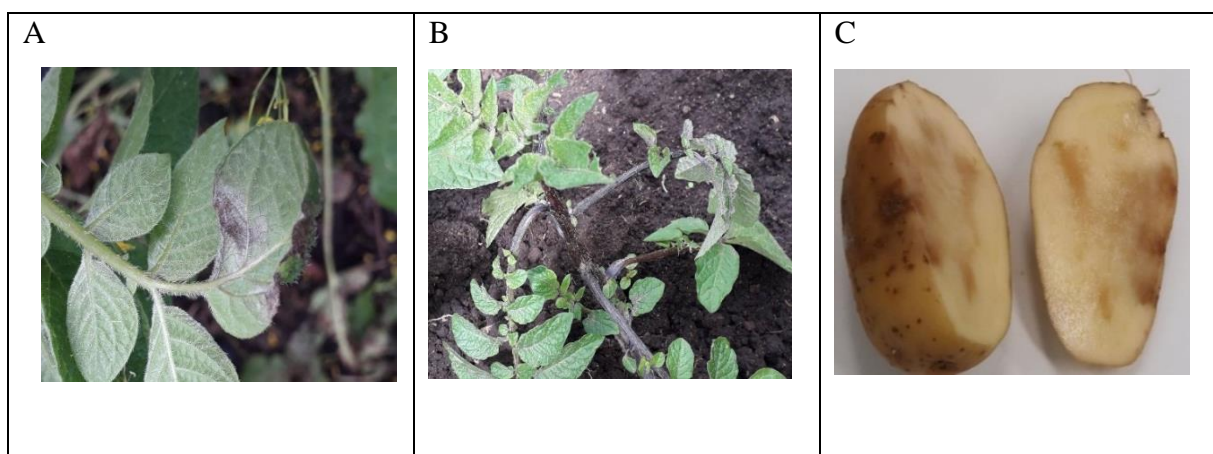


Figura 5. Sintomatología de tizón tardío, A) hoja, B) tallo, C) tubérculo.

2.6.4 Epidemiología

Los esporangios germinan mediante la formación de un tubo germinativo el cual penetran directamente en la cutícula de la planta. Las temperaturas inferiores a 15°C ayudan a producir de 6 a 8 zoosporas en cada esporangio, que son expulsadas a través de las porosidades. Por acción del agua en la superficie de la hoja dando origen a la formación de quistes en la hoja causando la enfermedad del tizón tardío (Pérez, Forbes, 2008). A medida que el tubo germinativo se desarrolla en el tejido infectado este se ramifica formando hifas intercelulares en el tejido vivo, cuando el tejido infectado muere, el micelio continúa ramificándose alrededor del tejido necrótico, aumentando el tamaño de la lesión. Cada célula puede producir de 100.000 a 300.000 esporangios por día, por lo que en condiciones frescas y húmedas, el inóculo se produce en poco tiempo. Cuando las plantas se infectan, las esporas desprendidas de las hojas logran atravesar grandes distancias lo que le permite propagarse a las plantas (Acuña y Gutiérrez, 2004).

2.7 Manejo del tizón tardío

El manejo integrado es el uso de diferentes métodos para el control de enfermedades con el objetivo de reducir o evitar sus pérdidas. Esto permite a los agricultores obtener mayores beneficios, evitar afectaciones a la salud humana y al medio ambiente. Entre los principales métodos para el manejo del tizón tardío se menciona a: el control genético, químico, cultural y biológico tal como se detalla en la Figura 6.

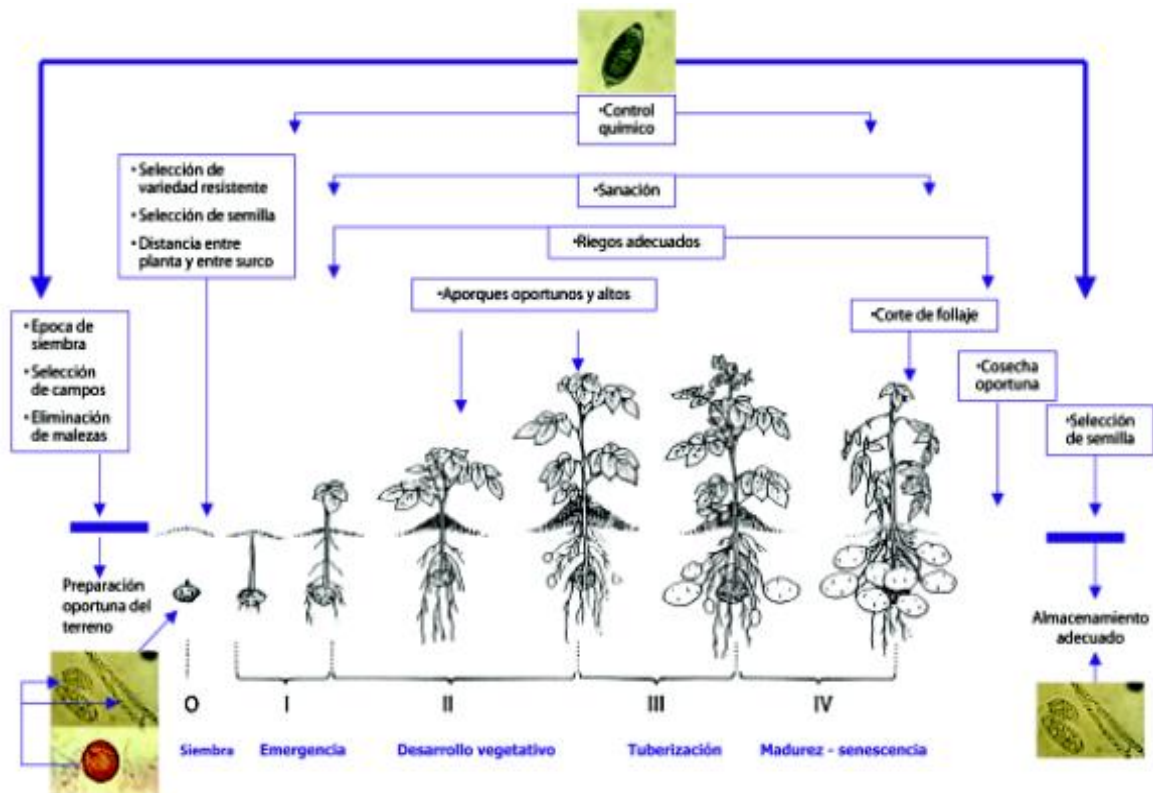


Figura 6. Manejo integrado de Tizón tardío (Pérez, 2008).

2.7.1 Control Genético

Esto incluye el uso de la capacidad de ciertas especies de plantas para suprimir el desarrollo de enfermedades debido a sus propiedades inherentes. La mayoría de los genes empleados en el control genético conocidos hasta la fecha se derivan principalmente de *Solanum demissum*. Y recientemente se descubrieron dos nuevos genes de *Solanum berthaultii* (Pumisacho y Sherwood, 2002).

2.7.2 Control Químico

Esto implica el uso de productos químicos que pueden prevenir la infección o ejercen control después de haberse presentado la infección del cultivo. Los productos

utilizados para el control del tizón se clasifican en productos de contacto, sistémicos y translaminares, muchos de estos productos se utilizan para combatir el tizón tardío en cultivos de papa (Pérez y Forbes, 2008).

2.7.3 De contacto

Generalmente son los que actúan sobre la superficie de las plantas para evitar la germinación y la entrada de patógenos, reduciendo así la etapa inicial de las enfermedades. Estos se llaman fungicidas preventivos, residuales o de contacto. Uno de los más importantes es el cobre y el ditiocarbamatos que solo se encargan de proteger el área donde se da la concentración del fungicida, sin embargo, las hojas después de rociar el producto no están protegidas de patógenos (Pérez y Forbes, 2008).

Sistémicos: Estos son los productos que son absorbidos por las hojas o raíces. La transferencia se da internamente hacia arriba y a veces hacia abajo a través del xilema y el floema. Es capaz de proteger las hojas nuevas después de la aplicación. Inhiben algunas etapas específicas en el metabolismo de los patógenos. En el caso de algunos productos, su uso continuado ha provocado la aparición de cepas resistentes a los fungicidas (Pérez y Forbes, 2008).

Translaminares: Son los productos que pueden atravesar las hojas pero no puede pasar entre las hojas, por lo que las hojas generadas después de rociar el producto químico no están protegidas de los patógenos. El uso de productos químicos translaminares para controlar el tizón de la papa comenzó aproximadamente hace 140 años. Al inicio de los tiempos se utilizaron productos como cloruro de sodio, cal y azufre, pero no eran muy efectivos (Pérez y Forbes, 2008).

Productos como zineb, maneb, metiran, mancozeb y propineb, complementan los fungicidas utilizados para el control del tizón tardío. Los pesticidas sistémicos ingresaron al mercado agrícola en la década de 1970. Los productos de Metalaxil, Ofurace, Oxadyxyl y Benaxil pertenecientes al grupo de las fenilamidas se consideran los más efectivos debido a su alta eficiencia para matar a los agentes patógenos incluso después de la infección de la planta (Pérez y Forbes, 2008).

2.7.4 Control Cultural

Se denomina control cultural a todas aquellas actividades que son realizadas a lo largo del desarrollo del cultivo de papa, estas técnicas se encargan de modificar el

microclima, condiciones para el patógeno y así reducir su actividad (Pérez y Forbes, 2008).

Técnicas culturales para el control de tizón tardío en el cultivo de papa:

Época de siembra: Se debe llevar una correcta planificación de las épocas de siembra, evitando realizar la siembra en fechas donde la enfermedad ha reportado mayor incidencia.

Selección de campos de cultivo: Se debe tomar en cuenta las condiciones geográficas del terreno, Además, deben contar con facilidad de drenaje y ventilación evitando así acumulación de humedad.

Eliminación de plantas voluntarias y malezas: No se debe recaer en el monocultivo, ya que de esta manera se evitará la dispersión del inóculo primario presente en plantas o residuos de la siembra anterior.

Selección de variedad: Se debe evitar sembrar variedades diferentes debido a que de esta manera controlar una enfermedad es mucho más sencillo y se lo realizará de la manera adecuada.

Selección de semilla: Se debe tener la seguridad de la sanidad de las semillas adquiridas antes de realizar la siembra, hasta la actualidad no se logrado desinfectar con fungicidas las semillas infectadas.

Distancia entre plantas y entre surcos: Se debe mantener las distancias adecuadas entre plantas para disminuir la humedad en el follaje, esta práctica se la debe hacer dependiendo de la finalidad del cultivo, consumo u obtención de semillas.

Aporques: Se debe evitar el contacto de los tubérculos con residuos de plantas infectadas, para lo cual se realizan aporque con altitud suficiente para disminuir el contacto directo.

Nutrición de las plantas: Contar con el plan de fertilización adecuado para el cultivo ya que se ha reportado que a concentraciones altas de nitrógeno contribuye al desarrollo de la enfermedad

Corte del follaje: Es recomendable que 15 días antes de llevar a cabo la cosecha se debe cortar el follaje y retirarlo a un costado del cultivo, evitando así infectar a los tubérculos cosechados.

Riegos: Se debe controlar el plan de riegos para evitar generar inundaciones en los cultivos, que dan lugar a microclimas favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Saneamiento: Realizar aplicaciones de desecantes para disminuir las fuentes primarias del patógeno y evitar el esparcimiento de la enfermedad.

Cosecha oportuna: Cosechar de manera oportuna y evitar hacerlo en condiciones de humedad ya que estas condiciones permiten el desarrollo y diseminación de la enfermedad.

2.8 Control biológico

Es controlar una enfermedad en los cultivos a través de la interacción de uno o más microorganismos vivos. El antagonismo de varios microorganismos entre ellos *P. infestans*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Myrothecium spp*, *Trichoderma* y *Fusarium*, han sido descritos en varios trabajos experimentales. Muchos informes muestran que después de rociar las hojas y tallos de las plantas de papa con el líquido producido por los microorganismos presentes en los preparados compiten con *P. infestans* por el espacio en la superficie de los órganos de la planta, lo que dificulta la colonización de patógenos y la infección posterior (Pérez y Forbes, 2008).

2.8.1 *Trichoderma* como organismo biocontrolador

Trichoderma posee la capacidad de antagonizar a otros hongos patógenos, empleando sus diferentes mecanismos de control. La producción de enzimas líticas y su capacidad de producir metabolitos secundarios son empleados para la protección de las plantas contra enfermedades fúngicas (Woo, 2014). Entre algunos de los metabolitos que son producidos por *Trichoderma* se mencionan péptidos no ribosómicos tales como: peptaiboles, sideróforos, micotoxinas, policétidos, terpenos, pironas, entre otros (Zeilinger y Bansal, 2016).

2.8.1.2 *Trichoderma viride*

Persoon fue la primera persona en descubrir la especie de *T. viride*, en el año 1974. Es un hongo filamentoso que se encuentra abundantemente en los suelos, plantas, vegetación muerta y madera, además, se caracteriza por pertenecer al grupo de los anaerobios facultativos. El crecimiento de *T. viride* es favorable cuando el entorno posee

una mayor densidad de raíces que pueden ser colonizadas por esta especie de microorganismos (Bruguera, 2005).

Morfología

T. viride a una temperatura de 20°C al cabo de 5 días puede formar una colonia de 7.5 cm. Durante su crecimiento micelial se torna blanco amarilloso que después pasará a tono blanco verdoso con insertos de conidios verde oliva con textura correosa (González, 2000; Samson, 2004). Posee hifas de pared rugosa, hialinas, ramificadas, septadas que dan origen a conidióforos ramificados sus fiálides agrupadas (entre 2 y 4), da una estructura cilíndrica. En condiciones no favorables presenta clamidosporas terminales o intercalares (Figura 7) (Samson, 2004).



Figura 7. Hifas y conidióforos de *T. viride*

2.8.1.3 *Trichoderma harzianum*

Es un hongo filamentoso con alta capacidad antagonista, empleado en el control biológico de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Shafi et al., 2017). En la agricultura es mayormente utilizado debido a sus propiedades como biofungicida, bioestimulante y biofertilizante (Aguar, 2014). Lo cual hace que el interés científico que genera esta especie se encuentra directamente relacionado con los mecanismos de control frente a hongos fitopatógenos, acciones como, competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo y la antibiosis (Vargas y Gilchrist, 2015). *T. harzianum* es un hongo cosmopolita que se encuentra distribuido a nivel mundial en diversos ecosistemas y entornos naturales. Habitualmente se desarrolla en lugares con alta carga de material vegetal orgánico, como restos de cosechas y suelos húmicos (Chavarría y Torrez, 2010).

Morfología

T. harzianum, se caracteriza por tener micelio septado, generalmente esporangios ovalados, conidióforo hialino no verticilado, fiálides singulares o agrupadas, y conidios unicelulares (Arango, 1988). A nivel macroscópico, se puede distinguir fácilmente el color blanco verdoso o amarillo verdoso de la colonia. Además, se observaron anillos concéntricos en las áreas de esporas y el reverso de la colonia era de color amarillo, ámbar o amarillo verdoso (Howell, 2003). A nivel microscópico se observaron conidióforos erectos, hialinos, ramificados y no verticilados, se presentan en grupos o solitarios. Las filiales tienen forma de pera, con centros abiertos y tapas delgadas y poseen un ángulo entre filiales de 90° (Samson, 2004; Sharna, 2009) (Figura 8).

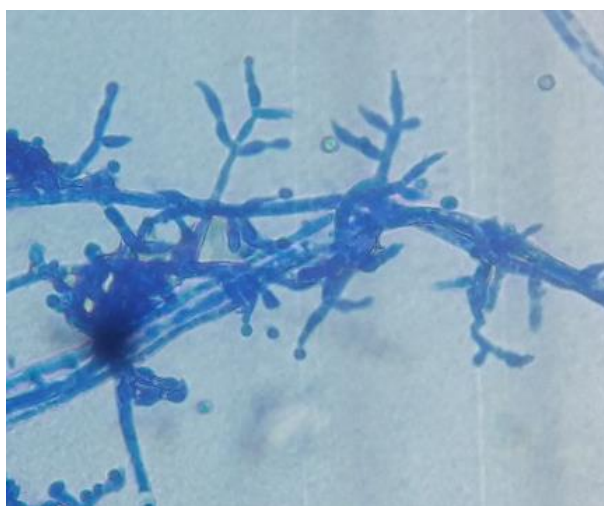


Figura 8. Hifas y conidióforos de *T. harzianum*

2.8.2 Mecanismos de acción.

La capacidad de *Trichoderma* en el biocontrol constituyen diversos mecanismos de acción que han desarrollado sobre hongos fitopatógenos (Lorenzo, 2001). Entre los principales mecanismos de acción directa se encuentran, la competencia por espacio y nutrientes, la antibiosis y el micoparasitismo (Infante, 2009; Mishra, 2015). La efectividad biocontroladora de *T. harzianum* se incrementa por su capacidad reproductiva para colonizar las plantas (Medina et al., 2019). Además, la producción de enzimas y compuestos inhibidores, forman parte de los mecanismos de biocontrol (Summi et al., 2015).

2.8.2.1 Competencia.

Es el comportamiento que desarrollan dos individuos para suplir un requerimiento común, como puede ser el sustrato o nutrientes. La competencia se basa en la capacidad de los organismos para superar las habilidades del otro. *T. harzianum* tienen gran capacidad antagónica debido a que su desarrollo es realmente rápido. El efecto biocontrolador es favorecido por su capacidad para adaptarse a diferentes ecologías y condiciones adversas. Posee gran habilidad de movilización y aprovechamiento de los nutrientes, principalmente carbohidratos, nitrógeno y polisacáridos. Es así como rápidamente es capaz de colonizar el medio, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat.

2.8.2.2 Micoparasitismo.

Es la interacción antagónica que posee el hongo controlador y el patógeno a tratar. Para llevar a cabo este mecanismo intervienen enzimas extracelulares presentes en la pared celular de los hongos colonizados (quitinasas y celulasas). La acción se desarrolla en 4 etapas:

- Crecimiento quimiotrófico: es el crecimiento directo de un organismo hacia un estímulo químico. *Trichoderma* detecta el patógeno y sus hifas crecen alcanzando al patógeno como respuesta al estímulo químico (Lorenzo, 2001).
- Reconocimiento: investigaciones previas han determinado que *Trichoderma* es antagonista de fitopatógenos (Lorenzo, 2001). Moléculas como las lectinas-carbohidratos del hospedero, hacen que este sea susceptible a ser parasitado por el hongo controlador.
- Adhesión y enrollamiento: las hifas de *Trichoderma* tienen la facilidad de adherirse al hospedero formando estructuras con similitud a ganchos apresorios. Este proceso se basa en procesos enzimáticos y la asociación de un azúcar de la pared de *Trichoderma* con una lecitina de la pared del fitopatógeno.
- Actividad lítica: se lleva a cabo con la degradación de la pared celular del patógeno, facilitando la penetración de las hifas de *Trichoderma*. Las enzimas líticas que intervienen en este proceso son quitinasas, glucanasas y proteasas (Enrique, 2001). En la etapa final el hongo produce enzimas líticas extracelulares que degeneran la pared celular del patógeno colaborando a la penetración de las hifas (Infante et al., 2009).

2.8.2.3 La antibiosis.

Acción de los antibióticos o metabolitos producidos por los microorganismos sobre un patógeno sensible a estos compuestos (Gupta et al., 2014). Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles. Algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibidoras son consideradas "antibióticos" (Sinuco et al., 2017).

2.9 Biorreactores

Los biorreactores a escala semi-industrial, se han reportado en sus inicios como bioceldas de poliestireno de 25 × 34cm (Michel et al., 2008), Además, de bandejas plásticas rectangulares de 30 × 15cm (Fernández y Larrea, 1997). Sin embargo, Agamez (2008) modificó estas, adaptando un orificio de 2 cm de diámetro en un extremo. Se colocó un tubo de PVC de 5 cm de largo, en este introdujo algodón y gasa para ser humedecido con alcohol al 95%. Esto permite el intercambio gaseoso desde el interior del reactor hacia el exterior, evitando el ingreso de agentes contaminantes. A partir de estos se ha llevado a diseñar biorreactores mucho más estructurados, mejorar el rendimiento y pureza del producto final. Con el paso de los años se ha descrito biorreactores de 14 litros con turbinas industriales (Flores y Hassan, 2003).

2.9.1 Medio de cultivo y requerimientos de operación

Fuente de carbono: *Trichoderma* puede degradar polímeros complejos de carbono como el almidón, la pectina y la celulosa. Estos procesos se dan debido al complejo de enzimas hidrolíticas que estos hongos poseen (Moore y Landecker, 1996). Sin embargo, si se emplean sustratos que sean duros como el aserrín, su crecimiento se ve dificultado. Otra alternativa para el crecimiento de *Trichoderma* es la utilización de sustratos degradables como la lactosa o la celulosa (Esterbauer y Steiner, 1991).

Fuente de nitrógeno: Son capaces de asimilar una serie de compuestos nitrogenados, entre ellos: aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996). Sin embargo, el crecimiento de estos hongos se puede ver limitado cuando el medio de cultivo o sustrato posee una excesiva carga de nitrógeno (Flores y Hassan, 2003).

Relación carbono-nitrógeno: Las fuentes de carbono en el medio líquido deben ser en relación 10:1 (Bridge, 2005). Deben ser abundantes en carbono y limitadas en

nitrógeno, que inhibe el crecimiento del micelio y activa la esporulación. Además de conocer que las concentraciones adecuadas para hongos según Ertola et al. (1.987) son $CH_{1.79} O_{0.5} N_{0.2}$, (Elósegui, 2006).

Microelementos: Los minerales y sales no son esenciales para el crecimiento de hongos (Papavizas, 1985) pueden pasar de ser inductores de crecimiento a ser sustancias tóxicas (Somashekar et al., 1983). Además, existen vitaminas como: piridoxina, tiamina (B6), piridoxina (B6), niacina (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalamina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore, 1996), que ayudan a suplementar el medio de cultivo en caso de existir una deficiencia nutricional.

Humedad (%): *Trichoderma* presenta bajo nivel de tolerancia osmótica (Kredics et al., 2003). El exceso de humedad limita la disponibilidad de oxígeno, lo cual impide el desarrollo del hongo. Por otro lado, la humedad no permite la movilidad de nutrientes en solución. *Trichoderma* puede crecer en un rango de humedad del medio del 30 al 75 %. Sin embargo, algunos autores recomiendan una humedad del 70-80 % (Agamez et al., 2008).

Temperatura (°C): *Trichoderma* puede desarrollarse en un intervalo de temperatura desde los 10 hasta los 40 °C, fuera de este rango puede ocurrir desnaturalización de proteínas, inhibición de enzimas, supresión o promoción de metabolitos, pérdida de viabilidad y muerte celular. Por otro lado, la temperatura óptima de crecimiento depende de la especie, por lo general se ubica en un rango más estrecho de 15-30 °C. La temperatura óptima de producción de celulasas está entre 25-28 °C (Esterbauer y Steiner, 1991).

pH: Es un parámetro crítico en la viabilidad del hongo (Flores y Hassan, 2003). La mayoría de las especies del género pueden crecer en un amplio rango de pH de 2.0-6.0, con un óptimo de 4; aunque algunos autores sugieren un rango de 4.6 a 6.8 para el crecimiento de la biomasa. Para producción de enzimas los óptimos son pH=5.0 para β -glucosidasa y celobiohidrolasa; pH=3.0 para β -xilosidasa; y pH=6.0-7.0 para proteasas. El pH se puede ajustar con ácido acético 10 % o con hidróxido de sodio (NaOH) durante la hidratación del sustrato para fermentación sólida o en la preparación del medio líquido para fermentación sumergida.

Aire: La aireación ocasional permite un buen crecimiento y esporulación del hongo ya que concentraciones de dióxido de carbono en el aire superiores al 10-15 %,

producto de la respiración celular, inhiben el crecimiento (Landecker, 1996). Para fermentación líquida se recomiendan impulsores grandes, que permiten una mejor transferencia de oxígeno (Flores y Hassan, 2003).

2.10 Aplicaciones

Se emplea en procesos en los cuales se desea que los microorganismos ayuden a realizar transformaciones de la materia orgánica (Ward, 1989). Los microorganismos utilizados para este proceso son quimiorganotrofos (bacterias, bacterias filamentosas, hongos levaduriformes y filamentosos). Los hongos filamentosos son mayormente utilizados en fermentaciones debido a su forma de crecimiento, la baja actividad de agua y la alta presión osmótica de sus células. Estos proporcionan grandes ventajas frente a otros microorganismos durante la colonización de sustratos, especialmente sustratos sólidos (Ward, 1989). La fermentación se la realiza para lograr el desarrollo máximo del metabolismo de un microorganismo, para ello se adecua el medio en el cual se va a desarrollar el proceso de fermentación (Chávez, 2008).

2.10.1 Fermentación sumergida (líquida)

Para llevar a cabo la correcta operación de un biorreactor de fermentación sumergida aerobio a diferentes escalas, se mencionan las siguientes configuraciones: tanques agitados, columna de burbuja, y air-lift (de Jesús, 2017). Estos tipos de reactores sumergidos son los más estudiados y dentro de la producción industrial tienen una amplia aplicación en la producción de enzimas (Ashok, 2017). La elaboración de enzimas son productos de las reacciones microbianas. La fermentación líquida supera con más del 75%, comparado con el nivel de producción en fermentación sólida (Subramaniyam y Vimala, 2012).

Trichoderma es un hongo anaerobio facultativo, ya que para su crecimiento requiere de una baja concentración de oxígeno dentro del biorreactor donde será propagado. (Ramos, 2008; Ahamed y Vermette 2008) trabajaron con un cultivo mixto de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* en un biorreactor tipo tanque agitado en un medio que contenía celulosa y extracto de levadura fuente principal de alimento. Esta configuración ha dado como resultado un incremento positivo en las actividades enzimáticas y una degradación de celulosa del 89.4%, a comparación del consumo en cultivos de cepas puras por separado (Hernández et al., 2019).

El biorreactor de tipo tanque agitado es uno de los más empleados a nivel de industria para la producción de biomasa y obtención de enzimas (Bach et al., 2017). Sin embargo, esta configuración del biorreactor ha presentado una serie de dificultades como estrés hidrodinámico y ruptura de las estructuras fúngicas. Esta última se da por la acción de la agitación mecánica lo cual genera pérdida del rendimiento. Una de las alternativas para evitar la pérdida del rendimiento es la implementación del biorreactor air-lift, que consta de un sistema de agitación por acción de un flujo en el interior del biorreactor. Esto genera dos zonas (ascendente y descendente), que permite el mezclado y el proceso de transferencia de masa (Ahamed y Vermette, 2010; Callow, 2016) (Figura 9).

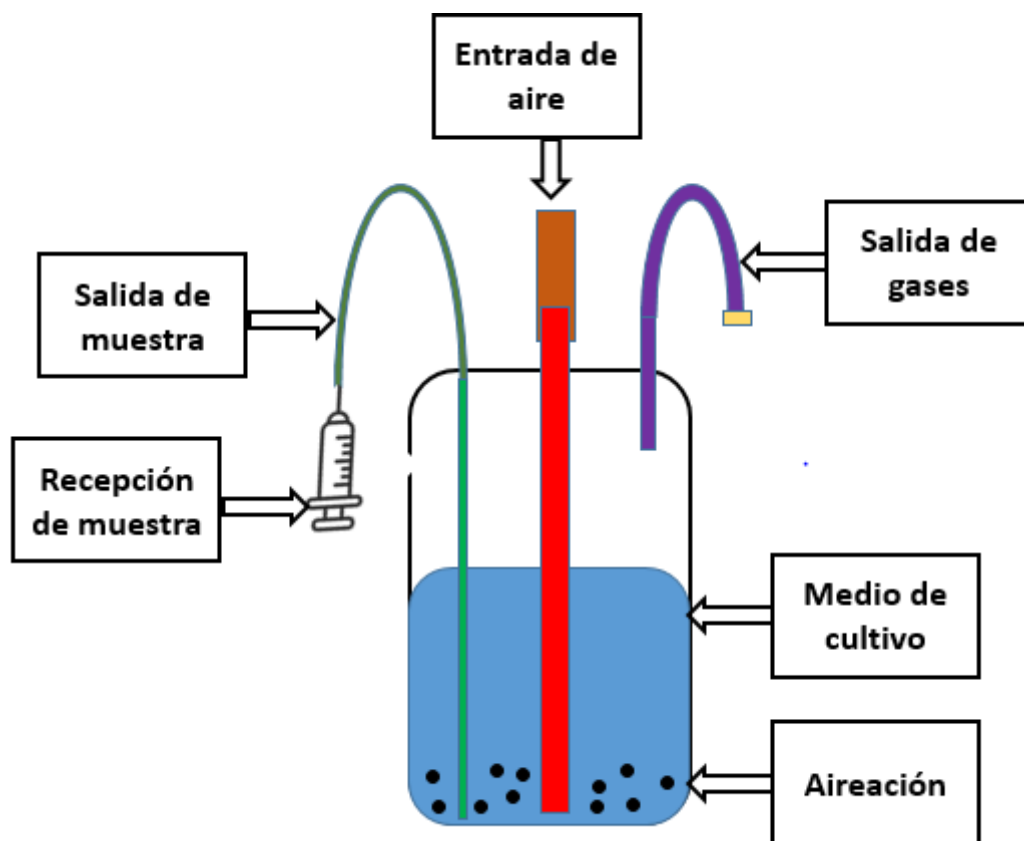


Figura 9. Diseño de biorreactor air-lift

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1. Descripción del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en tres etapas experimentales: i) muestreo, ii) fase de laboratorio y iii) fase en campo:

La fase de muestreo se la realizó en la comunidad de Monteverde perteneciente a la parroquia urbana San José a 11 km de ciudad de San Gabriel. El cultivo de papa del cual se recolectaron las muestras corresponde a un cultivo privado. (188998,653 m E - 61541,568 m N) (Figura 10).

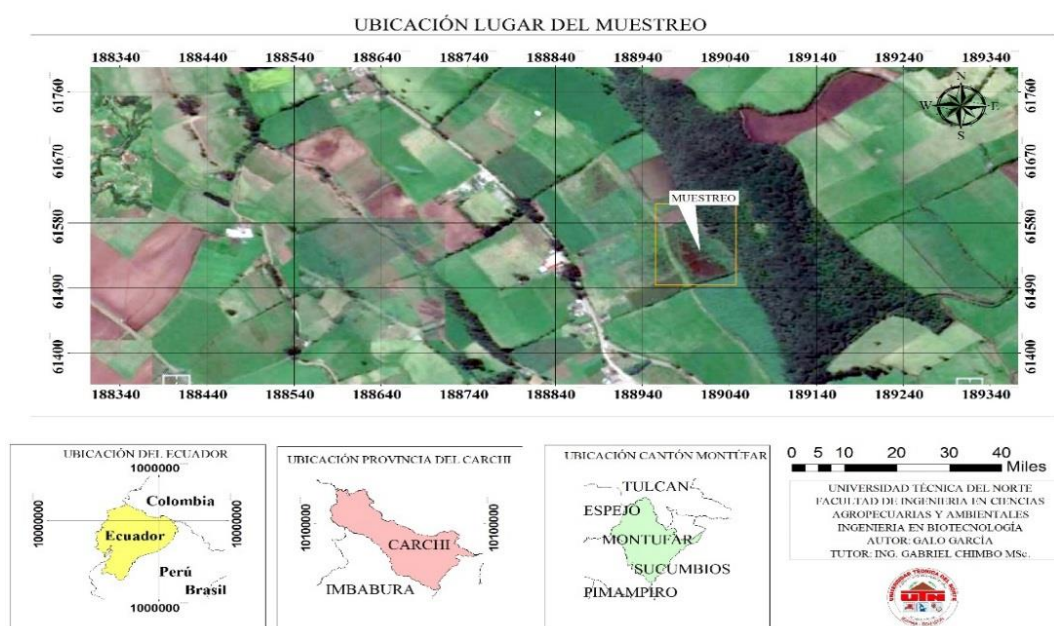


Figura 10. Lugar de muestreo del tejido vegetal con sintomatología de Tizón tardío.

La segunda fase se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología Aplicada y Biotecnología Vegetal en el campus San Vicente de Paúl de la Universidad Técnica del Norte (UTN) (821244,96 m E 38373,31 m N) (Figura 11).

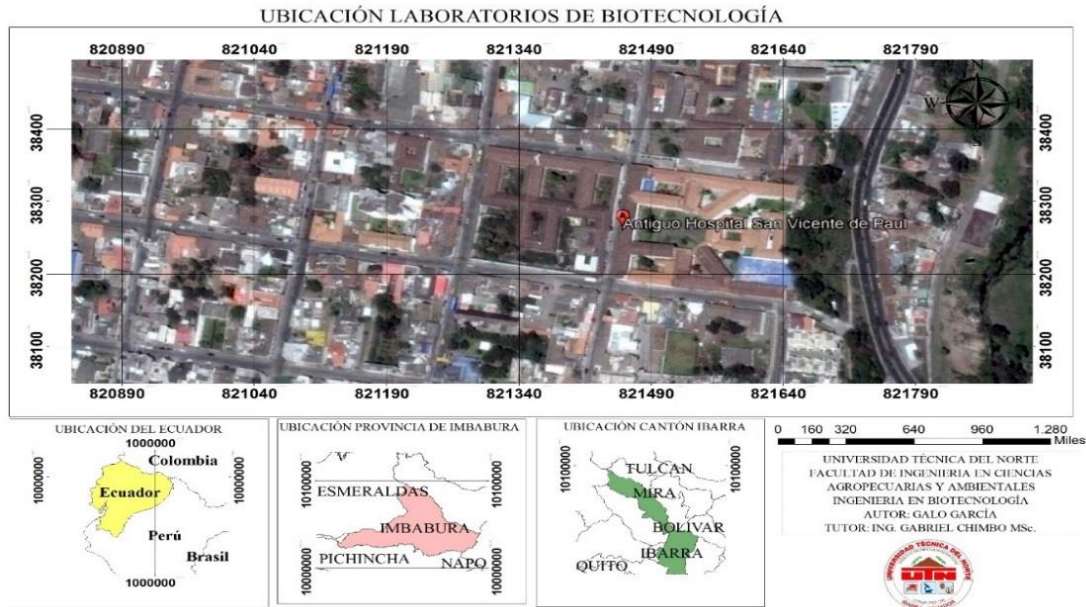


Figura 11. Campus Antiguo Hospital San Vicente de Paúl

La fase de campo se llevó a cabo en la provincia de Imbabura, cantón San Miguel de Ibarra, parroquia San Francisco, en una propiedad privada donde se construyó un invernadero para el cultivo de papa (819380,58 m E 36289,07 m N) (Figura 12).



Figura 12. Ubicación del invernadero

3.2. Aislamiento: *Phytophthora infestans*

Recolección de muestras: se recolectaron hojas de papa (*Solanum tuberosum* var. Superchola) con sintomatología de tizón tardío. Las hojas fueron separadas con un bisturí estéril y transportado en fundas de papel a una temperatura de 4 ° C para disminuir daños mecánicos y deshidratación (INTA, 2017).

Identificación morfológica del hongo *P. infestans*: Se realizó mediante la técnica de tinción por impronta con azul de lactofenol (Arrieta, 2005). Las muestras se observaron en un microscopio de marca SEMCA con aumentos de 40 y 60x

Siembra en placas Petri: Las hojas recolectadas se sumergieron en una solución de etanol al 70% v/v durante 60 segundos y se enjuagaron con agua destilada estéril (Mirna et al., 2013). Posteriormente se cortaron segmentos de 1cm² y se colocaron en placas Petri con agar centeno (17g/L de harina de centeno, 15g/L de sacarosa, 15g/L de agar-agar). Las placas se incubaron durante 14 días a 20 °C (Fernández et al., 2005). Se realizaron 3 resiembras en medio de agar centeno manteniendo las mismas condiciones de temperatura y oscuridad absoluta hasta obtener un cultivo puro (Fernández et al., 2005).

3.3 Obtención de *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*.

T. viride, fue aislado e identificado en una investigación previa, en la reserva “Sabia Esperanza”, ubicada en la parroquia San Francisco de Sigsipamba, provincia de Imbabura. Para hacer uso de este microorganismo se contó con la autorización de investigación científica No. 023-2019-IC-FAU-FLO-DPAI/MAE emitida por el Ministerio del Ambiente (Carlosama., 2020).

T. harzianum, fue aislado a partir de un producto comercial el cual en su composición contiene esporas de *Trichoderma harzianum* mismo que fue aislado y sembrado en placas Petri con medio de cultivo PDA y incubado durante 7 días a una temperatura de 25⁰C hasta obtener la cepa viable y totalmente pura (Smith et al., 1999).

3.3. Elaboración de cámara húmeda, selección de plantas

En la ciudad de San Gabriel en una propiedad privada se identificó el cultivo de papa var. Súperchola de aproximadamente un mes y medio de edad. Del cultivo se seleccionaron plantas sanas, las cuales no presentaron síntomas visuales de ningún tipo

de patología. Las plantas seleccionadas fueron cuidadosamente extraídas y trasplantadas en macetas para evitar que sufran algún tipo de daño mecánico. Estas fueron transportadas y colocadas en un lugar donde permanecieron bajo sombra y riego cada 72 horas por 15 días hasta que recuperen su vigorosidad (Acuña y Tejeda, 2015).

3.3.2. Inoculación y evaluación de la patología

Se elaboró una cámara húmeda de 100 x 55 x 50 cm, con cubierta plástica, donde se colocaron las plantas de papa sanas. A continuación, se preparó 20 ml de medio de cultivo Tryptic Soy Broth (TSB) en dos tubos de ensayo (10 ml en cada uno), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, en los cuales se sembró 1 cm² del hongo. Se agitó en el vortex durante 30 segundos a 1000 rpm para provocar el desprendimiento de esporas para ser incubadas por 48 horas a 20 °C. Pasado ese tiempo el inóculo fue colocado con un pincel en el haz y envés de las hojas de una rama de la planta, esta fue aislada con una funda plástica durante 24 horas. De esta forma, se logró recrear las condiciones favorables de humedad relativa >80% y temperatura de 20 °C para la rápida acción y desarrollo del hongo fitopatógeno (Yago et al., 2011).

Posteriormente, se liberó la rama infectada para que la propagación avance a toda la planta, a partir de esto se mantuvo en observación cada 24 horas para tomar registro del desarrollo de la sintomatología de tizón tardío: coloración de las hojas, apariencia de los tallos y aparición de micelio blanquecino en el envés de las hojas. Al observar crecimiento de micelio en las hojas, se realizó siembras en placa Petri con medio de cultivo agar centeno con la finalidad de verificar que el hongo que está infectando la planta corresponde al hongo inoculado (Koch, 1890).

3.4. Fermentación líquida

3.4.1 Condiciones de crecimiento

Se realizó una cámara de triplex de dimensiones 80 x 50 x 50 cm, con una división en la parte interior los cuales evitaron la contaminación cruzada. La cámara contó con un termómetro digital, que ayudo al monitoreo de temperatura ambiente de 20 °C y humedad relativa del 100% dentro de la cámara.

Se elaboraron 4 biorreactores para cada especie de *Trichoderma*. Los cuales fueron adaptados para los volúmenes de 100, 500 y 1000 ml para lo cual se empleó frascos de vidrio. Los reactores de 100ml contenían 90 ml de medio de cultivo a base de papa a continuación fueron inoculados con 10 ml de inóculo. El medio de cultivo fue elaborado

con 200g de papa cocinadas en 1000ml de agua destilada, luego fue filtrada y enriquecida con 15g de sacarosa. Los biorreactores de 100 ml fueron inoculados con el 10% de solución con esporas de cada especie de *Trichoderma* del volumen total, con solución de micelio en medio TSB. Se incubaron durante 12 días a temperatura ambiente de 20 °C y humedad relativa del 100% (Espinal et al., 2010). La agitación se la realizó mediante aireación con bombas de pecera (Air pump S-4000) con flujo de aire de 0.012 MPa, (4*3.2L/min). Se realizaron mediciones diarias de pH, temperatura y humedad relativa además de características visuales como: color, volumen, precipitaciones y microscopia para determinar el crecimiento de *Trichoderma*. Al término de los 12 días de operación de los biorreactores en cada escalado se pesó la biomasa (g), para ello se eliminó el medio de cultivo por filtración y el micelio fue secado en estufa a 60°C durante 72 horas, así se estimó el incremento de la biomasa en función del tiempo de operación de cada uno de los reactores.

3.4.2 Obtención de extractos de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*

Del cultivo en los biorreactores se separó el extracto cuidadosamente para no arrastrar esporas de *Trichoderma*. El líquido obtenido se centrifugó en tubos falcón estéril a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante recuperado se depositó en un frasco estéril y filtró con filtros Millipore de 0.22 µm conservando el extracto para los ensayos de dilución en placa (Espinal, et al 2010).

3.4.3 Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*

Los extractos de *Trichoderma* se disolvieron a concentraciones de 10, 5 y 2.5 % v/v, a partir de ellas, se tomaron 100 µl de solución para la experimentación. En las placas Petri con medio de cultivo Agar centeno se realizó un posillo de 6mm de diámetro donde se depositó los extractos. Posteriormente, al lado opuesto de donde se colocó el extracto fue inoculado el micelio de *P. infestans* tomado de un cultivo con 14 días de incubación. Las placas Petri se incubaron a 20°C y se realizaron observaciones cada 24 horas durante 10 días para medir el crecimiento micelar del patógeno. El crecimiento se midió en mm hasta el décimo día (Hwa Supchin et al., 2001).

3.5. Bioensayos efectividad fungicida de los extractos

3.5.1 Siembra de plantas de papa

Se construyó un invernadero de 2.40 x 5.00 x 1.20 m donde se cultivaron las plantas de papa (*Solanum tuberosum*) var. Superchola. Estas fueron sembradas en macetas elaboradas a partir de botellones de tesalia en donde se colocó 2.5kg del sustrato compuesto por 60% de tierra agrícola, 25% tierra negra y 15% de pomina. Posteriormente el sustrato fue sometido a un proceso de solarización, el cual consistió en colocar el sustrato humedecido durante 10 días en plástico negro expuesto directamente a la radiación solar que incrementa la temperatura generando vapor el cual desinfecta el sustrato preparado.

Posteriormente, se depositaron dos semillas de papa en cada una de las macetas antes preparadas, estas fueron colocadas en cada uno de los espacios asignados dentro del invernadero. El monitoreo se realizó cada 5 días para observar el crecimiento hasta que se encuentre a una altura de 30 cm y llevar a cabo la experimentación.

3.5.2 Análisis de la efectividad fungicida

Para el análisis de la efectividad fungicida, de los extractos producidos por *T. viride* y *T. harzianum*, se preparó soluciones al 10, 5 y 2.5 % v/v. Para ello se dejó desarrollar las plantas hasta los 60 días de edad con un crecimiento aproximado de 30cm. Al tener estas características se procedió a empapar a la planta en su totalidad con el inóculo de *P. infestans* en horas de la tarde para evitar la evaporación de la solución que contiene el inóculo. Al cabo de 24 horas se realizó la aplicación de los extractos obtenidos empapando la planta con ayuda de un atomizador para determinar si existe acción preventiva ante la infección de tizón tardío. Los monitoreos se realizaron cada 24 horas, para lo cual se contabilizaron el total de hojas de cada planta, se evaluó la severidad contabilizando las hojas que presentaron la sintomatología de tizón tardío. Además se realizó una segmentación de la planta en tres partes (tercio 1 = zona alta, tercio 2 = zona media, tercio 3 = zona baja) para conocer la zona en la que la enfermedad se desarrolla con mayor severidad. La distribución de los tratamientos dentro del invernadero se lo realizó al azar dando cumplimiento a los principios de aleatoriedad tal como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de los tratamientos

R1	R2	R3	R4	Término	Tratamiento
T1	T8	T3	T5	T1	(10% <i>T. harzianum</i>)
T2	T7	T4	T6	T2	(5% <i>T. harzianum</i>)
T3	T1	T1	T4	T3	(2.5% <i>T. harzianum</i>)
T4	T4	T7	T8	T4	(10% <i>T. viride</i>)
T5	T2	T2	T3	T5	(5 % <i>T. viride</i>)
T6	T5	T8	T7	T6	(2.5 % <i>T. viride</i>)
T8	T3	T6	T2	T7	Control
T7	T6	T5	T1	T8	Metalaxil

Nota: R= corresponde a las repeticiones para cada uno de los tratamientos.

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Pruebas de actividad inhibitoria.

Se empleó un diseño por bloques completamente al azar para 8 tratamientos *T. harzianum* a concentraciones de 10, 5 y 2.5 % y *T. viride* a iguales concentraciones, además de un control químico y un testigo absoluto con 5 repeticiones. Los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos durante los 5 días de recolección de datos fueron analizados mediante el cálculo de la varianza (ANOVA) que permitirá detectar diferencias entre tratamientos. Para las comparaciones múltiples de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos se procesaron con el programa estadístico InfoStat versión 20201, Actualización 30/04/2020.

Variables de respuesta

Para el crecimiento micelar, se midió el diámetro del crecimiento de *P. infestans*, sobre el medio de cultivo, las mediciones se tomaron cada 24 horas, durante 10 días, para ello se empleó un escalímetro digital, las medidas se registraron en milímetros (mm).

3.6.2 Bioensayos para determinar la efectividad de los extractos.

Se empleó un diseño por bloques completamente al azar con 8 tratamientos y 4 repeticiones. Los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos durante los 10 días

de experimentación fueron analizados mediante el cálculo de la de varianza (ANOVA) que permitirá detectar diferencias entre tratamientos, para las comparaciones múltiples de medias se utilizará la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), los datos se procesaron con el programa estadístico InfoStat versión 20201, Actualización 30/04/2020.

Variables de respuesta

Para evaluar la severidad de la infección producida por *P. infestans* vs los extractos obtenidos de las dos especies de *Trichoderma*, se observó si los extractos producen inhibición del crecimiento y/o repulsión a la expresión del fitopatógeno, El levantamiento de datos se realizó cada 24 horas, durante 10 días y se contabilizó el número de hojas que presentaron la sintomatología de tizón tardío.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y purificación de *Phytophthora infestans*.

Las colonias aisladas presentaron micelio blanco de consistencia esponjosa abundante y con una tonalidad ligeramente beige por la presencia de esporangios. Estas características coinciden con las características descritas para el hongo fitopatógeno *P. infestans* (López y Tomás, 1999). La figura 13, muestra la sintomatología del tizón tardío en papa y la Figura 14 muestra la colonia aislada a partir de las hojas que presentaron la enfermedad.



Figura 132. Aislamiento del hongo *P. infestans* en hojas de planta de papa (*Solanum tuberosum*) con sintomatología de Tizón tardío.

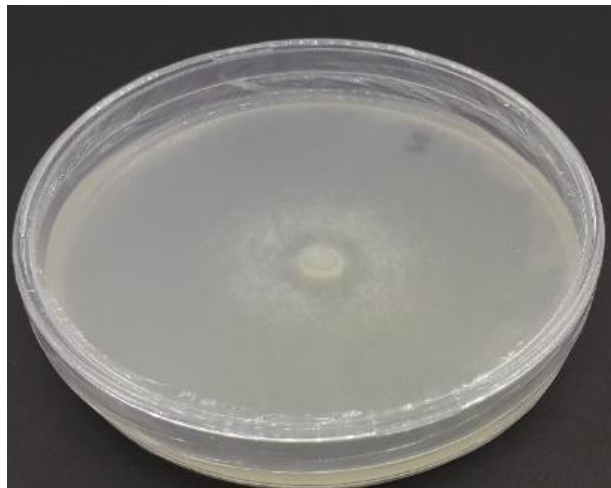


Figura 14. Colonia pura de *P. infestans*, concluido el proceso de resiembras en medio de cultivo agar centeno.

Por otro lado, la figura 15 muestra la morfología observada al microscopio de las cepas aisladas comparadas con la morfología de *P. infestans* encontrada en la literatura. En ambas fotografías se evidencia la presencia de esporangios (en su mayoría elipsoides u ovoides) de 60.5 μm de longitud y 31.7 μm de ancho.

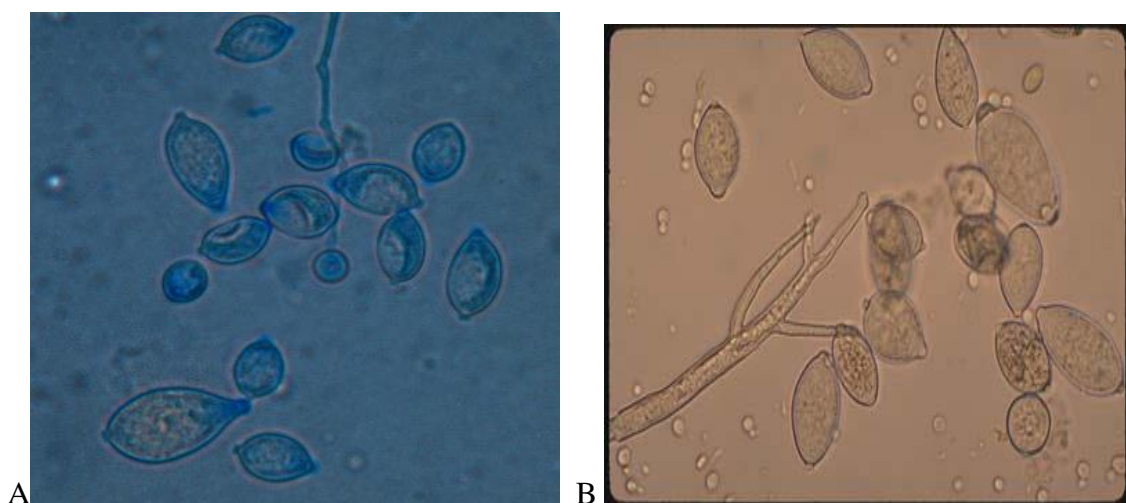


Figura 15. Características morfológicas del aislado de *P. infestans*, los esporangios de los aislamientos fueron en su mayoría ovoides y semipapilados (A) Colonia aislada (B) Morfología referencial. Fuente: Agrios, GN (1988).

Los resultados de la caracterización morfológica sugieren que la metodología utilizada fue apropiada para el aislamiento del patógeno.

Además, con la realización de una cámara húmeda se verificó que el agente fitopatógeno aislado corresponde a *P. infestans* ya que al ser inoculado en plantas sanas y en condiciones controladas de humedad y temperatura se logró evidenciar que las plantas de papa desarrollaron la sintomatología correspondiente a la enfermedad de tizón tardío.

4.2 Crecimiento de *T. harzianum* y *T. viride* en biorreactores

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los hongos *T. harzianum* y *T. viride*. A los 36 días se obtuvo un promedio de 36.79 g, de biomasa en peso seco para *T. harzianum* y 35.26 g, para *T. viride*. Como se lo detalla en la Figura 16. Estos resultados sugieren que el caldo de papa aporta un 37,21% de carbohidratos, Además, de ser enriquecido con sacarosa que contiene 42.10% de carbono que contribuyen a la adecuada relación de C:N lo cual se posiciona como una alternativa viable para la producción de *Trichoderma* ya que se satisface los requerimientos nutricionales como es la relación C:N entre más cercana a 10:1 independientemente de la

cantidad de los sustratos y la condición del medio de cultivo, para inducir la germinación y la producción de conidios para que *Trichoderma* pueda desarrollarse y cumplir su finalidad ya sea para ser empleados como biocontroladores (Gao et al., 2007), por la producción de metabolitos secundarios los cuales contiene compuestos que cumplen el rol de controlar el crecimiento de los fitopatógenos causantes de enfermedades en los cultivos de papa (Aguilar et al., 2014), o la producción de biomasa.

La fermentación sumergida por sus condiciones de operación facilita la obtención del extracto producido por *Trichoderma*, debido a que al momento de realizar los procesos de separación es mucho más sencillo filtrar la biomasa y obtener un extracto con una baja cantidad de esporas las cuales mediante centrifugación se las separa del extracto. Además, permite que la biomasa obtenida sea empleada en como fertilizante o como inóculo en procesos de degradación de materia orgánica. Debido a que *Trichoderma* toma nutrientes de los hongos que parasita y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición y favoreciendo a su proliferación (Ramos et al., 2008). A diferencia de emplear medios sólidos, que para la obtención de productos son necesarios procesos específicos y equipos sofisticados. Estos deben tener la capacidad para realizar técnicas de ruptura celular que permita la liberación de compuestos intracelulares.

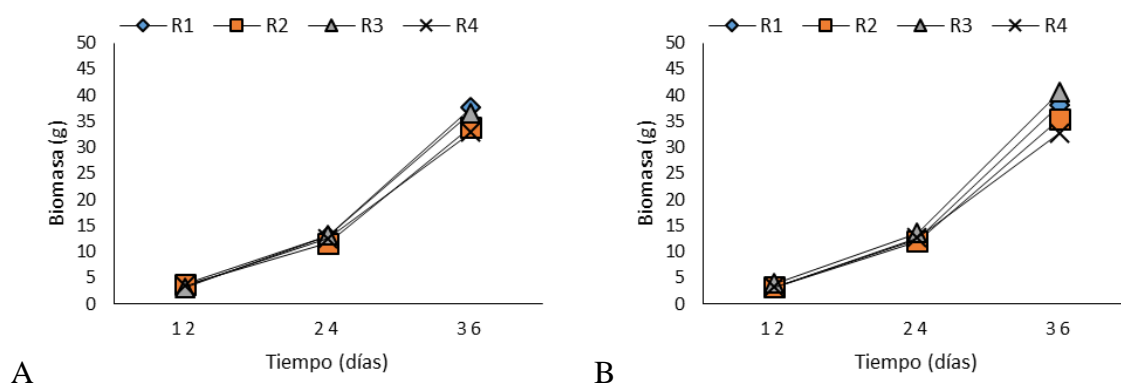


Figura 16. Incremento de biomasa cada 12 días durante los 36 días de operación (A) *T. harzianum*: R1=reactor 1, R2=reactor 2, R3=reactor 3, R4=reactor 4, B) *T. viride*: R1=reactor 1, R2=reactor 2, R3=reactor 3, R4=reactor 4.

4.3 Análisis de la actividad inhibitoria de los extractos producidos por *T. harzianum* y *T. viride*

Los extractos evaluados de *T. harzianum* y *T. viride* al igual que las concentraciones tomadas ejercieron control inhibitorio sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *P. infestan*. Los tratamientos que presentaron la mayor inhibición en el

fueron T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*). Por otra parte, el tratamiento químico TQ, mantuvo un comportamiento similar al de los tratamientos aplicados hasta el día 10, donde los extractos y el testigo positivo no presentaron diferencias significativas tal como se muestra en la figura 17.

En el día 10, se encontraron diferencias significativas para la interacción hongo* concentración (F=71.00; gl=2, 28; p=<0.001), concentración (F=115.57; gl= 2, 28; p=<0.001), hongo (F=101.01; gl= 1, 28; p=0.78), tratamiento (F=394.13; gl= 7, 28; p=<0.001) y para las comparaciones ortogonales adicionales vs factorial (F=1363.74; gl= 1, 28; p=<0.001) y metalaxil vs testigo absoluto (F=920,95; gl= 1, 28; p=<0.001)

La velocidad de crecimiento micelial de *P. infestans*, en medio solido agar centeno fue en promedio de 1.16 mm/día de crecimiento lineal. Los extractos obtenidos de las cepas de *Trichoderma* disminuyeron el crecimiento de *P. infestans* en condiciones *in vitro*. Para T1 (10% *T. harzianum*) la reducción del crecimiento micelial de *P. infestans* fue del 62.95% en el día 10 y para T4 (10% *T. viride*) fue del 66.70%.

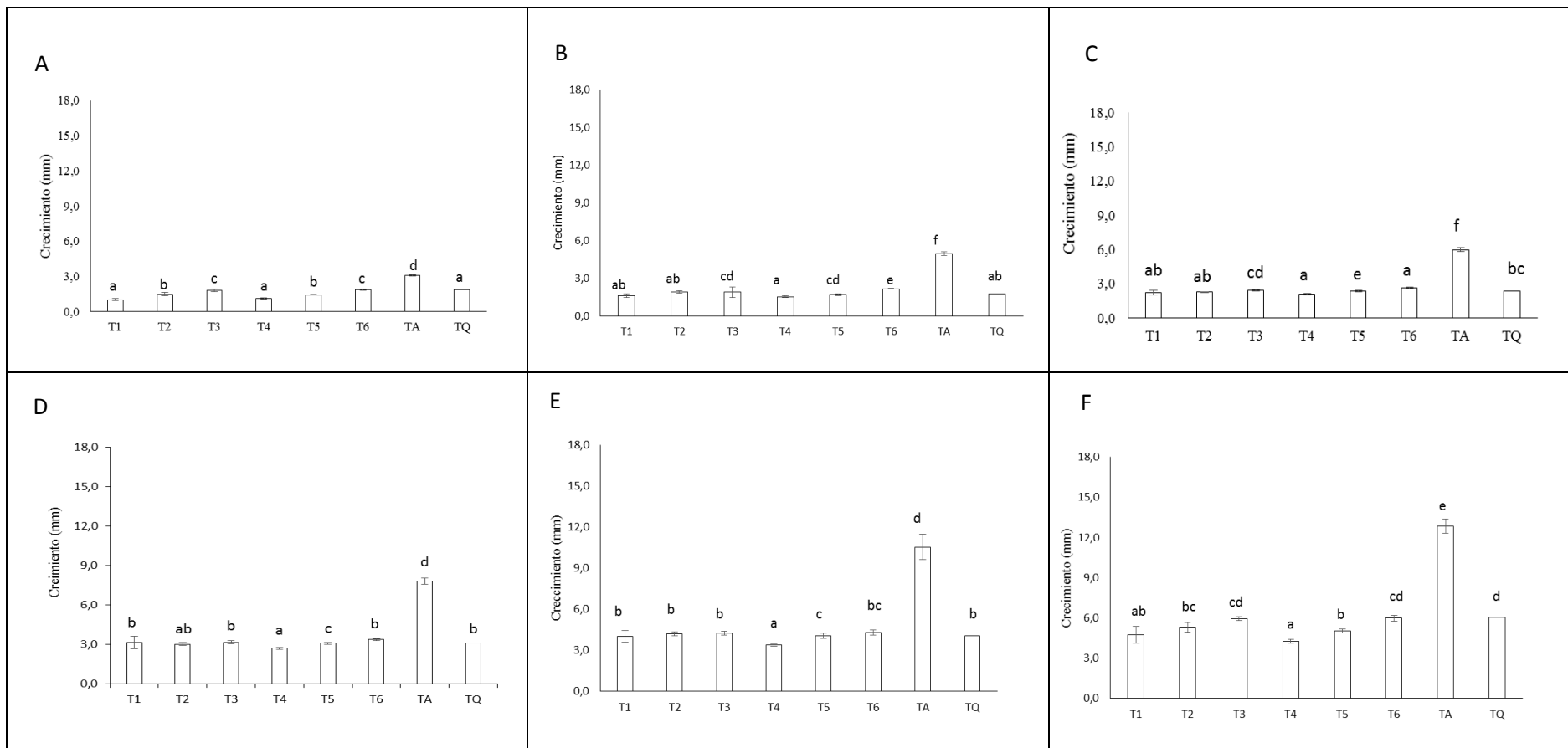


Figura 17. Crecimiento del hongo *P. infestans* con aplicación de cada uno de los tratamientos (A) Día 5, (B) Día 6, (C) Día 7, (D) Día 8, (E). Día 9, (F) Día 10.

4.4 Evaluación de la efectividad de los extractos mediante ensayos *in vivo*.

Como muestra la Figura 18, existe una variación del 3.5% en las medias del porcentaje de severidad para los tratamientos T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10%) en los días de muestreo a partir del día 7 al día 10, por lo cual se muestran diferencias significativas. Sin embargo, desde el día 2 se observa que los tratamientos más efectivos frente al patógeno fueron T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*). Además, se muestra que del día 2 hasta el día 8 los tratamientos T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10%) presentan similar efectividad que el producto de síntesis química con una media del 0.8% en las medias de la severidad ante la infección de Tizón tardío. Estos resultados determinan que los extractos producidos por *T. harzianum* y *T. viride* son una alternativa de control ante la infección de *P. infestans* presentando una estrategia de control amigable con el medio ambiente y las personas encargadas de su aplicación en los cultivos de papa.

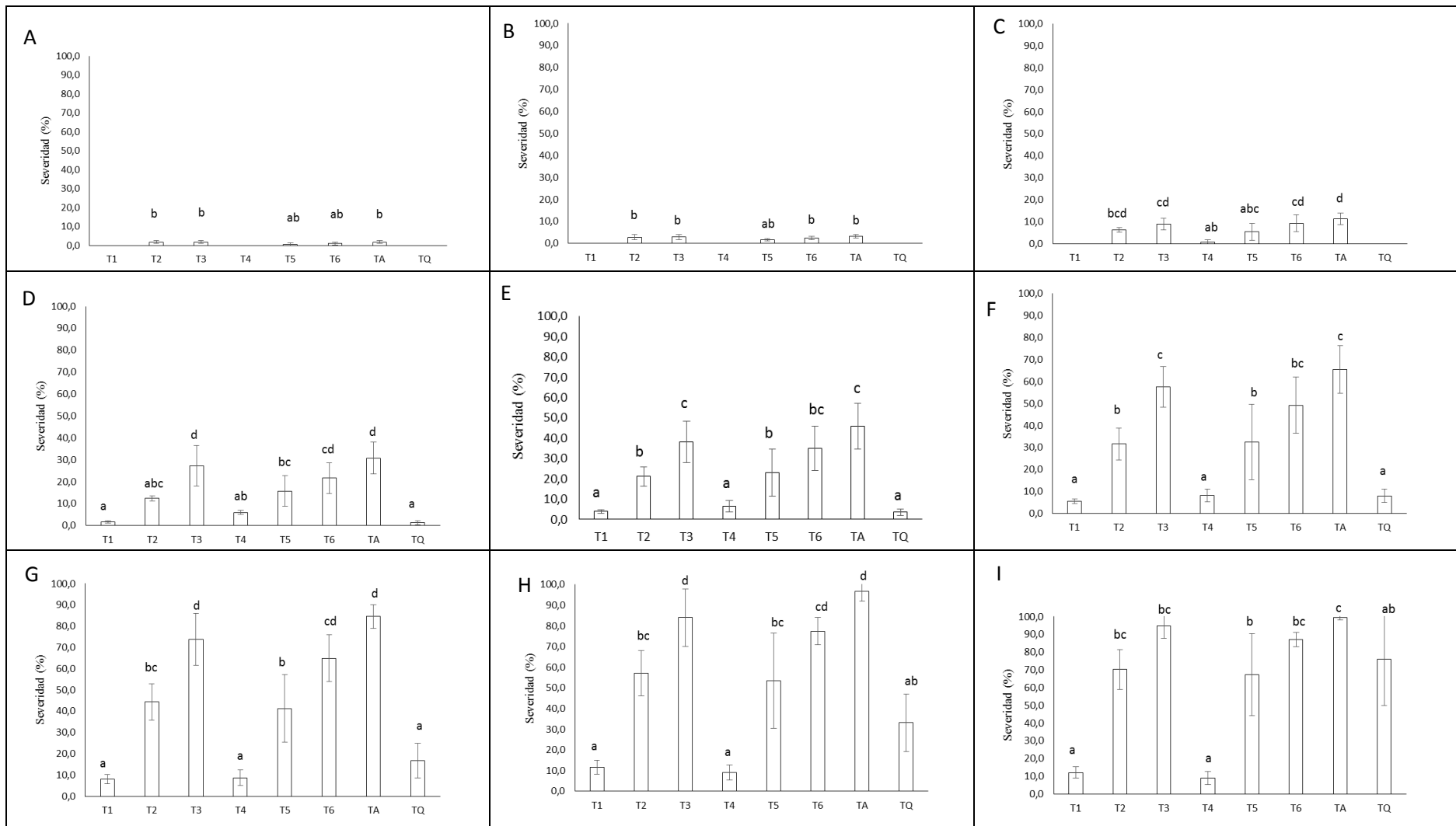


Figura 18. Porcentaje de severidad con la aplicación de los tratamientos en plantas de papa, (A) Día 2, (B) Día 3, (C) Día 4, (D) Día 5, (E) Día 6, (F) Día 7, (G) Día 8, (H) Día 9, (I) Día 10.

En el día 10, se encontraron diferencias significativas para las concentraciones ($F=89.11$; $gl= 2, 21$; $p=< 0,0001$), los tratamientos ($F=31.92$; $gl= 7, 21$; $p=<0.001$) y para las comparaciones ortogonales Adicionales vs Factorial ($F=37.27$; $gl= 1, 21$; $p=<0.001$)

Al analizar de forma general el comportamiento de cada uno de los tratamientos a lo largo del tiempo de experimentación, se determinó que el menor porcentaje de severidad en la infección del tizón tardío fue T4 (10% *T. viride*) alcanzando un valor 9.07% del total de la planta en el día 10 tal como se detalla en la Figura 18. En el estudio realizado por Meyer (1998), se determinó que las especies de *T. harzianum* y *T. viride* son controladores eficientes de hongos fitopatógenos. En el estudio realizado por Aguilar (2014) en el control de *Clerotinia sclerotiorum* en cultivos de tomate híbrido Heinz, se determinó que los extractos de *T. harzianum* y *T. viride* al 50 y 100 % dieron los mejores resultados en el control del crecimiento de *Clerotinia sclerotiorum*. Los estudios determinaron que la aplicación de ambas especies de *Trichoderma* como biocontrolador reducían la acción del agente fitopatógeno e incrementaba el crecimiento de la planta (Charoenrak y Chamswarnng., 2016).

4.5 Análisis de la severidad de la zona aérea de las plantas de papa, evaluada por tercios.

En el día 10 de realizada la inoculación de los tratamientos en las plantas de papa, se pudo apreciar el efecto preventivo de los extractos producidos por las dos especies de *Trichoderma* sobre la aparición de sintomatología correspondiente a tizón tardío. Como muestra la Figura 19, existe una variación del 40% en el tercio 3 (zona baja) entre los tratamientos T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*). Sin embargo no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos aplicados a comparación del tratamiento químico que durante el día 2 hasta el día 8 ejerce control preventivo similar al de los tratamientos con los extractos de *Trichoderma*.

De la misma manera se logra apreciar como la infección en la parte aérea de las plantas de papa ocurre desde la parte inferior, siendo esta sección la parte más afectada por *P. infestans* por su cercanía al suelo donde los esporangios del hongo patógeno permanecen estáticos hasta proporcionar las condiciones adecuadas para la infección (INTAGRI, 2018).













DÍA	10% v/v <i>T. harzianum</i> (T1)	10% v/v <i>T. viride</i> (T4)	TRATAMIENTO QUÍMICO	TESTIGO ABSOLUTO
5				
7				
9				

Figura 19. Control de la infección de *P. infestans* en plantas de papa en los días 5, 7 y 9 de los tratamientos T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*), donde se aprecia el efecto preventivo ante la infección de *P. infestans*.

Como muestra la Figura 20, existe una variación entre cada uno de los tercios donde se tiene que la infección más elevada se da en el tercio 3, el cual corresponde a la zona baja de la planta. La infección es mucho más rápida debido a el hongo fitopatógeno es un hospedero del suelo y su epidemiología se verá reflejada en las zonas aproximadas a este. Sin embargo, del día 2 al día 8 se cumple que los tratamientos más efectivos frente al patógeno fueron T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*), manteniendo sano el tercio 1 y tercio 2 correspondiente a la zona media y alta de la planta respectivamente.

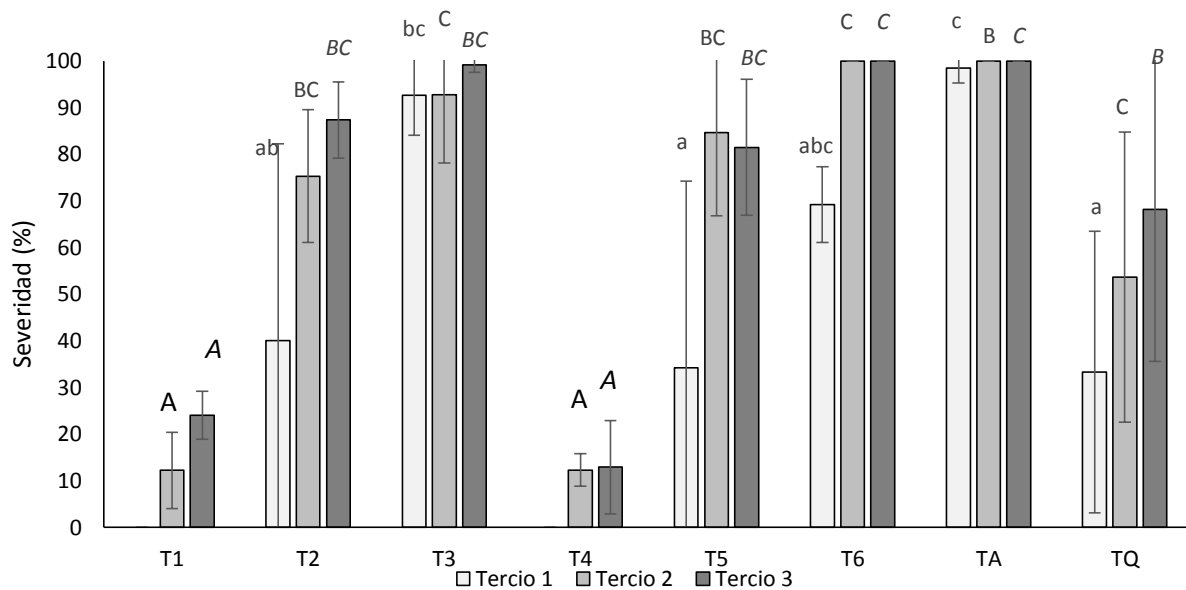


Figura 20. Severidad evaluada en las plantas de papa por cada tercio de la parte aérea en el día 10, (tercio 1 = zona alta (letras minúsculas), tercio 2 = zona media (letras capitales), tercio 3 = zona baja (letras capitales en cursiva)).

Pérez y Forbes (2008), mencionan que en condiciones de humedad del 70 al 90 % los esporangios que se encuentran en hojas y tallos son lavados y arrastrados hacia el suelo, donde pueden producir zoosporas e infectar los tubérculos que se encuentran cerca de la superficie del suelo. Al analizar de manera general el comportamiento de cada uno de los tratamientos, para cada tercio se determinó que TQ (tratamiento químico) evitó la infección durante los 8 primeros días después de su aplicación. Sin embargo, a partir del día 8 la enfermedad empezó a presentar síntomas de tizón tardío. Esto indica que la permanencia del químico se ve reducida con el paso

del tiempo a comparación de los extractos T1 (10% *T. harzianum*) y T4 (10% *T. viride*), los cuales hasta el día 10 de experimentación mantiene bajo porcentaje de severidad en las plantas de papa.

En base a los resultados obtenidos la aplicación de los extractos producidos por *T. harzianum* y *T. viride*, pueden posicionarse como un producto de innovación, debido a que, por su naturaleza estos no contienen compuestos químicos que generan alta residualidad en plantas y tubérculos después de su aplicación, Además, su biomasa permite generar un valor agregado al proceso de producción de los extractos. La biomasa al ser constituida por microorganismos benéficos y ser inoculado como fertilizante al suelo a largo plazo estos microorganismos pueden contribuir a su regeneración y devolver su fertilidad.

Los productos de síntesis química por su composición controla el tizón tardío sin embargo la aplicación excesiva de estos productos deteriora los suelos, al ser específico para tizón tardío la microbiota natural de los suelos se ve afectada lo cual produce pérdida de fertilidad y por ende la disminución de la producción de los cultivos de papa convirtiéndolo en un cultivo no tan rentable económicamente.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se obtuvieron cultivos puros del hongo *P. infestans* a partir de hojas infectadas de papa en medio de cultivo agar centeno y se estandarizaron las condiciones óptimas para su crecimiento: Temperatura 20°C, Incubación 14 días y oscuridad total.
- El medio de cultivo a base de papa enriquecido con sacarosa y forma de operación de los bioreactores permitieron el incremento de biomasa y la producción del extracto con actividad antifúngica para el control de *P. infestans*.
- Los ensayos *in-vitro* determinaron que la aplicación de los extractos de *T. harzianum* y *T. viride* en concentración del 10% v/v *T. harzianum* (T1) y 10% v/v *T. viride* (T4) inhiben el crecimiento micelar de *P. infestans*, por lo que dichos extractos representarían una alternativa agroecológica en el control del tizón tardío.
- Los extractos de *T. harzianum* y *T. viride* diluidos en agua estéril y aplicados directamente en las plantas redujeron la severidad de los síntomas de tizón tardío, obteniendo un comportamiento similar al del producto comercial de síntesis química.

5.2 Recomendaciones

- La identificación de *P. infestans*, debe realizarse mediante técnicas moleculares como: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) (Van der Lee et al., 1997), Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) (Mahuko et al., 2000), Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) (Jaramillo, 2003), además de la PCR con marcadores específicos para análisis de regiones espaciadoras transcritas o ITS (Silva et al., 2009) y microsatélites (Knopova et al., 2002, Lees et al., 2006), para comprobar la información obtenida por microbiología convencional.
- Realizar la cuantificación de la biomasa mediante la técnica de pesado de materia seca para determinar la cinética de crecimiento y rendimiento de las dos especies de *Trichoderma* para comprender de mejor manera el comportamiento dentro de los biorreactores.
- En base a los resultados obtenidos, se recomienda la aplicación de los extractos producidos por *Trichoderma* en parcelas, abarcando un mayor número de unidades experimentales y condiciones ambientales menos controladas y apegadas las condiciones externas que corroboren los resultados obtenidos en la investigación.
- Realizar ensayos *in-vitro* para determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos, para conocer la cantidad de extracto para obtener un control positivo del Tizón Tardío.
- Realizar ensayos de compatibilidad, mediante cultivos de dualidad entre diferentes especies de *Trichoderma* para determinar estrategias de tratamiento preventivo para el control de diferentes enfermedades fúngicas principalmente aquellas de mayor impacto en los cultivos de papa.
- Realizar cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC) además de pruebas bioquímicas que ayuden a la identificación de los compuestos presentes en los extractos producidos por *Trichoderma* en los bioreactores para determinar los compuestos involucrados en el control de *P. infestans*.

REFERENCIAS

- Alvarado, A., Iturriaga, I., Smyth, J., Ureña, J. & Portuguez, E. (2008). Efecto de la fertilización con fósforo sobre el rendimiento y la absorción de nutrimentos de la papa en un andisol de Juan Viñas, costa rica. *Agronomía Costarricense* 33(1): 45- 61. ISSN:0377-9424
- Acuña, I., Tejada, P., (2015). Enfermedades causadas por hongos. En: Manual Interactivo de la papa INIA. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Chile. <http://manualinia.papachile.cl>
- Agrios, G., (2005), fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p.
- Aguiar, R.A., Cunha, & Junior M.L. (2014). Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. *Biological Control* 74:1-5.
- Ahmad JS, Baker R. (1987). Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* (77)182-189.
- Barnett, H., Hunter. (1972). Illustrated general of imperfect fungi. 4 ed. New York: Mc Millan Publishing Company. (pp. 241).
- Bouffaud. ML., Kyselková. M., & Gouesnard., (2012). Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? *Mol Ecol.* (21)195-206.
- Caten, C. E., Jinks, J. L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I: Cultural variation. *Canadian Journal of Botany* 46, 329- 348
- Centro Internacional de la Papa (CIP), (2013). Guía fotográfica de las principales plagas del cultivo de papa en Ecuador. ISBN: 978-92-9060-423-5. (pp.10-14). DOI: 10.4160/978-92-9060-423-5.
- Campos, E., & Freire, C., (2016). Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(6), 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.006>

- Chanatasig, A., (2015). “Evaluación de dos productos biológicos cma (consorcios microbianos activos) y biomog a tres dosis para la descomposición de la materia orgánica (gallinaza) en la parroquia juan montalvo, cotopaxi” Ingeniería Agronómica. UTC. Latacunga. 124 p.
- Charoenrak, P., and C. Chamswarnng. (2016). Efficacies of wetttable pellet and fresh culture of *Trichoderma asperellum* biocontrol products in growth promoting and reducing dirty panicles of rice. Agriculture and Natural Resources 50:243-249.
- Chet I, Benhamou H. (1998). Mycoparasitism and letic enzymes. In: Harman G, Kubicek C. (Eds.) *Trichoderma & Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis. London, UK. (pp.153-152).
- Cutler HG, Cox RH, Crumley FG., & Cole PD. (1986) 6-Pentyl- α -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. Agricultural and Biological Chemistry, 50, 2943-2945.
- DeBach, P., (1977). Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ed. MundiPrensa, Madrid, (pp. 399).
- De Aguilar, A., Da Cunha, M., y Junior, M., (2014). Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. Biological Control 74:1-5
- Ecoclimático. (2008). El monocultivo y sus consecuencias. Obtenido de <http://www.ecoclimatico.com/archives/el-monocultivo-y-sus-consecuencias>. (pp. 822).
- Ephrem Guchi.,(2015),Disease Management Practice on Potato (*Solanum tuberosum* L.) in Ethiopia.Samara University, School of Natural and Computational Sciences, Department of Applied Biology, Samara, Ethiopia. World Journal of Agricultural Research, Vol. 3, No. 1, (pp. 34-42).
- Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Nacional de Córdoba. (2014). Sistemas de Producción de Cultivos Intensivos. Obtenido de

<http://www.agro.unc.edu.ar/~cultivosintesivos/wp-content/uploads/2013/08/capitulo2.pdf>

- García, C.N., Mamani, G.A. & Chávez, (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1):20-32.
- González M.C., (2009). *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah *Bursera simaruba*. *Mycotaxon*, 110 (1) (pp. 363-372).
- Gonzalez, I; Arias. Y, y Peteira, B. 2009. Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *ralstonia solanacearum* plantas hospedantes. *Rev. Protección Veg.* vol.24, n.2. [Consultado enero 2014]. Disponible en: . ISSN 2224-4697.
- Guchi, E. (2015). Disease management practice on potato (*Solanum tuberosum* L.) in Ethiopia. *World Journal of Agricultural Research*, 3(1): (pp. 34-42).
- Hwa Sup., Ryung Yang, Sung Sik, Jae Seok Shim, & Jo Min Kim., (2001). Detection and antibacterial activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* *Food science and biotechnology*. Korean Soc. Food Sci. Technol..10: 61-467.
- Harman G. (2000). Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 84(4). (pp. 377-393).
- Haram S, Schickler HL, Chet I. (1996). Molecular mechanisms of lictin enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*. (142). (pp. 2321-2331).
- Hjeljord L, Tronsmo A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volume 2. (pp. 131-151).

- Hooker, W. J. (1980). Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la papa, Lima, Perú 111p.<http://cipotato.org/library/pdfdocs/AN62191.pdf>
- INEC. (2015). Indicadores Laborales (Informe Ejecutivo). Ecuador: Dirección de Estudios Laborales y Económicos. Recuperado a partir de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/EMPLEO/2015/Marzo2015/Informe_Ejecutivo_Mar15.pdf
- INTAGRI. (2018). *Phytophthora infestans*, un Patógeno Devastador para las Hortalizas. Serie Fitosanidad, Núm. 111. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 4 p.
- Inostroza F., Juan y Méndez L., Patricio (2011) Manual de Campo para el reconocimiento del tizón tardío de la papa [en línea]. Temuco: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 233. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/7457> (Consultado: 13 enero 2022).
- IPNI. (2012). Nutrient source specific - Diammonium Phosphate. International Plant Nutrition Institute (IPNI). Georgia. USA. Obtenido de: [https://www.ipni.net/publication/nss.nsf/0/66D92CC07C016FA7852579AF00766C BD/\\$FILE/NSS-17%20Diammonium%20Phosphate.pdf](https://www.ipni.net/publication/nss.nsf/0/66D92CC07C016FA7852579AF00766CBD/$FILE/NSS-17%20Diammonium%20Phosphate.pdf)
- IPNI. (2013). Fuentes de Nutrientes Específicos - Cloruro de potas
- Jaklitsch, W.M, Voglmayr, H., (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies Mycol.* 80, (pp.1–87).
- Kandula, D. (2015). *Trichoderma* species for biocontrol of soil-borne plant pathogens of pasture species. *Biocontrol Science and Technology*, 25(9): (pp. 1052-1069). <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1028892>
- Lange, L., (2014). The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. *IMA Fungus* 5(2), 463.DOI: 10.5598 / imafungus.05.02.10
- Lopes, Steindorff, Geraldine, Brandaño, Monteiro, Lobo, Coelho, Ulhoa, Silva. (2012) Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains

isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol.* (116). (pp. 815–824).

López-Abarategui, McBeth, Mandal, Sun, Heffron, Alba-Menéndez, et al. (2015). Cm-p5: an antifungal hydrophilic peptide derived from the coastal mollusk *Cenchritis muricatus* (*Gastropoda: Littorinidae*).

López, Tomás, (1999). Estudios de medios de cultivo sobre el crecimiento lineal y esporulación de *Phytophthora infestans*. *Fitosanidad*.

Macías-Rubalcava, (2010). Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba* *J. Chem. Ecol.*, 36, (pp. 1122-1131).

Marcello, Steindorff, Silva, Silva, Bataus, & Ulhoa. (2010). Expression analysis of the exo-p-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165:75-81.

González Melaine, San Juan Javier. (1966). Antimicrobial peptides: their therapeutic potential. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2), 01–13. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000200008

Mendez, A. f. (2015). *Dspace.uce.edu.ec*. Obtenido de *dspace.uce.edu.ec*: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4541/1/T-UCE-0004-7.pdf>

Ministerio de Agricultura, G. A. (2016). Rendimiento de papa en Ecuador primer ciclo. Obtenido de MAGAP inicia „Registro de Productores de Papa“ en cinco provincias de la Sierra: http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/rendimiento_papa2016.pdf

Módulo de Tecnificación agropecuaria· ESPAC 2017

Monteagudo, C., Mariscal, M., Heras, L., Ibañez, D., Rivas, A., & Olea Serrano, F. (2016). Effects of maternal diet and environmental exposure to

organochlorine pesticides on newborn weight in Southern Spain. *Chemosphere*, 156, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.103>

Monteros, A. (2016). Dirección de Análisis y Procesamiento de la Información, Coordinación General del Sistema de Información Nacional Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Quito. <http://fliphtml5.com/ijia/cmgd/basic>

Moreno Mendoza, J. D., Cesan Lasso, M. d., Valbuena Benavidez, R. I., Mateus, J., Villaneda Vivas, E., & García, J. (s.f). ¿Qué sabes del cultivo de papa? Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria ICA.

Moreno R, R. Gabarra, R. Symondson, W. King, R. Agustí, N. (2014). Do the interactions among natural enemies compromise the biological control of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal Of Pest Science*: 87(1),p. 133-141.

Monteagudo, C., Mariscal-Arcas, M., Heras-Gonzalez, L., Ibañez-Peinado, D., Rivas, A., & Olea-Serrano, F. (2016). Effects of maternal diet and environmental exposure to organochlorine pesticides on newborn weight in Southern Spain. *Chemosphere*, (156), (pp. 135–142). <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.103>

Monómeros Colombo Venezolanos. (1980). Manual de abonamiento para el cultivo de la papa. s.l.: Monomeros Colombo Venezolanos.

Nico I, Monaco I, Del Bello G, Alippi H. (2005). Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II Micoflora asociada y antagonismo in vitro de los aislados más frecuentes. *RIA.*; 34 (Pt II)(1):29-44.

Osorio H., (2014). Biocontrol of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma spp.* in Hibiscus sabdariffa plants under field and greenhouse conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 9(18), (pp. 1398-1345).

Osorio, E. et al. (2011). In-vitro behavior of *Trichoderma spp.* against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research*, 6(19): 4594-4600.

- Oyarzun, P., Taipe, J., & Forbes, G. (2001). *Phytophthora infestans* su actividad y particularidades en el Ecuador. Ecuador: Fernández, https://nanopdf.com/download/phytophthora-infestans-su-actividad-y-particularidades-en-el_pdf#modals
- Pamela Forward. (2017). Efecto de microorganismos del suelo (Bacterias termofilas) en la producción del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) Centro Experimental San Francisco, Cantón Huaca, Provincia del Carchi. 6, (pp. 5–9).
- Pérez, L. B. (2004). Contribución a la Evaluación de la Sustentabilidad; Estudio de Caso dos Agroecosistemas Campesinos de Maíz y Leche del Valle de Toluca. Ciencias Veterinaria, Tesis Ph.D, 198.
- Pérez Consuegra, Nilda. (2004). Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural CEDAR. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba. (pp. 296).
- Pérez, L., Rodríguez, L. & Gómez, M. (2008). Efecto del fraccionamiento de la fertilización con N, P, K y Mg y la aplicación de los micronutrientes B, Mn y Zn en el rendimiento y calidad de papa criolla (*Solanum phureja*) variedad Criolla Colombia. Agronomía Colombiana. vol 26. 477-485. Bogotá-Colombia. ISSN: 0120-9965
- Pingali, P. L., Marquez, C. B., Palis, F. G., & Rola, A. C. (1995). The Impact of Pesticides on Farmer Health: A Medical and Economic Analysis in the Philippines. In P. L. Pingali & P. A. Roger (Eds.), *Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment* (pp. 343–360). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0647-4_12
- Pucheta, M.; Flores, A.; Rodríguez, S.; & De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31 (12): (pp. 856-860).
- Qualhato, TF, Lopes, FAC, Steindorff, AS et al. (2013). *Biotechnol Lett* 35: (pp. 1461). <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>.

- Reyes R. (2007). Efectividad in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* Sacc. aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad*, 11(1): 29-33.
- Romero, T., P.A. López, M. Ramírez, & J.A. Cuervo. (2016). Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Ciencia* 31(3):32-45.
- Sandle, T. (2014). *Trichoderma*. p. 644-646. En C.A. Batt y M.-L. Tortorello (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, London, UK.
- Santos Rojas, J., Orena Alvarado, S. (2006). Manual de producción de papa para la agricultura familiar campesina. Santiago de Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
- SQM. Etapas de crecimiento del cultivo de la papa., (2015). Encontrado en: <http://www.sqm.com/es-es/productos/nutricionvegetaldeespecialidad/cultivos/papa.aspx>
- Sociedad Mexicana de Fitopatología., A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Revista mexicana de fitopatología. In *Revista mexicana de fitopatología* (Vol. 25). Retrieved from
- Torres, L., Montesdeoca, F. & Andrade J. (2011). Cosecha y poscosecha. Centro Internacional de la papa (CIP)- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Quito - Ecuador. Obtenido de: <https://cipotato.org/es/latinoamerica/informacion/inventario-detecnologias/cosecha-y-poscosecha/>
- Sumpsi, J. M. (2012). Los retos de la agricultura para alimentar al mundo en 2050. *Tiempo de Paz*, (106), (pp. 37-48).
- Vargas, H.A, E. Gilchrist. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología* 42:9-16.

- Vélez, P., Posada, F., Marín, P., González, M., Osorio, E., & Bustillo, A. (1997). Técnicas para el control de la calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos de Chinchiná, *Boletín Técnico Cenicafe*, No17; 7-16.
- Verma, J. P., Jaiswal, D. K., Meena, V. S., Kumar, A., & Meena, R. S. (2015). Issues and challenges about sustainable agriculture production for management of natural resources to sustain soil fertility and health. *Journal of Cleaner Production*, 107, 793–794. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.04.130>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Wood, S., & Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications*, 7(11), 1545–1550.
- Vinale F, Arjona Girona I, Nigro M, Mazzei P, Piccolo A, Ruocco M, Woo S, Ruano Rosa D, López Herrera C, & Lorito M. (2012) Cerinolactone, a hydroxy-lactone derivative from *Trichoderma cerinum*. *Journal of Natural Products*, 75, 103–106
- Viñas, J. (2009). Obtenido de Efecto residual del fertilizante fosfatado adicionado al cultivo de la papa. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v33n01-063.pdf
- Werdin, J., Murray, P., & Ferrero, A., (2008). Biological activity of essential oils from «Schinus molle» var. «Areira» (Anacardiaceae) against nymphs II of «Nezara viridula» (Hemiptera: Pentatomidae). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 34(3), (pp. 367-375).
- Woo, S., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M., (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology J.* 8(1), (Suppl-1, M4) 71–126. DOI: 10.2174 / 1874437001408010071
- Yago, I., Roh, H., Bae, S., Kim, J., & Nam, M., (2011). The Effect of Seed-borne Mycoflora from Sorghum and Foxtail Millet Seeds on Germination and Disease Transmission. *Mycobiology*, 39(3), 206-218.
- Y. Elad, J. Chet , & J. Katan, (1980). *Trichoderma harzianum*, un control biológico eficaz contra *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. *J. Phytopathol.* , 70, (pp. 119 – 121).

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), (pp. 74–90).

ANEXOS

Anexo 1. Solicitud para acceder al cultivo de papa a realizar el muestreo de tejido vegetal infectado

SOLICITUD

San Gabriel, 02 de diciembre del 2019

Señor.

José García.....

PROPIETARIO DEL CULTIVO DE PAPA

De mi consideración:

El motivo de la presente es solicitar el permiso correspondiente para realizar la toma de muestras de plantas que presenten síntomas de "lancha" enfermedad causada por el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans*, Con el objetivo de llevar a cabo la ejecución de la tesis titulada "EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE *Trichoderma spp.* EN EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*".

Agradezco de antemano por la atención recibida a la presente.

Atentamente,



Gálor Fernando García Bedón

C.I. 040186452-5

TELF: 0998229463

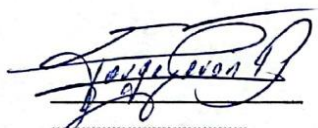
Anexo 2. Autorización para tomar muestras de tejido vegetal que sea necesario

AUTORIZACIÓN

San Gabriel, 02 de diciembre del 2019

Yo Jorge Cárdena, con CI. 0400626585, propietario del cultivo de papa, por este medio, autorizo formalmente a Galo Fernando García Bedón, con CI. 0401864525, a realizar la toma muestras necesarias que permitan el aislamiento e identificación del hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans*, para la realización de la tesis titulada "EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*".

ATENTAMENTE:



CI: 0400626585
TELF: 0988633600

Anexo 3. Solicitud al Ministerio del Ambiente para la realización de investigación científica



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
 UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN Nro. 001-073-CEAACES-2013-13
 Ibarra-Ecuador

Ibarra, 26 de septiembre del 2019

Abogado
ÁLVARO CADENA
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE IMBABURA

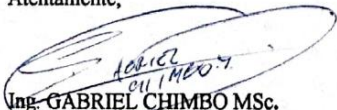
De mi consideración:

El motivo de la presente es solicitar el permiso de investigación científica para el proyecto titulado **“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE *Trichoderma spp.* EN EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*”** Con el objetivo de analizar la capacidad antifúngica del hongo *Trichoderma viride* encontrado en el bosque nublado de la Reserva Sabia Esperanza, mismo que fue obtenido como resultado del proyecto titulado **“ANÁLISIS DE CAPACIDAD LIGNINOLÍTICA DE HONGOS BASIDIOMICETOS PROCEDENTES DE LA RESERVA SABIA ESPERANZA PARA LA DEGRADACIÓN DE BAGAZO DE CAÑA”**.

La investigación será realizada por el equipo de investigadores conformado por las siguientes personas:

NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	FUNCIÓN	INSTITUCIÓN
Ing. GABRIEL CHIMBO MSc.	1721444196	DIRECTOR DE PROYECTO	UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
Ing. MARÍA CRISTINA ECHEVERRÍA Ph.D.	1717917189	INVESTIGADOR	UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
Ing. SANTIAGO ZARATE MSC.	1718974841	INVESTIGADOR	UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
GALO GARCÍA	0401864525	TESISTA	UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Atentamente,


 Ing. GABRIEL CHIMBO MSc.
DOCENTE
DIRECTOR DE PROYECTO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE



Misión Institucional:
 Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar

Anexo 4. Permiso de investigación científica por parte del ministerio del ambiente



Oficio Nro. MAE-CGZI-DPAI-2019-1431-O

Ibarra, 10 de octubre de 2019

Asunto: PERMISO DE INVESTIGACIÓN

Señor
Gabriel Alejandro Chimbo Yépez
En su Despacho

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo de quienes trabajamos en la Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura, a la vez le deseamos éxitos en sus labores diarias.

En respuesta a lo solicitado con fecha 26 de septiembre de 2019, autorización para realizar investigación científica con el proyecto Evaluación de la Influencia de Trichoderma spp. en el Control de Phytophthora infestans. Con el objetivo de analizar la capacidad antifúngica del hongo *Trichoderma viride*, encontrado en el bosque nublado de la Reserva Sabia Esperanza. Esta Dirección le hace llegar el documento para que realice el trabajo con el número No. 023-2019-IC-FAU-FLO-DPAI/MAE.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Dirección Provincial del
Ambiente de Imbabura
DIRECTOR

Abg. Aiyaro Andrés Cadena Cabezas

**COORDINADOR GENERAL ZONAL - ZONA 1 (ESMERALDAS, CARCHI,
IMBABURA Y SUCUMBÍOS) a DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE
IMBABURA**

Referencias:

- MAE-CGZI-DPAI-2019-1942-E

Anexos:

- 1942-10270281001569529426.pdf
- 1942-e0960173001569529425.pdf
- investigación-evaluación_de_influencia_de_trichoderma_spp.doc

Anexo 5. Autorización para realizar investigación científica por parte del ministerio del ambiente

MINISTERIO DEL AMBIENTE



AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

No. 023-2019-IC-FAU-FLO-DPAI/MAE

FLORA X FAUNA

El Ministerio del Ambiente, a través de la Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura en uso de las atribuciones que le confiere el Código Orgánico Ambiental (COA), y las normas y leyes ambientales vigentes, autoriza a:

Investigadores/ Principales

Investigadores	Nacionalidad	Cedula/Pasaporte	Título	Registro SENECYT	Función dentro de la Investigación
Gabriel Alejandro Chimbo Yépez	Ecuatoriana	1721444196	Ing. MSc.		Director del Proyecto
Maria Cristina Echeverría	Ecuatoriana	1717917189	Ing. PhD.		Investigador
Santiago Zarate Baca	Ecuatoriana	1718974841	Ing. MSc.		Investigador
Galo Fernando García Bedón	Ecuatoriana	0401864525	Estudiante		Investigador

Para que lleve a cabo la investigación científica "Evaluación de la Influencia de *Trichoderma spp.* En el control de *Phytophthora infestans*" de acuerdo a las siguientes especificaciones:

- Solicitud de la: Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez MSc. Docente Director de Proyecto Universidad Técnica del Norte.
- Auspicio de Institución Científico Nacional: Universidad Técnica del Norte
- Auspicio de Institución Científica Internacional: No aplica
- Institución que financia la Investigación: No aplica
- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Unidad de Patrimonio Natural y Responsable de Vida Silvestre.
- Inicio y final de investigación: 07 de octubre de 2019 hasta el 07 de julio de 2020.
- Entrega de informe final: 07 de julio de 2020.
- Valoración técnica del proyecto: Ing. Marcelo Pantoja
- Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el correspondiente permiscpetencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
- Las muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de bioprospección ni **ACCESO A RECURSO GENÉTICO**, la competencia de Acceso a Recurso genético es exclusiva del MAE, Unidad de Recursos Genéticos.
- De los resultados que se desprenda de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.

Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación en campo

- Metodología para realizar el estudio: "Evaluación de la Influencia de *Trichoderma spp.* En el control de *Phytophthora infestans*".
 - Para determinar la actividad inhibitoria de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viridae* en el control de *Phytophthora infestans*, se realizarán mediante dos ensayos los cuales consistirán en realizar la actividad inhibitoria de la biomasa y la actividad inhibitoria de los extractos.
 - Se realizarán discos en papel de 0,6mm de diámetro que se obtendrán a partir de propágulos del patógeno (crecimiento libre), y serán sembrados en la superficie de la caja de Petri con medio selectivo PDA., a un centímetro del borde de la caja (Cundom, 2003). Después de 24 horas de incubación a una temperatura de 28 grados centígrados de *Phytophthora infestans*, serán sembrados a 1cm del borde de la caja, en posición opuesta un disco de 0,6mm de diámetro del antagonista correspondiente *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* (Holmes 2004). En lo cual se observará el crecimiento de *Phytophthora infestans* y se medirá el radio en milímetros durante 7 días.
 - Determinar la efectividad de los extractos producidos por las dos especies de *Trichoderma spp.* Se realizará la construcción de dos reactores tipo batch, mismos que constituyen un proceso de escalado que iniciará con un volumen de 50ml, 250ml, 500ml, hasta un volumen de 1000ml los cuales proporcionarán condiciones apropiadas y nutrientes necesarios para el crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*.

Obligaciones del investigador

- Entregar al Ministerio del Ambiente-Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final en la Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura). Y adjuntar los certificados originales del depósito o recibo de las muestras, emitidas por las instituciones científicas ecuatorianas como internacionales depositarias de material biológico.
- Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material biológico.
- Entregar (2) copias de las publicaciones a la Dirección Nacional de Biodiversidad.
- Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (Se respetará los derechos de autoría).
- Lista taxonómica de las especies de flora, debidamente identificadas, objeto de la autorización de colecta con sus respectivas coordenadas. (Solicitar formato en la Dirección del Ambiente de Imbabura).
- Los holotipos y ejemplares únicos sólo pueden llevarse fuera del país en calidad de préstamo por un periodo de hasta 12 meses. (En caso de requerir más tiempo se deberá realizar la solicitud y entregar informes preliminares).
- Depositar Holotipos y ejemplares únicos en una institución ecuatoriana depositaria de material biológico, Centros de Manejo y Tenencia de Vida Silvestre Centros de Manejo que tengan autorización del Ministerio del Ambiente, con patente actualizada: No aplica
- Las muestras de flora a ser depositadas deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la reparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 se responsabilizan: Ing. Gabriel Alejandro Chimbo Yépez MSc. Docente Director de Proyecto Universidad Técnica del Norte.



SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS, CANTONES Y ÁREAS PROTEGIDAS:

Provincia	Cantones	Parroquias o sector
Imbabura	Ibarra	El Sagrario, Universidad Técnica del Norte
Áreas Protegidas		
No aplica		

SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:

21.- Describir los objetivos que se enumeran en el plan de investigación: "Evaluación de la influencia de *Trichoderma spp.* En el control de *Phytophthora infestans*":

- Evaluar la actividad fungicida de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en el control de *Phytophthora infestans*.
- Aislar el agente causal del tizón tardío en cultivo de *Solanum tuberosum*.
- Aislar la actividad inhibidora de los extractos producidos por los hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en el control de *Phytophthora infestans*.
- Evaluar la efectividad fungicida de los extractos mediante bioensayos.

SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

Materiales/equipos	Materiales/Equipos	Materiales/Equipos	Materiales/Equipos
Cajas Petri	Cámara de flujo laminar		
Medio de cultivo	Autoclave		
Fermentadores	Estufa		
Etiquetas	Incubadora		
Equipos de laboratorio			

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

- 22.- LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO, DESDE EL NÚMERO 001-023-19- IC-FAU-FLO-DPA/MAE HASTA Nº-000-023-19-IC-FAU-FLO-DPDI/MAE-NO APLICA
- 23.- ESTA AUTORIZACIÓN FACULTA LA COLECCIÓN/ MANIPULACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA, MISMO QUE NO PODRÁN SER UTILIZADOS COMO MATERIAL PARENTAL PARA MANEJO COMERCIAL-NO APLICA
- 24.- ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS EXPRESADOS EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, EN TAL SENTIDO HABILITA EL MANEJO DE FLORA QUE HAYAN ESTADO EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NUMERO DE INDIVIDUOS.
- 25.- LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECÍMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
- 26.- PARA EL INGRESO A ÁREAS DE PROPIEDAD PARTICULAR LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN RESPECTIVA DEL PROPIETARIO O GAD-PROVINCIAL, MUNICIPAL O PARROQUIAL.
- 27.- PARA EL INGRESO A ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPONSABLE DE ÁREA Y ACOMPAÑAMIENTO DE UN GUARDAPARQUE.
- 28.- NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACIÓN.
- 29.- SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO EN ESTADO ETÍLICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
- 30.- ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAÍDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
- 31.- SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
- 32.- TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO AL CÓDIGO ORGANICO AMBIENTAL (COA), Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DEMÁS NORMATIVAS PERTINENTES.
- 33.- EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME AL CÓDIGO ORGANICO AMBIENTAL (COA), Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
- 34.- TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA 0010000785, CÓDIGO SUBLÍNEA 190499, DE BAN ECUADOR, DEPÓSITO No. 672016613, DE FECHA 26-09-2019.


 Dirección Provincial del Ambiente de Imbabura
 DIRECTOR

**Abogado Álvaro Cadena Cabezas
 COORDINADOR ZONAL ZONA 1 /DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE IMBABURA**

SP.

CC: Coordinadores de Patrimonio Natural

Responsables de Vida Silvestre: Ing. Marcelo Pantoja

Fecha: 07-10-2019

Anexo 6. Cultivo y toma de muestra de tejido vegetal infectado, en plantas papa (*Solanum tuberosum*).



Anexo 7. Microscopía de muestras recolectadas (hojas) observación de estructuras fúngicas.



Anexo 8. A) Recolección de plantas sanas, B) Elaboración de cámara húmeda.



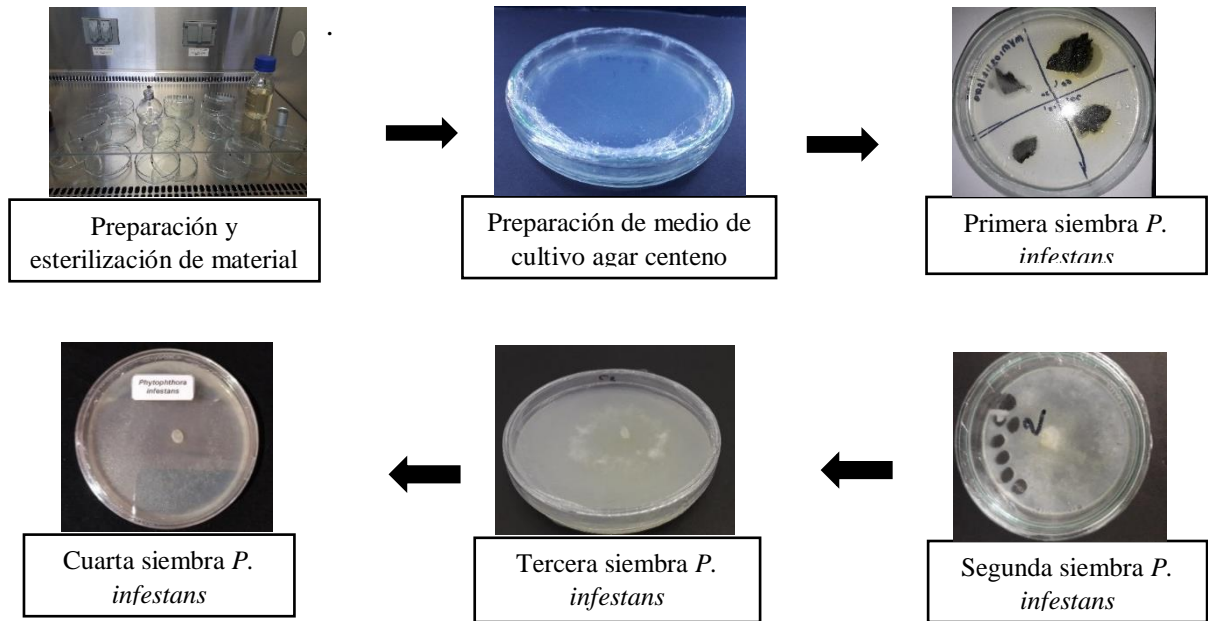
Anexo 9. Preparación y esterilización de sustratos



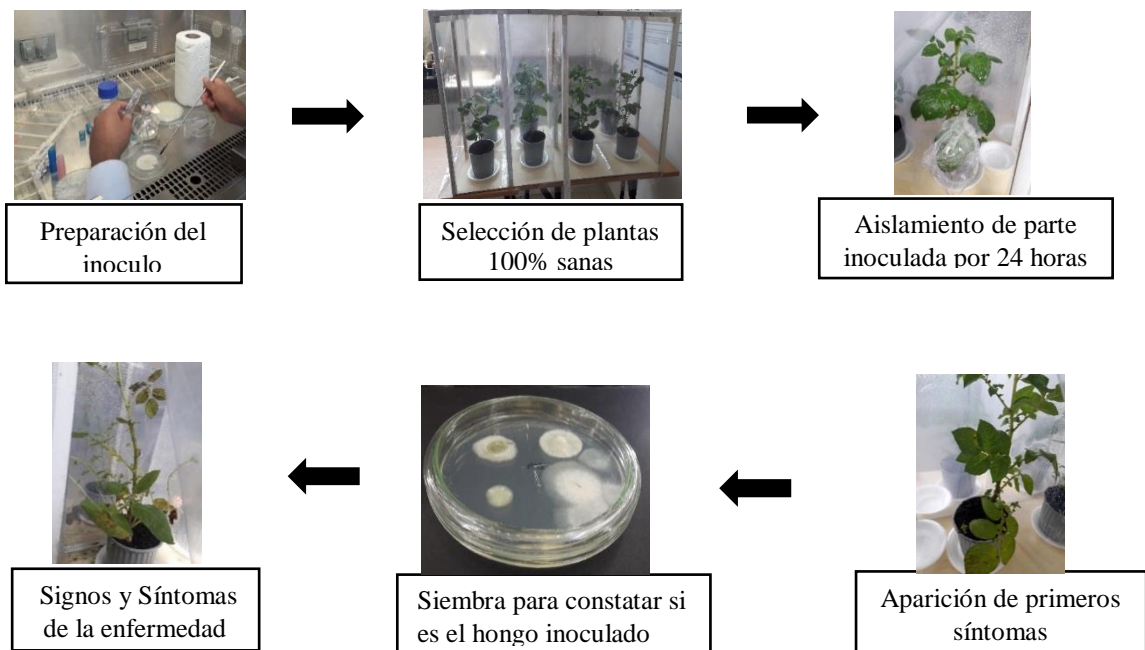
Anexo 10 . Desinfección y siembra de semillas de papa var. Superchola



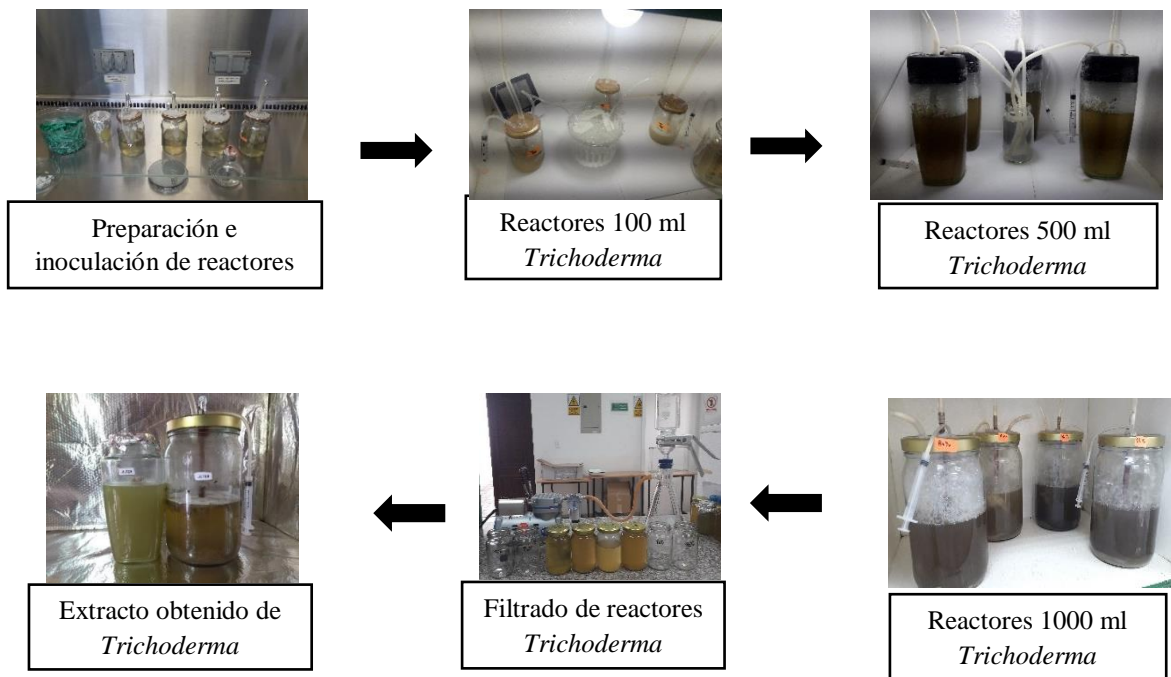
Anexo 11. Metodología general para el aislamiento de *Phytophthora infestans*



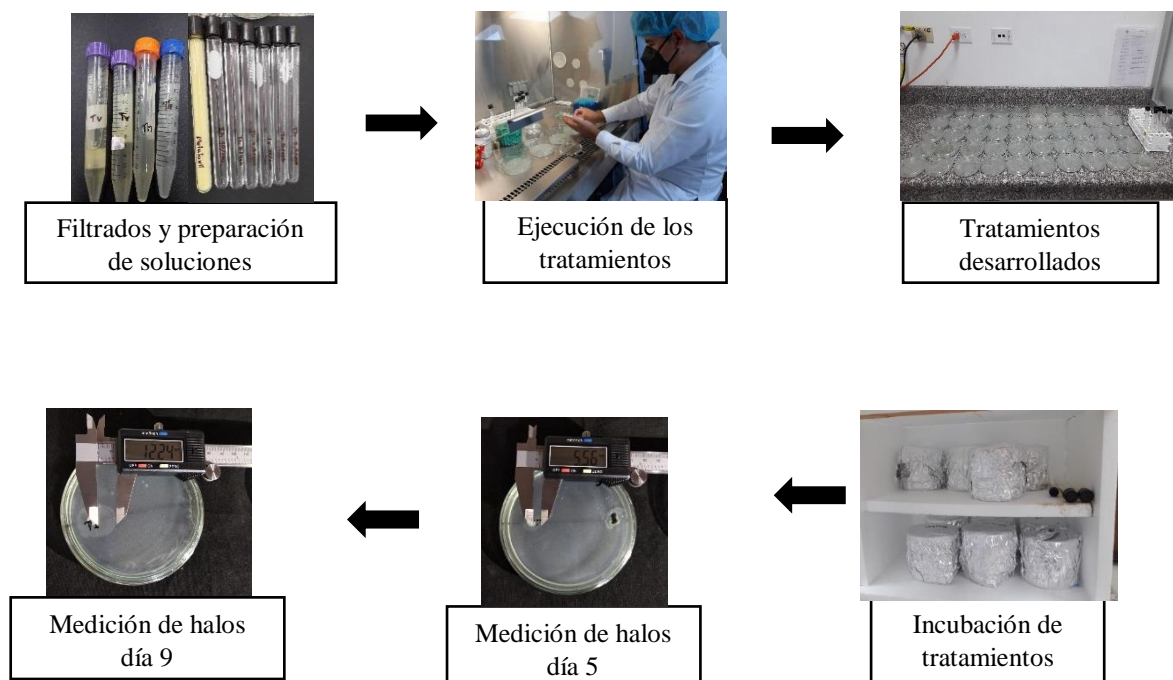
Anexo 12. Esquema de elaboración de cámara húmeda en planta viva



Anexo 13. Esquema de escalado y preparación de soluciones de los extractos obtenidos de cada uno de los reactores de *Trichoderma*.



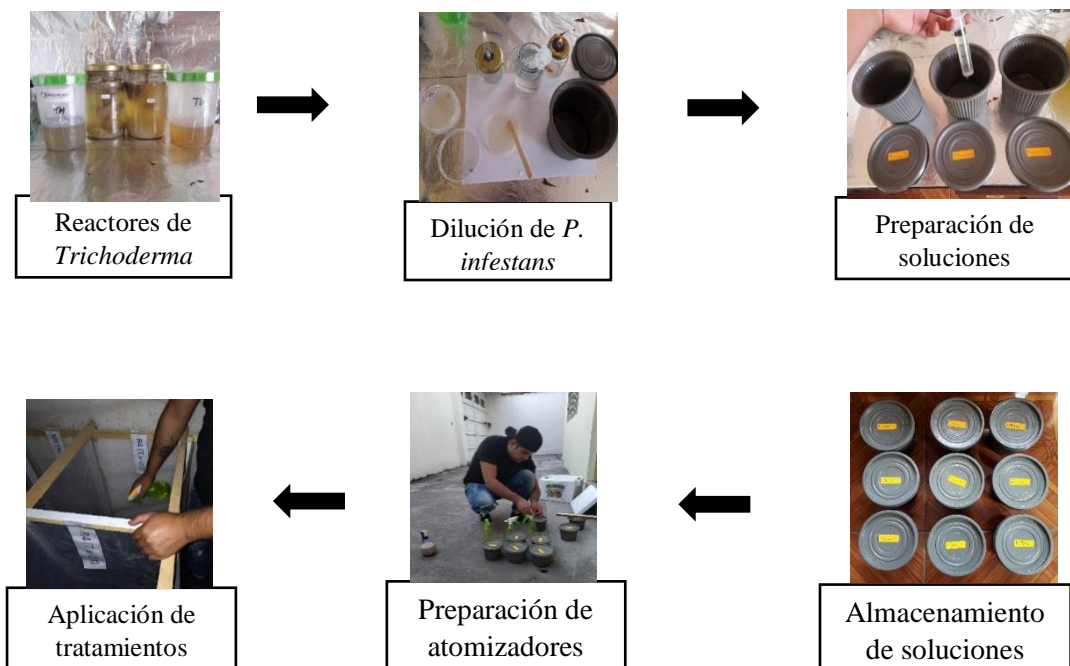
Anexo 14. Esquema del proceso para la evaluación de la actividad antifúngica de *T. harzianum* y *T. viride*



Anexo 15. Esquema del proceso de siembra de papa hasta los dos meses de edad



Anexo 16. Esquema del proceso para la evaluación de la actividad fúngica.



Anexo 17. ANOVA, análisis de la actividad inhibitoria de los extractos día 10

FdV	SC	GL	CM	F	p	significancia
Total	264,16	39				
Repetición	0,31	4	0,08	0,62	0,64954884	
Tratamiento	260,37	7	37,20	299,28	1,3814E-24	*
Hongo	0,42	1	0,42	3,38	0,07665071	*
Concentración	10,52	2	5,26	42,32	3,4381E-09	*
H*C	0,34	2	0,17	1,37	0,27115795	*
Adicionales	134,3	1	134,30	1080,57	6,5038E-24	*
Metalaxil vs	114,79	1	114,79	923,60	5,5258E-23	*
Error	3,48	28	0,12			

Anexo 18. Prueba de Tukey, análisis de la actividad inhibitoria de los extractos día 10

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,72900

Error: 0,1242 gl: 28

tratamiento	Medias	n	E.E.		
4	4,27	5	0,16	A	
1	4,75	5	0,16	A	B
5	5,03	5	0,16	B	
2	5,30	5	0,16	B	C
3	5,94	5	0,16	C	D
6	5,98	5	0,16	C	D
7	6,06	5	0,16	D	
8	12,83	5	0,16		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 19. ANOVA, análisis de la efectividad fungicida de los extractos día 10

FdV	SC	GL	CM	F	p	significancia
Total	38838,38	31				
Repetición	1046,43	3	348,81	2,26	0,11156273	
Tratamiento	34545,45	7	4935,06	31,92	8,2358E-10	*
Hongo	126,68	1	126,68	0,82	0,37561576	
Concentración	27552,14	2	13776,07	89,11	5,499E-11	*
H*C	30,58	2	15,29	0,10	0,90624958	
Adicionales	5761,2	1	5761,20	37,27	4,6669E-06	*
Metalaxil vs	1074,86	1	1074,86	6,95	0,01541864	
Error	3246,5	21	154,60			

Anexo 20. Prueba de Tukey, análisis de la efectividad fungicida de los extractos día 10

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=55,20531
Error: 555,6916 gl: 24

tratamiento	Medias	n	E.E.		
4	0,00	4	11,79	A	
1	0,00	4	11,79	A	
8	33,31	4	11,79	A	B
5	34,17	4	11,79	A	B
2	40,10	4	11,79	A	B C
6	69,23	4	11,79	B	C D
3	92,61	4	11,79	C	D
7	98,44	4	11,79		D

Medias con una letra común no son significativamente dif.

Anexo 21. Prueba de Tukey, análisis de la severidad en el tercio 1 de la planta del día 10

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=29,48932
Error: 154,5951 gl: 21

tratamiento	Medias	n	E.E.		
4	9,06	4	6,22	A	
1	12,18	4	6,22	A	
5	67,32	4	6,22		B
2	70,20	4	6,22	B	C
8	76,19	4	6,22	B	C
6	87,09	4	6,22	B	C
3	94,88	4	6,22	B	C
7	99,37	4	6,22		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo 221. Prueba de Tukey, análisis de la severidad en el tercio 2 de la planta del día

10

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=34,92777
Error: 222,4406 gl: 24

tratamiento	Medias	n	E.E.		
1	12,24	4	7,46	A	
4	12,33	4	7,46	A	
8	53,62	4	7,46		B
2	75,31	4	7,46	B	C
5	84,66	4	7,46	B	C
3	92,71	4	7,46		C
7	100,00	4	7,46		C
6	100,00	4	7,46		C

Medias con una letra común no son significativame

Anexo 232. Prueba de Tukey, análisis de la severidad en el tercio 3 de la planta del día
10

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=31,70546

Error: 183,2907 gl: 24

tratamiento	Medias	n	E.E.	
4	12,90	4	6,77	A
1	24,08	4	6,77	A
8	68,15	4	6,77	B
5	81,46	4	6,77	B C
2	87,35	4	6,77	B C
3	99,19	4	6,77	B C
7	100,00	4	6,77	C
6	100,00	4	6,77	C

Medias con una letra común no son significativamente

Anexo 24. Entrega de informe de las actividades realizadas durante el periodo de investigación



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN Nro. 001-073-CEAACES-2013-13
Ibarra-Ecuador

Ibarra, 25 de agosto del 2020

Abogado
ÁLVARO CADENA
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE IMBABURA

De mi consideración:

El motivo de la presente presentar el informe con los avances obtenidos en la investigación científica con autorización No. 023-2019-IC-FAU-PLO-DPAI/MAE autorización emitida el 07 de octubre del 2019 para el proyecto **“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE *Trichoderma spp.* EN EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*”** Con el objetivo de analizar la capacidad antifúngica del hongo *Trichoderma viride* encontrado en el bosque nublado de la Reserva Sabia Esperanza, Debido a la situación nacional de la pandemia, las instalaciones de la Universidad Técnica del Norte, han permanecido cerradas, no se ha podido llevar a cabo las actividades planificadas para la investigación.

Atentamente,

Ing. GABRIEL CHIMBO MSc.
DOCENTE
DIRECTOR DE PROYECTO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Misión Institucional:

Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar profesionales críticos, humanistas y éticos comprometidos con el cambio social.

Anexo 25. Informe de análisis del sustrato para elaborar el plan de fertilización



Trabajamos bajo la Norma ISO 17025

Agrarprojekt S.A.
Urb. El Condado, Calle V #941 y Av. A, Quito
Tel: 02-2490575/02-2492148/0984-034148
info@agrarprojekt.com
www.agrarprojekt.com

INFORME: ANÁLISIS DE SUSTRATO

PT0901.REV01

Pág 1/2

Código Agrarprojekt:	UTN-080421	Informe de Ensayo N°	500
Fecha de Recepción:	08-04-21	Fecha de Informe:	16-04-21

DATOS DEL CLIENTE	
Cliente:	Galo Fernando García Bedón
Solicitado por:	Galo Fernando García Bedón
Ubicación:	Ibarra Teléfono: 0998229463

PROCESO DE ANÁLISIS
Método utilizado para la preparación de la muestra y elaboración de extractos: Elaboración del extracto según el método Volumen 1:1½ (Método específico para cultivos hidropónicos en sustrato de fibra de coco o en sustratos con características físicas similares - Método A.V.S. -Adviessysteem Venige Sustraten)

MÉTODOS DE REFERENCIA UTILIZADOS	
PARÁMETROS	MÉTODO
pH	EPA 9045 D
Conductividad (C.E.)	SM 2510 B
Nitrato (NO ₃)	ISO 7890-1
Amonio (NH ₄)	SM 4500-NH ₃ D
Fosfato (PO ₄)	SM 4500-P C
Potasio (K)	SM 3500-K B
Magnesio (Mg)	EPA 7000 B
Calcio (Ca)	EPA 7000 B
Sulfato (SO ₄)	SM 4500-SO ₄ E
Sodio (Na)	SM 3500-Na B
Cloruro (Cl ⁻)	SM 4500-Cl G
Hierro (Fe)	EPA 7000 B
Manganeso (Mn)	EPA 7000 B
Cobre (Cu)	EPA 7000 B
Zinc (Zn)	EPA 7000 B
Boro (B)	EPA 7000 B
Molibdeno (Mo)	EPA 7010
Silicio (Si)	EPA 7010
Aluminio (Al)	EPA 7010
Bicarbonatos (HCO ₃)	SM 2320 B
Materia Orgánica	AOAC 967.05 / DIN 19684-3
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	EPA 9081
% Saturación de Bases	EPA 9081

RESULTADOS

Código Agrarprojekt: UTN-080421

Pág 2/2

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA	
Tipo de Muestra:	Sustrato
Cultivo:	Papas
Número de Muestra:	# 1
Información Proporcionada por el Cliente:	S # 1

Contenido de macro- y micronutrientes en mg / litro (respectivamente ppm) en la solución del extracto Volumen 1:1½

Análisis	Unidades	* Recomendación de Holanda: Hortalizas - Cultivo Hidropónico en Fibra de Coco (o en sustratos con características físicas similares) Valor Óptimo	Resultado
pH	-	5,8	5,3
Conductividad (CE)	mS/cm	1,4	0,37
Nitrato (NO ₃)	ppm	370	116
Amonio (NH ₄)	ppm	< 7.2	1,2
Fosfato (PO ₄)	ppm	78	2,5
Potasio (K)	ppm	126	38,6
Magnesio (Mg)	ppm	38	6,0
Calcio (Ca)	ppm	115	17,8
Sulfato (SO ₄)	ppm	163	19,0
Sodio (Na)	ppm	< 69	20,0
Cloruro (Cl ⁻)	ppm	< 106	16,5
Hierro (Fe)	ppm	0,70	0,359
Manganeso (Mn)	ppm	0,05	0,094
Cobre (Cu)	ppm	0,06	0,015
Zinc (Zn)	ppm	0,09	0,022
Boro (B)	ppm	0,110	0,109

* Fuente: C. Sonneveld & W. Voogt. 2009. Plant nutrition of greenhouse crops. Heidelberg, London & New York. 431 pp.

- = No Aplica

Nota:

- Los datos y resultados están basados en la información y muestras entregadas por el cliente para quien se ha realizado este informe de manera exclusiva y confidencial.
- La fecha de ensayo y los métodos utilizados están a disposición del cliente cuando lo requiera.
- El Laboratorio no realizó el muestreo por lo tanto no certifica el origen de las muestras.
- Prohibida la reproducción total o parcial de los resultados. No procede copia.



Agrarprojekt S.A.
Dr. Karl Sponagel
Director del Laboratorio

Anexo 27. Registro de asistencia de las actividades realizadas en el invernadero



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
 FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIEN
 UNIVERSIDAD ACREDITADA RESOLUCIÓN NRO. 001-073-CEAACES-2013
 Ibarra - Ecuador

Ingeniería en
 BIOTECNOLOGÍA

REGISTRO DE ASISTENCIA TESISISTAS
 LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA APLICADA

NOMBRE	FECHA	ACTIVIDAD	ENTRADA	SALIDA	FIRMA TESISISTA	FIRMA TECNICO
Galo García	11/06/21	Preparación de sustrato y macetas	16:00	18:00		
Galo García	13/06/21	Siembra	15:00	17:00		
Galo García	14/06/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:00		
Galo García	19/06/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:00		
Galo García	22/06/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:30	17:30		
Galo García	25/06/21	Riego y Revisión de plantulas	16:00	17:00		
Galo García	28/06/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:00		
Galo García	01/07/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:30	17:30		
Galo García	04/07/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:00		
Galo García	07/07/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:30		
Galo García	09/07/21	Fertilización 16-45-0 orgánica	16:00	18:00		
Galo García	12/07/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:30	17:30		
Galo García	14/07/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:30		
Galo García	25/07/21	Revisión y Fotografía de Plantulas	16:30	17:30		
Galo García	28/07/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:30	17:30		
Galo García	02/08/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:00	17:00		
Galo García	12/08/21	Riego y Revisión de Plantulas	17:00	18:30		
Galo García	19/08/21	Riego y Revisión de Plantulas	16:30	17:30		
Galo García	25/08/21	Riego, Revisión y Fotografiar de Plantulas	11:30	12:30		

FIRMA COORDINACIÓN



REGISTRO DE ASISTENCIA TESISISTAS
 LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA APLICADA

NOMBRE	FECHA	ACTIVIDAD	ENTRADA	SALIDA	FIRMA TESISISTA	FIRMA TECNICO
Galo García	20/09/21	Revisión de Plantas	08:30	09:00		
Galo García	21/09/21	Revisión de Plantas	16:00	17:00		
Galo García	04/09/21	Revisión de Plantas	16:30	17:30		
Galo García	09/09/21	Revisión de Plantas	16:00	17:30		
Galo García	10/09/21	Revisión de Plantas	16:30	17:00		
Galo García	15/09/21	Aplicación del tratamiento Extracto trichostema	16:00	18:00		
Galo García	16/09/21	Inoculación del patógeno en las plantas	16:00	18:00		
Galo García	17/09/21	Revisión de parámetros	16:30	18:30		
Galo García	18/09/21	Revisión de parámetros	16:00	18:00		
Galo García	19/09/21	Revisión de parámetros (severidad)	18:00	19:30		
Galo García	10/09/21	Revisión de parámetros (severidad)	18:30	17:30		
Galo García	21/09/21	Revisión de parámetros severidad (Crisis)	17:00	18:30		
Galo García	22/09/21	Revisión de parámetros severidad (Crisis)	17:20	19:00		
Galo García	23/09/21	Revisión de parámetros severidad (Crisis)	16:30	18:00		
Galo García	24/09/21	Revisión de parámetros severidad	16:00	18:00		
Galo García	25/09/21	Revisión de parámetros severidad	16:30	18:30		
Galo García	26/09/21	Revisión de parámetros severidad	17:00	19:00		
Galo García	28/09/21	Desahado de Plantas	14:00	16:00		
Galo García	30/09/21	Desarme del invernadero	15:00	17:00		

FIRMA COORDINACIÓN