



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA CAPACIDAD
ANTAGONISTA DE *Trichoderma harzianum* Y *Pseudomonas fluorescens* FRENTE A
Phytophthora infestans, AGENTE CAUSAL DE TIZÓN TARDÍO EN LA PAPA
(*Solanum tuberosum* L.)

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

AUTORA: MARÍA JOSÉ JARAMILLO NEIRA

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

Cuenca - Ecuador

2022

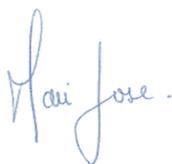
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, María José Jaramillo Neira, con documento de identificación N° 0105253959
manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera
total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 16 de abril del 2022

Atentamente,



María José Jaramillo Neira

0105253959

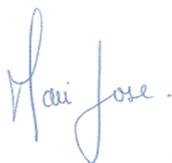
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, María José Jaramillo Neira con documento de identificación N° 0105253959, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo Experimental: “Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* frente a *Phytophthora infestans*, agente causal de tizón tardío en la papa (*Solanum tuberosum* L.)”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 16 de abril del 2022

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink that reads "María José".

María José Jaramillo Neira

0105253959

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044 docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN *in vitro* DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE *Trichoderma harzianum* Y *Pseudomonas fluorescens* FRENTE A *Phytophthora infestans*, AGENTE CAUSAL DE TIZÓN TARDÍO EN LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.), realizado por María José Jaramillo Neira con documento de identificación N° 0105253959, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 16 de abril del 2022

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D.

0102291044

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que luchan por enseñarnos que la verdadera libertad del ser humano está en la superación personal e intelectual.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMEN	17
ABSTRACT	19
1 INTRODUCCIÓN	20
1.1 Antecedentes	20
1.2 Problema de investigación	21
1.3 Pregunta de investigación	23
1.4 Objetivos	23
1.4.1 Objetivo General	23
1.4.2 Objetivos Específicos	23
1.5 Hipótesis	24
1.6 Justificación	24
1.7 Limitaciones	25
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	26
2.1 Estado del Arte	26
2.2 Bases teóricas	27
2.2.1 La papa	27
2.2.2 Tizón tardío	28
2.2.3 <i>Trichoderma</i> spp.	37
2.2.4 <i>Pseudomonas</i> spp.	42

2.2.5	Antagonismo microbiológico	43
3	MARCO PROCEDIMENTAL	46
3.1	Nivel de investigación	46
3.1.1	Diseño de investigación	46
3.1.2	Población y muestra	46
3.1.3	Variables	46
3.1.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	47
3.1.5	Técnicas de procedimiento y análisis de datos	47
3.2	Procedimiento	47
3.2.1	Caracterización e identificación de <i>T. harzianum</i> , <i>P. fluorescens</i> y <i>P. infestans</i>	47
3.2.2	Pruebas de antagonismo	49
3.3	Diseño experimental	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1	Resultados	52
4.1.1	Aislamiento e identificación de microorganismos	52
4.1.2	Pruebas de antagonismo	56
4.1.3	Análisis estadístico	64
4.2	Discusión	67
5	CONCLUSIONES	69
6	RECOMENDACIONES	72
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

8 ANEXOS..... 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de la papa.....	25
Tabla 2: Principales patógenos que afectan a los cultivos de papa	26
Tabla 3: Cuadro de las variedades del INIAP	34
Tabla 4: Taxonomía de <i>Trichoderma</i>	38
Tabla 5: Clasificación taxonómica de <i>Pseudomona fluorescens</i>	42
Tabla 6: Escala de evaluación del antagonismo in vitro	45
Tabla 7: Pruebas bioquímicas y tinción de Gram realizada a <i>P. fluorescens</i>	52
Tabla 8: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre <i>T. harzianum</i> y <i>P. infestans</i> cada 24 horas	57
Tabla 9: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre <i>P. fluorescens</i> y <i>P. infestans</i> cada 24 horas	59
Tabla 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre <i>T. harzianum</i> , <i>P.</i> <i>fluorescens</i> y <i>P. infestans</i> cada 24 horas.	61
Tabla 11: PICR final de cada una de las pruebas en las que se evaluó el antagonismo de <i>T. harzianum</i> , <i>P. fluorescens</i> y la prueba simultanea sobre <i>P. infestans</i>	63
Tabla 12: Planteamiento de hipótesis para ANOVA.....	66
Tabla 13: ANOVA de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial.....	66
Tabla 14: Método de Tukey de las medias de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Micelio sin septas (m) y esporangios limoniformes y elipsoidales	29
Figura 2: Esporangio limoniforme mostrando el pedicelo (p) y la semipapila (sp).....	29
Figura 3: Esporangióforo de crecimiento continuo mostrando los hinchamientos (h) que se forman justo debajo del esporangio	29
Figura 4: Ciclo de vida de <i>P. infestans</i>	31
Figura 5: Desarrollo inicial de la enfermedad.....	32
Figura 6: Lesiones necróticas en hojas causadas por <i>P. infestans</i>	32
Figura 7: Lesión necrótica en un tallo causada por <i>P. infestans</i>	32
Figura 8: Sección transversal de un tubérculo de papa con necrosis causada por <i>P. infestans</i>	33
Figura 9: Diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> en medio PDA.....	38
Figura 10: Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
Figura 11: Microfotografía de <i>Trichoderma</i> sp. a) y b) se observa conidióforos, las flechas muestran proliferación de la fialide c) conidios elipsoidales d) conidios subglobosos	39
Figura 12: Cepa de <i>P. fluorescens</i> enviada por el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.	52
Figura 13: Resultados de la caracterización de <i>P. fluorescens</i> . a) Tinción de Gram (-); b) Prueba de la Oxidasa (+); c) Prueba de la Catalasa: En la izquierda se encuentra el blanco realizado en solución salina (-) y a la derecha la prueba realizada con peróxido de hidrógeno.....	53
Figura 14: <i>T. harzianum</i> aislada a partir de suelo en la rizosfera de una planta de tomate	54

Figura 15: Imagen microscópica de <i>T. harzianum</i> , se pueden observar los conidióforos y fiálides en forma de botella.	54
Figura 16: Imagen microscópica de <i>T. harzianum</i> , se pueden observar hifas septadas.	55
Figura 17: <i>P. infestans</i> aislado a partir de tejido de plantas de papa infectadas.....	56
Figura 18: Imágenes microscópicas de <i>P. infestans</i> , se pueden observar hifas cenocíticas	56
Figura 19: Inhibición in vitro de <i>T. harzianum</i> sobre <i>P. infestans</i> durante 168 horas .	57
Figura 20: Testigo (<i>P. infestans</i>) por 168 horas.	58
Figura 21: Porcentaje de inhibición durante 168 horas a 28 °C.....	58
Figura 22: Inhibición in vitro de <i>P. fluorescens</i> sobre <i>P. infestans</i> durante 144 horas. El estriado blanquecino es la bacteria (antagonista).	59
Figura 23: Testigo (<i>P. infestans</i>) por 144 horas.	60
Figura 24: Porcentaje de inhibición durante 144 horas a 28°C.....	60
Figura 25: Inhibición in vitro de <i>P. fluorescens</i> y <i>T. harzianum</i> sobre <i>P. infestans</i> durante 120 horas.	62
Figura 26: Testigo (<i>P. infestans</i>) por 120 horas.	62
Figura 27: Porcentaje de inhibición durante 120 horas.....	63
Figura 28: Gráfica que representa el promedio de PICR final de cada una de las pruebas en las que se evaluó el antagonismo de <i>T. harzianum</i> , <i>P. fluorescens</i> y la prueba simultanea sobre <i>P. infestans</i>	64
Figura 29: Gráfica de Normalidad para el DCA	65
Figura 30: Hojas con síntomas de infección en proceso de desinfección.....	77
Figura 31: Cajas Petri después de 48 horas de ser inoculada, la caja se encuentra rotulada en la parte posterior.....	77

Figura 32: Cajas Petri después de 168 horas de ser inoculada, la caja se encuentra rotulada en la parte posterior.	77
Figura 33: Prueba de antagonismo: Testigo y tratamiento Simultaneo por triplicado al inicio de la prueba.	78
Figura 34: Prueba de antagonismo: Testigo y tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> al inicio de la prueba.	78
Figura 35: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>T. harzianum</i> al inicio de la prueba.	78
Figura 36: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>P. Fluorescens</i> después de 24 horas de inicio de la prueba.	79
Figura 37: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> después de 24 horas de inicio de la prueba.	79
Figura 38: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 24 horas de inicio de la prueba.	79
Figura 39: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 24 horas de inicio de la prueba.	80
Figura 40: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 24 horas del inicio de la prueba.	80
Figura 41: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 24 horas de inicio de la prueba.	80
Figura 42: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 48 horas de inicio de la prueba.	81
Figura 43: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 24 horas de inicio de la prueba.	81

Figura 44: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>P. Fluorescens</i> después de 48 horas de inicio de la prueba.	81
Figura 45: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> después de 48 horas de inicio de la prueba.	82
Figura 46: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 48 horas del inicio de la prueba.	82
Figura 47: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 48 horas de inicio de la prueba.....	82
Figura 48: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 72 horas de inicio de la prueba.	83
Figura 49: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 72 horas de inicio de la prueba.	83
Figura 50: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>P. Fluorescens</i> después de 72 horas de inicio de la prueba.....	83
Figura 51: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> después de 72 horas de inicio de la prueba.	84
Figura 52: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 72 horas del inicio de la prueba.	84
Figura 53: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 72 horas de inicio de la prueba.	84
Figura 54: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 96 horas de inicio de la prueba.	85
Figura 55: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 96 horas de inicio de la prueba.....	85

Figura 56: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>P. Fluorescens</i> después de 96 horas de inicio de la prueba.	85
Figura 57: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> después de 96 horas de inicio de la prueba.	86
Figura 58: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 96 horas del inicio de la prueba.	86
Figura 59: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 96 horas de inicio de la prueba.....	86
Figura 60: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 120 horas de inicio de la prueba.	87
Figura 61: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 120 horas de inicio de la prueba.....	87
Figura 62: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 120 horas del inicio de la prueba.	87
Figura 63: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 120 horas de inicio de la prueba.	88
Figura 64: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>P. Fluorescens</i> después de 120 horas de inicio de la prueba.	88
Figura 65: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> después de 120 horas de inicio de la prueba.	88
Figura 66: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 144 horas de inicio de la prueba.....	89
Figura 67: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 144 horas de inicio de la prueba.....	89

Figura 68: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con <i>P. Fluorescens</i> después de 144 horas de inicio de la prueba.	89
Figura 69: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con <i>P. Fluorescens</i> después de 144 horas de inicio de la prueba.	90
Figura 70: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 144 horas del inicio de la prueba.	90
Figura 71: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 144 horas de inicio de la prueba.	90
Figura 72: Prueba de antagonismo: Tratamiento con <i>T. harzianum</i> después de 168 horas de inicio de la prueba.	91

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Proceso de desinfección de hojas con síntomas de infección	80
Anexo 2: Gráficos que indican como se encontraban rotuladas las cajas petri para poder tomar la medida del radio	80
Anexo 3: Gráficos de las pruebas de antagonismo tomadas cada 24 horas	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de varianza

DCA: Diseño completamente al azar

Ha: Hipótesis alternativa

H0: Hipótesis nula

PDA: Medio de cultivo Agar papa dextrosa

PICR: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

T: Testigo

T1: Tratamiento 1 (*Trichoderma harzianum*)

T2: Tratamiento 2 (*Pseudomona fluorescens*)

T3: Tratamiento 3 (*Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens*)

%: Porcentaje

RESUMEN

Actualmente, ha incrementado el uso de agroquímicos debido a que existen varias deficiencias en el manejo inadecuado de enfermedades en las plantas de papa lo cual puede hacer que algunos patógenos desarrollen resistencia a ciertos pesticidas. Además, emplear excesivamente químicos contamina el suelo y agua, lo que a su vez provoca daño a la salud humana. *Phytophthora infestans* agente causal de tizón tardío en la papa es uno de los principales fitopatógenos que limita su producción y genera pérdidas económicas altas. En Ecuador el control de tizón tardío se realiza principalmente mediante el control químico, ya que actualmente no se han establecido otros sistemas eficaces teniendo en cuenta que en la mayoría de variedades de patata la resistencia genética no es estable.

En este estudio se evaluó a *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens* y su capacidad de generar inhibición antagónica *in vitro* sobre *P. infestans* aislado a partir de plantas con síntomas de la enfermedad. Se realizaron pruebas usando los microorganismos antagonistas trabajando solos y de manera simultánea, y se determinó las consecuencias del antagonista sobre el fitopatógeno en base al PICR. Se pudo observar que la inhibición con los dos microorganismos individualmente evaluados fue mayor al 55%, mientras que en el tratamiento empleando los dos microorganismos redujo en mayor proporción el crecimiento, puesto que el PICR fue de 58%. A pesar de que se observó que *P. fluorescens* disminuye el desarrollo del organismo patógeno, la misma a su vez disminuye el desarrollo de *T. harzianum*, por lo cual se puede concluir que no hay un resultado sinérgico entre el hongo y la bacteria, donde se ha observado que el porcentaje de inhibición incrementa cuando *T. harzianum* se encuentra trabajando de manera

individual. Se considera importante continuar con el estudio *in situ* para determinar la capacidad antagonista frente a condiciones no controladas.

Palabras Clave: Biocontrol, *Pseudomona fluorescens*, Tizón tardío, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

Currently, the use of agrochemicals has increased due to inadequate disease management in potato crops, which causes that several species of pathogens generate resistance to certain pesticides. In addition, the excessive use of chemicals generates soil and water pollution which can cause damage to human health. *Phytophthora infestans* late blight causal agent is one of the most important phytopathogens in potato because it limits its production and generates high economic losses. In Ecuador the control of late blight is mainly done by chemical control, since currently no other effective systems have been established since the genetic resistance of potato varieties have not been stable. In this study, *in vitro* antagonistic inhibition of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* on *P. infestans* isolated from plants with disease symptoms was evaluated. Tests were carried out using antagonist microorganisms working simultaneously and single, and the consequences of the antagonist on the phytopathogen based on the percentage of radial growth inhibition -PICR. In the test was observed that the inhibition with two microorganisms evaluated individually is greater than 55%, while in the treatment using the two microorganisms reduced growth to a greater extent, because the PICR was 58%. Although it was observed that *P. fluorescens* decreases development of pathogen organism, it in turn decreases the development of *T. harzianum*, so it can be concluded that there is no fungus-bacteria synergistic effect, also it was noted that inhibition is better when *T. harzianum* is working individually. It's important continue with the *in situ* study to determine the antagonist capacity against uncontrolled conditions.

Keywords: Biological control, late blight, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La papa (*Solanum tuberosum L.*), en producción es uno de los cultivos más relevantes alrededor del mundo ocupando el cuarto puesto después del maíz, el trigo y el arroz (FAO, 2006), y es uno de los tubérculos más relevante de los Andes ecuatorianos, se cultiva especialmente en Carchi, Cañar, Chimborazo, Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua (Mancero, 2008). Aproximadamente 52 000 hectareas se encuentran sembradas con papa en Ecuador (FAO, 2008), las cuales se distribuyen entre 2 400 y 8 500 m.s.n.m., donde el proceso de cultivo del mismo genera fuentes ya que existen alrededor de 82 000 productores y cerca de 250 000 personas que se dedican ya sea directa o indirectamente a su cultivo según el III Censo Nacional Agropecuario (INIAP, 2012).

El tizón tardío generado por *Phytophthora infestans*, en Ecuador se considera la principal enfermedad en generar pérdidas al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum L.*), ya que las mias pueden ir entre el 30% y 100 % del rendimiento (Carrillo et al., 2010). Actualmente, el manejo del tizón tardío en el país se da por el control genético, control químico y control cultural (Forbes & Pérez, 2008).

Tratar químicamente al fitopatógeno genera algunos efectos como: baja la rentabilidad del cultivo, contamina el ambiente y genera problemas a la salud de las personas involucradas en su proceso de cultivo. Sin embargo, es el método más empleado, actualmente no se han podido establecer otro tipo de sistemas que sean eficaces para controlar la enfermedad, teniendo en cuenta que de acuerdo al INIAP la resistencia genética de las variedades de patata comercialmente más importantes no ha sido estable (Tello & INIAP, 2008). En las actuales condiciones de producción no se puede producir sin tener la necesidad de emplear agroquímicos especialmente para tratar enfermedades

como el tizón tardío. Para tratar la enfermedad agricultores ecuatorianos realizan cerca de nueve aplicaciones de plaguicidas, lo cual aumenta o disminuye dependiendo del tipo de papa a tratar, por ejemplo en el tipo de papa Superchola los agricultores pueden llegar a realizar hasta 23 aplicaciones, entre tanto, a las variedades de papa mejoradas por el INIAP se les realiza de cinco a ocho aplicaciones en promedio (Unda et al., 2013).

Dentro del grupo de biocontroladores se encuentra el género *Trichoderma spp.*, el cual gracias a las cualidades con las que cuenta es utilizado como base de productos comerciales para controlar varias especies de fitopatógenos. Las cepas de *Trichoderma* mayormente empleadas para realizar bio control son *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, siendo *T. harzianum* una de las más analizadas (Arbitto, 2017).

Pseudomona fluorescens se encuentran dentro de los grupos de bacterias más estudiadas en el área de fitopatología ya que puede producir reguladores del crecimiento vegetal además de varios metabolitos que tienen la capacidad de impedir el desarrollo de patógenos (Trujillo et al., 2007).

1.2 Problema de investigación

Actualmente, la agricultura se ha visto afectada por la cantidad de agroquímicos que se emplean para controlar malezas, plagas y enfermedades, lo cual trajo consigo consecuencias ya que afecta a la salud humana y animal, además de generar contaminación ambiental, cabe destacar que dentro de la contaminación ambiental la reducción de la biodiversidad y pérdida en la salud del suelo son los más importantes (FAO, 2002).

Para la sociedad actual producir sosteniblemente sin generar daños al ambiente es todo un reto, ya que se habla de una sociedad la cual intenta transformar años de

explotación agraria tradicional y convertirlos en sistemas agroecológicos, con el objetivo de reducir el impacto negativo de los pesticidas sintéticos en el ambiente.

Al año se producen 320 millones de toneladas de papa, razón por la cual ocupa uno de los primeros lugares de los alimentos que más se consumen en todo el mundo. (Borba, 2008), sin embargo, no se puede producir adecuadamente gracias a *Phytophthora infestans* agente causal de la enfermedad tizón tardío. En Ecuador, en un estudio realizado por Carrillo et al., (2010) se midió las pérdidas en la cadena de la papa, el cual menciona que el 98% de los productores que participaron afirmaron la incidencia de plagas y el 94% la incidencia de enfermedades; en un diferente estudio realizado por el INIAP, (2017) el 23% de los agricultores catalogan al tizón tardío como factor de riesgo económico y como factor de riesgo de calidad ya que reportaron daños que oscilan entre el 30 y 100% en su producción antes de la cosecha. Además, de acuerdo a Mora et al., (2018) el promedio de deterioro antes de la cosecha suele llegar a los 4 765 kg/ha, lo cual corresponde al 26.33% del rendimiento promedio que se ha obtenido, lo que se encuentra valorado en 1 126 US\$/ha.

La manera tradicional de disminuir los daños y controlar esta enfermedad es aplicando compuestos químicos (agroquímicos), los cuales al momento de controlar la enfermedad generan que la calidad de los alimentos baje, generan contaminación hídrica y del suelo, además de generar resistencia (Badii & Varela, 2015; Romero Montes et al., 2012). Diversas investigaciones proponen alternativas al uso de agroquímicos para tratar fitopatógenos, entre los cuales se encuentran los biocontroladores, que son asequibles para los agricultores y provocarán daños a la biodiversidad.

Gracias a las características con las que cuentan el género *Trichoderma* y el género *Pseudomona*, se busca evaluar su capacidad antagonista contra *Phytophthora infestans* agente causal de la enfermedad de tizón tardío.

1.3 Pregunta de investigación

¿Los microorganismos estudiados tienen capacidad de inhibir el desarrollo de *Phytophthora infestans* en condiciones *in vitro*?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar *in vitro* la capacidad antagonista de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* frente a *Phytophthora infestans* agente causal de tizón tardío en la papa (*Solanum tuberosum L.*), comprobando su efecto de inhibición mediante pruebas de antagonismo realizadas de manera independiente y de manera simultánea.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar una cepa de *Trichoderma harzianum* y una cepa de *Pseudomona fluorescens* aisladas de muestras de suelo de uso agrícola del cantón Nabón empleando técnicas microbiológicas y claves taxonómicas, para utilizarlas en la investigación.
- Caracterizar una cepa de *Phytophthora infestans* aislada de muestras infectadas de cultivos de papa (*Solanum tuberosum L.*) empleando técnicas microbiológicas y claves taxonómicas, para utilizarlas en la investigación.

- Determinar *in vitro* la capacidad antagónica de una cepa de *Trichoderma harzianum* y una cepa de *Pseudomona fluorescens* frente a una cepa de *Phytophthora infestans* empleando el método de cultivo dual y el método de difusión disco-placa, calculando el porcentaje de inhibición.
- Establecer la inhibición *in vitro* de *Trichoderma harzianum* en combinación con *Pseudomona fluorescens* sobre *Phytophthora infestans* mediante pruebas estadísticas inferenciales, determinando la eficiencia de inhibición de manera individual o conjunta.

1.5 Hipótesis

Trichoderma harzianum y *Pseudomona fluorescens* tienen capacidad antagonista semejante frente a *Phytophthora infestans* razón por la cual pueden ser un sustituto a plaguicidas químicos para tratar la enfermedad de tizón tardío.

1.6 Justificación

Constantemente el de patata (*Solanum tuberosum L.*) es atacado por diversos patógenos los cuales provocan enfermedades que limitan su producción, una de las más importantes alrededor del mundo es el tizón tardío.

El tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum L.*), causado por *Phytophthora infestans* es considerada una de las más devastadoras enfermedades reportadas en plantas. Se considera la enfermedad más importante del cultivo de papa ya que se encuentra presente en todos los sectores productores de papas del mundo, además si los cultivos no cuentan con tratamiento químico adecuado de plaguicidas y las condiciones ambientales son las óptimas para el desarrollo del patógeno, los sembríos pueden llegar a ser

destruidos en un rango de una semana a dos semanas (Torres, 2002). Por esta situación se encuentra atravesando varios agricultores de Ecuador y alrededor de todo mundo, ya que las pérdidas generadas por la enfermedad pueden llegar a ser completas. La susceptibilidad de los cultivos más la presencia constante del fitopatógeno exigen al productor a usar plaguicidas, lo cual genera pérdidas económicas ya que el costo de los plaguicidas para tratar esta enfermedad representa entre el 8 y el 20% del valor por el cual se vende la papa (Yépez & Pumisacho, 2016).

Actualmente se ha decidido por buscar opciones de solución para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos gracias al empleo de microorganismos que realizan el papel de antagonistas de los mencionados patógenos, como opción al empleo de agroquímicos.

El género *Trichoderma* es considerada controlador biológico ya que impiden que microorganismo patógeno ocasione daños en la planta. De igual manera, el género *Pseudomona* incluye bacterias saprófitas con capacidad de producir metabolitos biopesticidas y biofertilizantes; los mecanismo de control biológico que emplea *Pseudomona* similares a los empleados por *Trichoderma* spp (Harris Valle et al., 2020), razón por la cual se busca evaluar *in vitro* el efecto antagonista de *T. harzianum* y *P. fluorescens* sobre *P. infestans*.

1.7 Limitaciones

Entre las principales limitantes se encuentran el tiempo y espacios físicos necesarios que pueden estar ocupados en otras actividades académicas.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Estado del Arte

Al existir la necesidad de reducir el uso de agroquímicos para tratar plagas como *Phytophthora infestans*, varios autores han estudiado la inhibición antagónica de varias cepas de *Trichoderma* y *Pseudomona* en condiciones *in vitro*.

Harris Valle et al., (2020) evaluaron la inhibición antagónica de *Trichoderma* sp. y *Pseudomona* sp. sobre el desarrollo de *P. infestans*, encontraron que *Trichoderma* sp. puede inhibir indirectamente el crecimiento alrededor de 50%, mientras que individualmente los dos microorganismos evaluados por separado tiene un porcentaje superior al 65 %. Además, se realizó un tratamiento que consistía en la combinación de los dos microorganismos, el cual disminuyó el crecimiento en una proporción de 80% a 92%.

Flores et al., (2014) evaluaron a varias cepas bacterianas con el objetivo de diseñar un proceso biotecnológico de producción de biofertilizante que además cuente con la característica de inhibir el desarrollo de patógenos como *P. infestans* y *Rhizoctonia solani*. En su investigación determinaron que microorganismos como *P. fluorescens* presentan mayor actividad antagónica contra *R. solani* mientras que sobre *P. infestans* presentan una actividad antagónica mediana.

Jaramillo & Gabriela, (2014) evaluaron la capacidad antagónica de *T. harzianum* y *T. koningii* frente a *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp., durante su investigación pudieron evidenciar que la cepa de *Trichoderma harzianum* mostró el mayor porcentaje de invasión en *Alternaria* sp. y *P. infestans*, sin embargo *T. koningii* presento el porcentaje de invasión más bajo hacia los patógenos.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 La papa

2.2.1.1 Características Generales

La papa, *Solanum tuberosum L.*, ocupa el lugar cuatro entre los cultivos más sembrados en cerca de 100 países, además es considerado uno de los alimentos base en la mayoría de los países desarrollados. Alrededor de todo el mundo, cerca de 290 millones de toneladas se producen y 13.85 millones de hectáreas se cultivan (Román & Hurtado, 2002).

En Ecuador, los cultivos de papa son fuente económica importante para varios pueblos rurales y además son parte indispensable de la economía del país ya que se dedican a su producción alrededor de 42000 familias (INIAP, 2002).

De acuerdo a la FAO, (2008) las papas contienen proteína de alta calidad, además de contener importantes micronutrientes, por ejemplo una papa media de alrededor de 150 gramos que se puede consumir con su piel puede aportar la mitad de las necesidades diarias de un adulto, lo que correspondería a 100mg. .

2.2.1.2 Clasificación taxonómica

Según Zhio, (2011) la taxonomía de la papa es la siguiente:

Tabla 1: *Taxonomía de la papa*

División	Magoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanáceas
Genero	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. Tuberosum</i>

Fuente: (Zhio, 2011).

2.2.1.3 Principales patógenos

Los cultivos de papa generalmente se ven afectados por varios organismos, los cuales estando en las condiciones apropiadas generan daño económico a los agricultores. Los patógenos que afectan a la papa son insectos, hongos, bacterias, nematodos y virus, los cuales afectan la calidad y el rendimiento de las cosechas, dañando sus raíces y partes aéreas; además alteran su desarrollo lo que genera que su calidad comercial baje.

De acuerdo a Torres, (2002) los principales patógenos de los cultivos de papa son:

Tabla 2: Principales patógenos que afectan a los cultivos de papa

Enfermedad	Nombre del patógeno	Tipo de patógeno
Tizón Tardío	<i>Phytophthora infestans</i>	Oomycete
Pudricion rosada	<i>Phytophthora erythroseptica</i>	Oomycete
Rizoctoniasis	<i>Rhizoctonia solani</i>	Hongo
Marchitez <i>Verticillium</i>	por <i>Verticillium alboatrum</i> y <i>V. dahliae</i>	Hongo
Roña	<i>Spongospora subterranea</i>	Hongo
Sarna común	<i>Streptomyces scabiei</i> , <i>S. acidiscabies</i>	Bacterias
Carbón	<i>Angiosorus solani</i>	Hongo
Verruga	<i>Synchytrium endobioticum</i>	Hongo
Pudrición <i>Rosellinia</i>	por <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>R. bunodes</i> y <i>R. pepo</i>	Hongo

Fuente: (Torres, 2002).

2.2.2 Tizón tardío

El tizón tardío, comúnmente llamado gota o añublo es una de las enfermedades vegetales más destructoras de plantas reportada, está presente en todas las regiones del mundo (H. Torres, 2002).

2.2.2.1 Agente causal

De acuerdo al INIAP, (2012) el tizón tardío es causado por el fitopatógeno *Phytophthora infestans*.

Este patógeno se caracteriza por tener celulosa en su pared celular, son diploides, al no tener septas que lo dividan su micelio es cenocítico como lo muestra la figura 1 (H. Torres, 2002). Como se observa en la figura 2 sus esporangios son ovoides y elipsoidales en forma de limón y tienen un pedicelo menor de alrededor de 3 mm (Altamirano et al., 2018), además, según Forbes & Pérez, (2008) sus esporangióforos presentan desarrollo continuo además de un pequeño abultamiento debajo del esporangio como lo indica la figura 3.

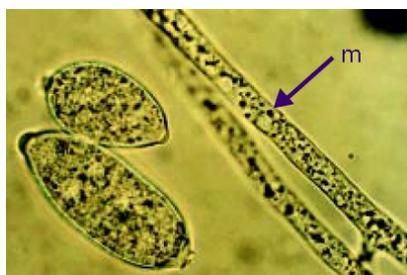


Figura 1: *Esporangios limoniformes y elipsoidales; m representa al micelio sin septas*

Fuente: Tomado de *Manual técnico: El tizón tardío de la papa* (p.11), por W. Pérez., 2008.

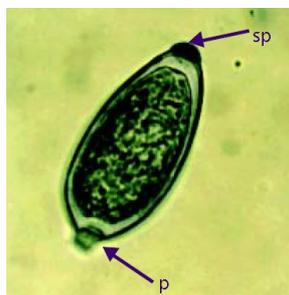


Figura 2: *Esporangio limoniforme; el esporangio muestra el pedicelo señalado como p y la semipapila indicada como sp.*

Fuente: Tomado de *Manual técnico: El tizón tardío de la papa* (p.12), por W. Pérez., 2008.

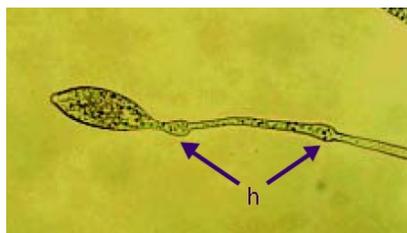


Figura 3: *Se muestra el esporangióforo, los abultamientos se muestran con la letra h*

Fuente: Tomado de *Manual técnico: El tizón tardío de la papa* (p.12), por W. Pérez., 2008.

De acuerdo a Yépez & Pumisacho, (2016) *P. infestans* es un microorganismo oomycete, heterotático, que tiene la capacidad de producir tres diferentes tipos de esporas: esporangios, zoosporas, y oosporas; los esporangios son las esporas más producidas durante la enfermedad y forman parte de la reproducción asexual, producidas en gran cantidad durante la mayor parte del ciclo de la enfermedad, cuando existen temperaturas altas -más de 15 °C- los esporangios infectan nuevos tejidos, mientras que cuando la temperatura baja -menos de 15 °C- y existe humedad los esporangios generan zoosporas. Las zoosporas son células que cuentan con la capacidad de desplazarse en medios líquidos para poder esparcir la infección. Las oosporas se generan por la unión del oogonio y anteridio -células gaméticas, las oosporas cuando se encuentran en las condiciones adecuadas pueden generar el micelio y los esporangios (H. Torres, 2002).

De acuerdo a Andrade-Piedra, Taipe & Torres, (2011) en Ecuador cuando existen bajas temperaturas y suficiente agua se genera el ciclo de reproducción asexual de *P. infestans*, donde los esporangios germinan con lo cual pueden llegar a producir entre 8 y 12 zoosporas uninucleadas y biflageladas; estas se van a producir en el esporangio y van a poder ser liberadas en el momento en el que la pared esporangial se rompa para luego detenerse en zonas sólidas y ahí formar una pared celular, cuando se encuentran en áreas húmedas las zoosporas pueden generar un tubo germinativo para ingresar a la hoja mediante los estomas.

Una vez se encuentra adentro de la planta el micelio va a crecer entre las células, conjuntamente va a formar haustorios dentro de la célula y procederá a generar esporangios, los cuales podrán ser visibles en el envés de las hojas (Forbes & Pérez, 2008).

En la figura 4 se encuentra de manera gráfica el ciclo de vida de *P. infestans* y su epidemiología.

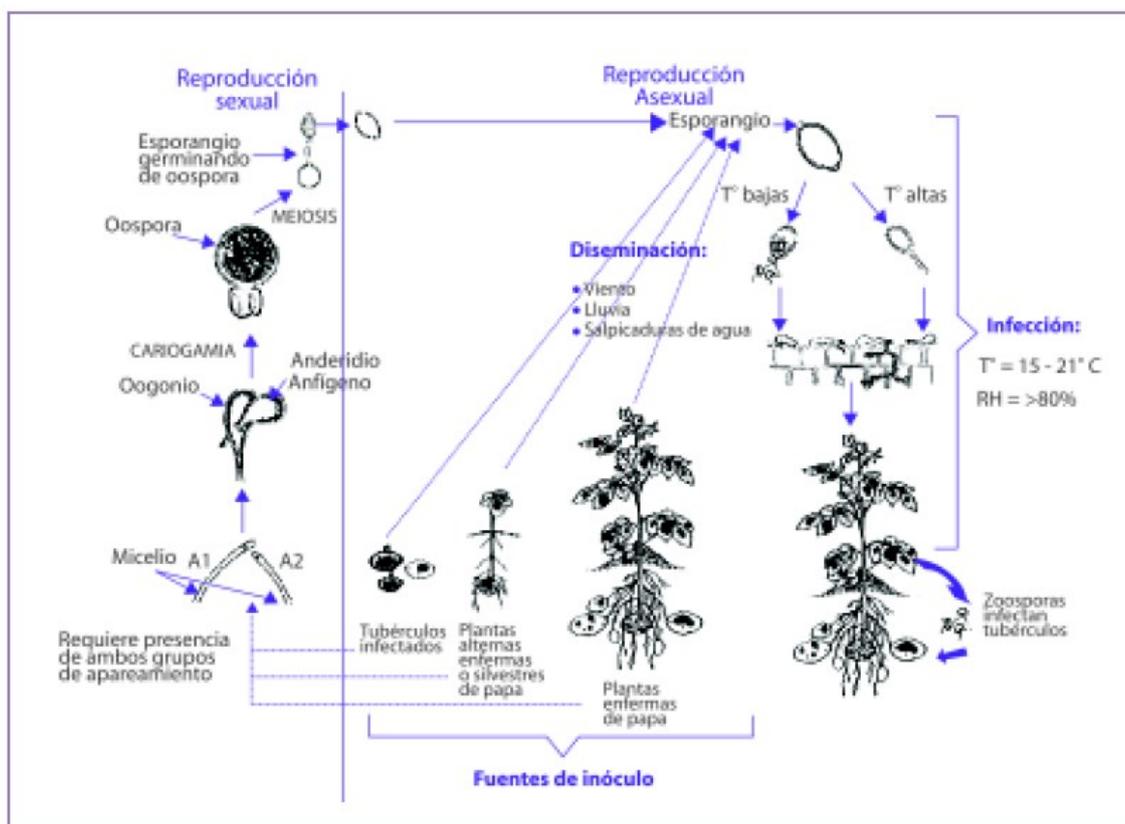


Figura 4: Ciclo de vida de *P. infestans*

Fuente: Tomado de *Manual Técnico: El tizón tardío de la papa* (p.13), por W. Pérez., 2008.

2.2.2.2 Sintomatología

La gota de la papa afecta a los tubérculos y a los órganos aéreos de la planta, los síntomas pueden ser diferentes dependiendo de la parte que fue afectada. Los síntomas que presentan plantas con infección son:

- **Hoja:** Los síntomas inician con diminutas manchas de color verdoso que con el paso de días se tornan a un color café grisáceo en el centro como lo muestra la figura 5 y 6 (H. Torres, 2002). Si la humedad es alta mientras la enfermedad crece, en el envés de la hoja donde se produjo la lesión se generará un crecimiento afelpado grisáceo, el cual estará constituido por varias estructuras reproductivas del patógeno (ICA, 2011).



Figura 5: *Desarrollo inicial de la enfermedad*

Fuente: Tomado de *Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú* (p.6), por H. Torres., 2002.



Figura 6: *Lesiones necróticas en hojas causadas por P. infestans*

Fuente: Tomado de *Manual de las enfermedades más importantes de la Papa en el Perú* (p.6), por H. Torres., 2002.

- **Tallo:** Los señales aparecen como lesiones irregulares de un color marrón como lo muestra la figura 7, los tallos afectados se rompen cuando existe viento, al contacto con máquinas o simplemente cuando una persona que transitaba por el campo se pudo en contacto con la planta (ICA, 2011).



Figura 7: *Lesión necrótica en un tallo causada por P. infestans*

Fuente: Tomado de *Manual de las enfermedades más importantes de la Papa en el Perú* (p.6), por H. Torres., 2002.

- **Tubérculo:** En la parte externa de los tubérculos afectados la enfermedad ocasiona lesiones oscuras irregulares como se muestra en la figura 8, estas lesiones las cuales se generan cuando se encuentra el tubérculo en y pueden ayudar a que el patógeno se distribuya por el campo de siembra (ICA, 2011).



Figura 8: Tubérculo con necrosis causada por *P. infestans*

Fuente: Tomado de *Manual de las enfermedades más importantes de la Papa en el Perú* (p.7), por H. Torres., 2002.

2.2.2.3 Epidemiología

De acuerdo a H. Torres, (2002) la supervivencia del patógeno se da en forma de micelio en tubérculos ya sean semilla o tubérculos que fueron rechazados cerca de los cultivos, igualmente la infección se produce cuando los tubérculos encuentran en el suelo ramaje infectado o esporangios, cuando existe humedad los esporangios pueden llegar a mantenerse varias semanas en suelo, mientras que si baja la temperatura a menos de 10 °C no sobreviviría (Forbes & Pérez, 2008),

Los brotes que se generaron desde los tubérculos que fueron infectados inicialmente van a pasar a ser el inóculo inicial, mediante el tallo va a crecer el micelio hasta llegar al suelo (Acuña & Remehue, 2008). Después de alrededor de cuatro a seis días si existen condiciones apropiadas de temperatura y humedad se generarán nuevos

esporangióforos los cuales producirán numerosos esporangios que procederán a infectar a otras plantas (Acuña & Remehue, 2008).

2.2.2.4 Mecanismos de control

Forbes & Pérez, (2008); mencionan que las estrategias empleadas para el control integrado son: control químico, control cultural, genético y control biológico. El MIP -manejo integrado de plagas- tiene el objetivo de disminuir o evitar las enfermedades en los cultivos sin contaminar el ambiente, ni causar daño a la salud humana y sin generar pérdidas económicas a los agricultores.

2.2.2.4.1 Control químico

P. infestans es un fitopatógeno que cuenta con la característica de poder desarrollar resistencia a los agroquímicos, por lo que el plan de control químico de este microorganismo incluye rotar productos de contacto y sistémicos.

- a) **Agroquímicos de contacto:** Las aplicaciones deben hacerse desde las etapas iniciales del cultivo. Los pesticidas de contacto se encargan de dañar las principales estructuras del patógeno, de esta manera solo protegen la zona en la que fue depositado el químico, por lo cual una vez que el patógeno ingresó a la planta el pesticida no es efectivo; además, generalmente existe una aplicación deficiente, de baja cobertura o lavado del producto gracias a la lluvia (Acuña & Remehue, 2008).
- b) **Agroquímicos sistémicos:** los agroquímicos sistémicos ingresan a través de los órganos aéreos de la planta o a través de las raíces y tienen la capacidad de translocarse al interior de la planta por dos vías: el xilema y el floema, inhibiendo de esta manera varias fases del metabolismo del patógeno; la principal desventaja de este mecanismo

de control es que el uso continuo de estos pesticidas genera resistencia en varias cepas patógenas (Forbes & Pérez, 2008)

2.2.2.4.2 Control cultural

Se busca establecer acciones con el objetivo de cambiar el ecosistema en el se encuentra creciendo el patógeno para que no pueda ejercer acción sobre la planta huésped. Generalmente lo que se hace es no sembrar las plantas muy cerca ya que al crecer reducir el espacio que existe entre ellas y evitaran la entrada de aire con lo que se generará un microclima con humedad alta lo cual favorecerá al desarrollo de *P. infestans* (Tzortzakis, 2009). Según Acuña & Remehue, (2008) no debe realizar demasiadas aplicaciones de fertilización nitrogenada porque ya que aplicaciones de más de 150 kg/ha de Nitrógeno aumentará el daño provocado por el oomycete. Conjuntamente con este tipo de prácticas se han generado sistemas que se encuentran orientados a dar alertas tempranas basados en modelos computacionales que predicen las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad basándose en datos climáticos, mediante este sistema varios agricultores pueden decidir sobre el producto adecuado, el sistema de producción, el tipo de agroquímico, etc.

2.2.2.4.3 Control genético

De acuerdo al INIAP, (2002) el mejoramiento genético en Ecuador se encuentra orientado a generar variedades de papa precoces que cuenten con la característica de ser resistentes al tizón tardío, que cuenten con alto rendimiento y una alta calidad productiva. El mejoramiento consiste en el cruce de genes locales e introducidos de varios orígenes, el proceso involucra la participación activa de productores en el campo (ICA, 2011). En la tabla que se presenta a continuación se encuentran clasificadas las variedades de Papa

del INIAP de acuerdo a su nivel de resistencia a tizón tardío, además, se indica que tipo de variedad es nativa y que tipo es mejorada.

Tabla 3: Cuadro de las variedades del INIAP

Muy Resistentes	Resistentes	Susceptibles	Muy Susceptibles
INIAP Estela *	INIAP Fripapa*	Cecilia*	Diacol-Capiro
INIAP Natividad*	INIAP Margarita*	INIAP Esperanza*	
INIAP Papa pan*	INIAP Raymipamba*	INIAP Gabriela*	
INIAP Santa Ana*	INIAP Santa Catalina*	INIAP Isabel*	
INIAP Suprema	INIAP Soledad	INIAP Maria*	
	Cañari*	Superchola	
	Carolina*	Bolona**	
	Libertad*	Carrizo**	
	ICA-Única*	Uvilla**	
		Yema de huevo	

*Variedades mejoradas

**Variedades nativas

Fuente: (L. Torres et al., 2011).

2.2.2.4.4 Control biológico

Es la poner en contacto a uno o varios organismos vivos con el organismo patógeno agente causal de la infección. Varios estudios han demostrado la capacidad antagonista de varios microorganismos con *P. infestans*, entre los cuales se menciona *Serratia* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp, *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Myrothecium* spp., entre otros (Forbes & Pérez, 2008).

En Ecuador actualmente existe el proyecto “Biocontrol para Sistemas Agrícolas Sustentables” el cual se encuentra costado económicamente por el Ministerio de Relaciones Exteriores y Comercio de Nueva Zelandia, el proyecto ha demostrado la capacidad de varios microorganismos en actuar como organismos antagonistas en la agricultura. En el proyecto se tomó en cuenta a varias especies de *Trichoderma* y *Pseudomona* y su eficiencia en el manejo de plagas.

2.2.3 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* spp. se encuentra en el suelo, durante varios años se emplea durante la producción de enzimas y para inhibir el desarrollo de ciertos fitopatógenos. Infante & González, (2009) indican que *Trichoderma* se encuentra en todo el mundo, desde las zonas con las temperaturas más bajas hasta las zonas con temperaturas altas, esto se debe a que *Trichoderma* puede degradar varios tipos de sustratos, además puede generar resistencia a inhibidores. *Trichoderma* spp. se desarrolla en suelos que tienen materia orgánica en abundancia con pH neutro o incluso hasta ácido, además es un hongo aeróbico (Villegas, 2005).

D. Infante & González, (2009) mencionan que las mejores condiciones de crecimiento para esta clase de hongos son:

- Se desarrolla en un rango de temperatura que va desde los 15 °C a los 35 °C, siendo su temperatura óptima de 25 °C.
- Es capaz de crecer con una humedad relativa que puede ir del 20% al 80%, siendo su humedad relativa óptima de 70%.

De acuerdo a Infante & González, (2009) *Trichoderma* spp. posee estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, naturales. Sus conidióforos son hialinos, ramificados, formados por hifas que en ocasiones pueden llegar a formar una estructura similar a una pirámide (Gavilanes, 2015). Las fiálides son hialinas, ya que se adhieren a los conidióforos en su parte más extensa (Romero-Arenas et al., 2008).

Al inicio generalmente las colonias de *Trichoderma* spp. tienen color blanquecino, el cual posteriormente se torna a una gama de colores que va desde verde oscuro hasta amarillo verdoso cuando existe esporulación densa, como lo indica la figura 9 en la cual se muestran cuatro tipos diferentes de cepas de *Trichoderma*. Gavilanes, (2015) señala que

el micelio de *Trichoderma* spp. es ralo, sus conidióforos son ramificados y se presentan en forma anillos con ramas que crecen como si fuera una pirámide y terminan en fiálides donde se forman los conidios como se puede observar en las figuras 10 y 11.

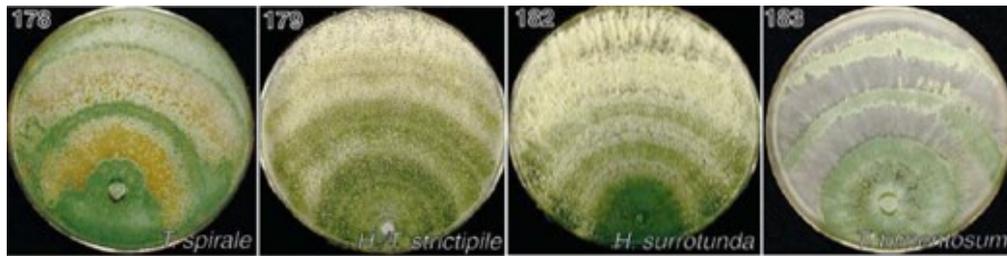


Figura 9: Diferentes cepas de *Trichoderma* en medio PDA

Fuente: Tomado de *Aislamiento y Caracterización Molecular y Agronómica de Trichoderma spp. Nativos del Norte de Tamaulipas* (p.5), por P. Chaverri., 2003.

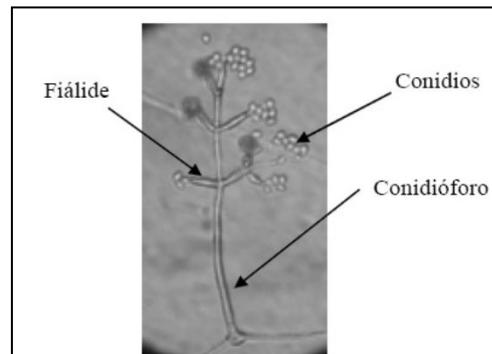


Figura 10: Conidios y conidióforos de *Trichoderma* spp.

Fuente: Tomado de *Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos* (p.15), por B. Infante., 2002.

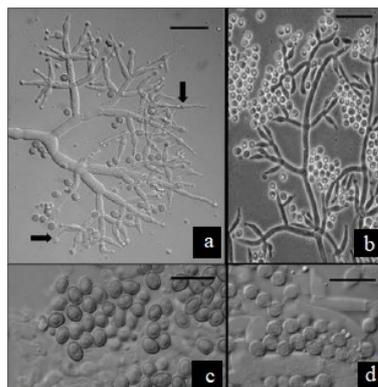


Figura 11: Microfotografía de *Trichoderma* sp. **a)** y **b)** se observa conidióforos, las flechas muestran proliferación de la fialide **c)** conidios elipsoidales **d)** conidios subglobosos

Fuente: Tomado de *Aislamiento y Caracterización Molecular y Agronómica de Trichoderma spp. Nativos del Norte de Tamaulipas* (p.4), por Sanchez., 2009.

De acuerdo a Villegas, (2005) *Trichoderma* se ubica taxonómicamente en:

Tabla 4: Taxonomía de *Trichoderma*

Reino	Fungi
División	Mycota
Subdivisión	Eumycota
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

Fuente: (Villegas, 2005).

2.2.3.1 Mecanismos de acción

2.2.3.1.1 Micoparasitismo

Gavilanes, (2015) señala que el micoparasitismo es el desarrollo de un microorganismo antagonista hacia un microorganismo patógeno, rodeándolo o formando estructuras que tienen el objetivo de ingresar al interior de hospedero gracias a la acción de enzimas líticas como la quitinasa y β -1,3-glucanasa poder desintegrar la pared celular.

El proceso se divide en 4 etapas:

- **Crecimiento quimiotrópico:** En esta etapa gracias al quimiotropismo *Trichoderma* puede detectar al organismo parasito mientras que sus hifas inician el reconocimiento del patógeno como respuesta al estímulo (Chet & Inbar, 1994).
- **Reconocimiento:** *Trichoderma* solo puede ejercer su efecto en algunos patógenos, la elección de fitopatógenos es gracias a un reconocimiento molecular que depende de las relación que se generan entre lectinas y algunos azucares (D. B. Infante et al., 2002; Martinez et al., 2017).
- **Adhesión y enrollamiento:** según D. B. Infante et al., (2002) cuando el reconocimiento molecular es positivo, las hifas de los dos organismo se adhieren entre sí, en el proceso se ven involucrados varios procesos enzimáticos.
- **Actividad lítica:** en esta etapa se producen enzimas líticas extracelulares, que destruyen las paredes celulares del organismo hospedante y hacen posible la introducción de las hifas del antagonista (Gavilanes, 2015).

2.2.3.1.2 Competencia

El proceso de competencia ocurre cuando dos o más organismos requieren el mismo recurso y el uso de éste por lo cual uno reduce la cantidad disponible para el otro. Como afirma Ahmad, (1987) la competencia es un tipo de antagonismo que se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad y otros (Gavilanes, 2015).

Trichoderma es por naturaleza un colonizador agresivo al tomar sustratos de sustratos, su rápido desarrollo, cuantiosa esporulación y su capacidad de adaptarse a varios sustratos para poder desarrollarse lo convierten en un microorganismo saprofito y agente de control biológico eficiente (Pérez, 2004).

2.2.3.1.3 Antibiosis

Es el efecto directo de un antibiótico o metabolito tóxico sintetizado por un microorganismo que es sensible al mismo. Varias cepas de *Trichoderma* sintetizan metabolitos secundarios, de los cuales varios tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos con los cuales tienen contacto (D. B. Infante et al., 2002).

2.2.3.2 *Trichoderma harzianum* (Rifai)

Trichoderma harzianum (Rifai), es un hongo ampliamente conocido por producir metabolitos tóxicos y antibióticos.

El color del micelio de *T. harzianum* en su estadio temprano es blanquecino y posteriormente a la esporulación se torna a un color verde oscuro, esta especie prefiere zonas con humedad relativa alta y un pH ácido de 4.5-5 (Romero & Dominguez, 2009).

Romero & Dominguez, (2009) dan a conocer que el ciclo de vida de *T. harzianum*, empieza en el momento en el que el microorganismo se desarrolla y genera ramificaciones, la esporulación asexual empieza en el momento en el que las esporas se sueltan. Los conidióforos se tornan color verde y se ramifican perpendicularmente (M. Ezziyyani et al., 2004). Las clamidosporas se encuentran intercaladas y se encuentran formadas por el micelio, razón por la cual tienen un color verde ligero (Romero & Dominguez, 2009).

Diversas cepas de *Trichoderma* son antagonistas que mayormente se emplean para tratar infecciones generadas por hongos, gracias a que aislarlas y cultivarlas resulta sencillo y se desarrollan rápidamente en varios sustratos (M. Ezziyyani et al., 2004).

2.2.4 *Pseudomonas* spp.

Como menciona Alfredo Pinzón, (2019) *Pseudomonas* hace referencia a la familia *Pseudomonadaceae* característicos por ser bacilos aerobios con características de identificación gramnegativa, catalasa positiva y negativos para la fermentación de glucosa. Este género abarca a más de 100 especies, las cuales fueron separadas en nueve grupo mediante un análisis de secuencias multilocus -MLSA- multilocus sequence analysis: *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Pseudomonas syringae* Van Hall, *Pseudomonas lutea* Peix, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Pseudomonas anguilliseptica* Mlakabayashi y Egusa, *Pseudomonas straminea* Iizuka y Komagata, *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter, *Pseudomonas oleovorans* Lee y Chandlery, *Pseudomonas stutzeri* Lehmann and Neumann (Pérez Álvarez et al., 2015).

Este tipo de bacterias tienen la posibilidad de emplear una gama de nutrientes, además su actividad enzimática los hace los principales responsables de la degradación aeróbica de una infinidad de sustancias en diversos ambientes (Ximhai et al., 2012).

2.2.4.1 *Pseudomonas fluorescens* Migula

Pseudomonas fluorescens se ubica taxonómicamente según Pérez & Coto, (2015)

en:

Tabla 5: Clasificación taxonómica de *Pseudomonas fluorescens*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula

Fuente: (Pérez Álvarez et al., 2015).

Como menciona Yared Hernández, *Pseudomonas fluorescens* puede sintetizar fluoresceína o pioverdín, un pigmento que puede reaccionar a la luz ultravioleta produciendo fluorescencia. *P. fluorescens* se encuentra en diversos ecosistemas como el suelo y agua (Pérez Álvarez et al., 2015). La temperatura en la cual se desarrolla la bacteria es de 25 a 30 °C, sin embargo, es posible que se desarrolle en un rango de temperatura de 5 hasta 42 °C (Ronnie et al., 2017). Para su desarrollo el pH adecuado es neutro (Lozoya et al., 2005).

Como cita Yared Hernández, numerosos trabajos lo bien que trabaja *Pseudomona fluorescens* como controlador biológico gracias a su eficiencia al momento de colonizar la rizosfera, su capacidad de generar metabolitos tóxicos y antibióticos, su capacidad de inducir plantas resistencia sistémica.

2.2.5 Antagonismo microbiológico

Los microorganismos antagonistas pueden ser controladores biológicos de varios fitopatógenos razón por la cual se han usado para tratar varias infecciones (De Costa & Erabadupitiya, 2005).

De acuerdo a Wisniewski & Wilson, (2019) existen varias características con las cuales debe cumplir un organismo para ser seleccionado como antagonista:

- Ser un rápido colonizador de plantas y poder subsistir en la superficie de la misma
- Competir eficientemente frente al patógeno al conseguir nutrientes
- Poder sobrevivir bajo varios escenarios ambientales

Además, Wisniewski & Wilson, (2019) mencionan que se deben tomar en cuenta otras peculiaridades específicas del organismo antagonista, como las siguientes:

- Ser estable genéticamente

- Poder trabajar efectivamente en bajas concentraciones
- Que sus requerimientos nutricionales no sean especiales
- Poder subsistir en condiciones limitantes de los ecosistemas
- Ser efectivo con un grupo grande de organismos patógenos
- Capacidad de reproducirse en medios de desarrollo que sean económicos
- Mantenerse en una formulación por un gran momento de su vida
- Que se pueda emplear fácilmente sin esperar a que produzca metabolitos secundarios que sean perjudiciales para los seres humanos y animales
- No ser un patógeno para la planta huésped

Para poder identificar la capacidad antagonista de diferentes microorganismos se emplean pruebas *in vitro* en las cuales se busca calcular la capacidad de inhibición del microorganismo antagonista frente al patógeno midiendo el crecimiento radial de cada uno.

2.2.5.1 Métodos para identificar la capacidad antagonista *in vitro*

El antagonismo de los microorganismos se evidencia al estudiar el radio de crecimiento del organismo antagonista, radio de crecimiento del patógeno y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial. En el presente trabajo se emplearon dos métodos para identificar la capacidad antagonista:

2.2.5.1.1 Antagonismo bacteria-patógeno

Este método se realiza inoculando una placa de agar con el organismo antagonista, para posteriormente proceder a colocar discos de agar que contengan micelio del organismo patógeno (Taroco et al., 2006).

2.2.5.1.2 Cultivo dual

Este método se realiza en cajas Petri de diámetro conocido, en las cuales se colocan dos discos de agar con micelio a una distancia conocida: en el primer extremo se coloca un segmento de 1 centímetro que contenga al microorganismo patógeno, mientras que en el segundo extremo se coloca un disco de agar con micelio del microorganismo antagonista (Fernández & Suárez, 2009).

De acuerdo a Guédez et al., (2012) se deberá tomar como indicador de la capacidad antagonista la capacidad del organismo para invadir la superficie sobre la cual se encuentra el organismo patógeno y compararla con la siguiente tabla:

Tabla 6: *Escala de evaluación del antagonismo in vitro*

Grado	Capacidad Antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del patógeno
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del patógeno

Fuente: (Mohammed Ezziyyani et al., 2004).

2.2.5.1.3 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial

Como cita Harris, (2020) las pruebas para determinar la capacidad antagónica comparan la velocidad de crecimiento de los organismos, razón por la cual se debe tomar nota del tamaño de los radios de los microorganismos para posteriormente encontrar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial -PICR, empleando la siguiente fórmula:

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

Donde:

R1 radio medido del patógeno en la caja testigo

R2 radio del patógeno medido cada 24 horas en la prueba antagónica

3 MARCO PROCEDIMENTAL

3.1 Nivel de investigación

3.1.1 Diseño de investigación

El diseño empleado para la investigación será del tipo Experimental, ya que se pondrá en contacto a *Phytophthora infestans* frente a dos tipos de agentes *antagonistas* *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens*, con el fin de evaluar el porcentaje de inhibición del patógeno.

3.1.2 Población y muestra

La población se considera accesible por recursos y tiempo. Las muestras del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) infectada fueron recolectadas de un cultivo ubicado en el sector San Joaquín en la ciudad de Cuenca, mientras que las muestras de suelo del cual fue aislado *Trichoderma harzianum* fueron recolectados un terreno de uso agrícola del cantón Nabón. Una cepa de *Pseudomona fluorescens* fue solicitada a la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, mediante su personal de laboratorio de Ciencias de la Vida.

3.1.3 Variables

Variable Dependiente

Inhibición del desarrollo de *Phytophthora infestans*

Variable Independiente

Tipo de microorganismo antagonista: *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens*

3.1.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Investigación documental y análisis de datos, se emplearán bases de datos bibliográficos, libros, artículos científicos, hojas de cálculo digitales y un software estadístico gratuito.

3.1.5 Técnicas de procedimiento y análisis de datos

Los datos fueron procesados después de ser clasificados, analizados y tabulados, mientras que para su análisis se aplicó un Diseño Completamente al Azar para poder realizar un Análisis de Normalidad, posteriormente un Análisis ANOVA y la prueba de significancia de Tukey para comparar el porcentaje de inhibición de los tratamientos.

3.2 Procedimiento

El trabajo fue desarrollado en la ciudad de Cuenca en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

3.2.1 Caracterización e identificación de *T. harzianum*, *P. fluorescens* y *P. infestans*

3.2.1.1 *Pseudomonas fluorescens*

3.2.1.1.1 Obtención de cepas

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* fue solicitada a la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, esta fue resembrada e incubada a 25 °C por tres días.

3.2.1.1.2 Identificación de cepas

Para realizar la identificación de cepas de *Pseudomonas fluorescens* se realizó una tinción de Gram, prueba de catalasa y prueba de oxidasa.

3.2.1.2 *Trichoderma harzianum*

3.2.1.2.1 Recolección de muestras

Las muestras de suelo se recolectaron en un terreno de uso agrícola del cantón Nabón, se recolectó 200 g de suelo que rodeaba raíces de plantas de tomate, a 5-10 cm de profundidad, el cual fue transportado en bolsas ziploc plásticas y fue llevado a refrigeración hasta su procesamiento.

3.2.1.2.2 Procesamiento de muestras

El protocolo empleado para aislar *Tichoderma harzianum* fue el descrito por Harris Valle et al., (2020). Se tomaron 10 g del suelo muestra y se colocaron en 0.09 L de agua destilada esterilizada. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} y 10^{-5} g/mL, las cuales fueron sembradas en medio agar papa-dextrosa (PDA) y posteriormente incubadas a 28 °C durante ocho días.

3.2.1.2.3 Caracterización macroscópica y microscópica

La determinación de estructuras macroscópicas se realizó empleando cultivos en placa Petri por 2 semanas, posteriormente se evaluó su color, su forma y su textura.

La determinación de estructuras microscópicas se realizó empleando una tinción con azul de lactofenol, para observar se empleó un microscopio óptico con cámara fotográfica integrada, con un lente de 40X.

3.2.1.3 *Phytophthora infestans*

3.2.1.3.1 Recolección de muestras

Las muestras del cultivo de papa (*Solanum tuberosum L.*) con señales de infección (Tizón tardío) fueron recolectadas de un cultivo ubicado en el sector San Joaquín en la ciudad de Cuenca.

Se escogieron órganos aéreos de la planta que presentaban señales de enfermedad, se colocaron en bolsas ziploc de plástico transparente para ser llevadas a refrigeración.

3.2.1.3.2 Procesamiento de muestras

Una vez las muestras llegaron al laboratorio fueron colocadas en placas Petri de 9 cm sobre papel filtro humedecido con agua destilada. Se dejaron reposar a las muestras por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cortes de 2 cm^2 en las muestras, luego fueron colocadas en alcohol etílico al 70% durante 60 segundos y por 3 segundos en hipoclorito al 3%. Posteriormente las muestras fragmentadas fueron colocadas en medio papa-dextrosa-agar (PDA) para proceder a incubarlas durante 1 semana a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad.

3.2.1.3.3 Caracterización macroscópica y microscópica

Para realizar la caracterización macroscópica se identificó el pigmento de la colonia, su forma y su textura.

La identificación microscópicas se realizó una tinción con azul de lactofenol, para observar se empleó un microscopio óptico con cámara fotográfica integrada.

3.2.2 Pruebas de antagonismo

3.2.2.1 *T. harzianum* y *P. infestans*

La capacidad antagonista *in vitro* de *T. harzianum* contra *P. infestans* se evidenció empleando el método de cultivo dual en medio PDA.

Se esterilizaron cajas Petri que posteriormente se emplearon para colocar dos segmentos de agar de 1 cm con cultivo a 7 cm de distancia, en el primer extremo se colocó el disco que contenía micelio de *P. infestans* mientras que en el segundo extremo se colocó un disco con micelio de *T. harzianum*. En la caja testigo en un extremo se colocó un disco de agar con micelio del organismo patógeno.

Las cajas fueron rotuladas y colocadas en una estufa, se incubaron a 28 °C. El desarrollo de los microorganismos se evaluó al medir el crecimiento radial de las cepas cada 24 horas. Una vez se obtuvieron todos los datos se dedujo el porcentaje de inhibición.

3.2.2.2 *P. fluorescens* y *P. infestans*

La capacidad antagonista *in vitro* de *P. fluorescens* contra *P. infestans* se evidenció al sembrar en agar nutritivo los dos microorganismos. En una caja Petri con agar se sembró la bacteria por estriado, posteriormente se colocó un disco de agar con micelio del microorganismo patógeno en el centro de la caja. En la caja testigo en el centro se colocó un disco de agar con micelio del organismo patógeno.

Las cajas fueron rotuladas y colocadas en una estufa, se incubaron a 28 °C. El desarrollo de los microorganismos se evaluó al medir el crecimiento radial de *P. infestans* cada 24 horas. Una vez se obtuvieron todos los datos se dedujo el porcentaje de inhibición.

3.2.2.3 Prueba de inhibición simultánea

La capacidad antagónica *in vitro* de *T. harzianum* en combinación con *P. fluorescens* sobre *P. infestans*, se evidenció al sembrar a los tres organismos en una misma placa Petri. Primero en medio papa-dextrosa-agar se procedió a sembrar por estriado a *P. fluorescens*, en un extremo de la placa se colocó un disco de 1 cm de agar con micelio de *T. harzianum*, en el centro de la placa se inoculó un disco de 1 cm de agar con micelio *P. infestans*.

Las cajas fueron rotuladas y colocadas en una estufa, se incubaron a 28 °C. El desarrollo de los microorganismos se evaluó al medir el crecimiento radial de *P. infestans* y *T. harzianum* cada 24 horas. Una vez se obtuvieron todos los datos se dedujo el porcentaje de inhibición.

Las medidas en todos los tratamientos se dejaron de tomar una vez que las cajas testigo quedaron completamente cubiertas por el patógeno.

3.2.2.4 Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial.

En todas las 3 pruebas de antagonismo se obtuvo el porcentaje de inhibición de crecimiento radial -PICR, empleando la siguiente formula:

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

Donde:

- *R1* radio medido del patógeno en la caja testigo
- *R2* radio del patógeno medido cada 24 horas en la prueba antagónica

3.3 Diseño experimental

Como se mencionó anteriormente a *P. infestans* se le aplicó tres tratamientos diferentes:

- *Trichoderma harzianum*
- *Pseudomona fluorescens*
- *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens*

Se realizó tres repeticiones por cada tratamiento y se evaluó el valor del PICR, para saber si existieron diferencias significativas se realizó un análisis de varianza ANOVA y una comparación por el método de Tukey a un α 0.05, después de haber verificado la normalidad de los datos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Aislamiento e identificación de microorganismos

4.1.1.1 *Pseudomona fluorescens*

En la figura 12 se puede observar la cepa de *P. fluorescens* enviada por los laboratorios de Ciencias de la Vida de la UPS sede Quito.

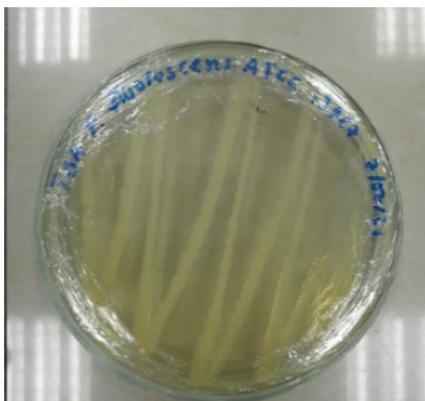


Figura 12: Cepa de *P.fluorescens* enviada por el Laboratorios de Ciencias de la Vida.

Fuente: *Elaboración propia*

Los cultivos bacterianos se identificaron como *P. fluorescens* de acuerdo con las pruebas bioquímicas, tinción de Gram y crecimiento a 42 °C que se muestran en la tabla a continuación:

Tabla 7: Pruebas bioquímicas y tinción de Gram realizada a *P. fluorescens*

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	-
Oxidasa	+
Catalasa	+
Crecimiento a 42° C	-

Fuente: *Elaboración propia.*

En la figura 13 se observa los resultados de la caracterización de *P. fluorescens*, en la primera imagen **a)** se muestra una fotografía de la tinción de Gram realizada la cual es negativa ya que las células se aprecian de color rosa. En la segunda imagen **b)** se muestra el resultado positivo de la prueba de la Oxidasa. En la imagen final **c)** se puede apreciar el resultado de la prueba de la Catalasa, en la izquierda se encuentra el blanco realizado en solución salina -negativo- y a la derecha la prueba realizada con peróxido de hidrógeno -positivo.

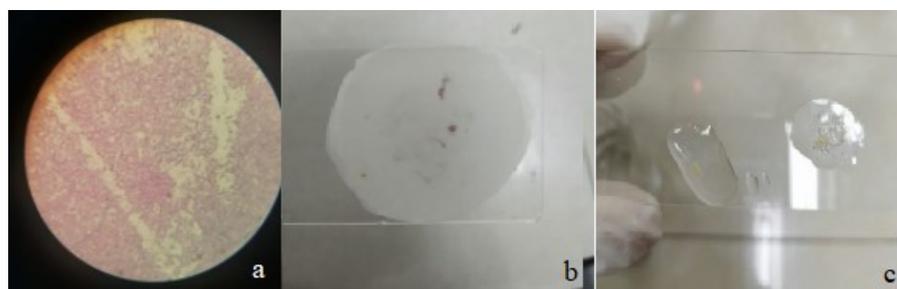


Figura 13: Resultados de la caracterización de *P. fluorescens*. **a)** Tinción de Gram (-); **b)** Prueba de la Oxidasa (+); **c)** Prueba de la Catalasa: En la izquierda se encuentra el blanco realizado en solución salina (-) y a la derecha la prueba realizada con peróxido de hidrógeno.

Fuente: Elaboración propia

4.1.1.2 *Trichoderma harzianum*

Después de 2 semanas de cultivo *in vitro* el hongo presento un color verde amarillento, además, se pudo visualizar que formó anillos concéntricos, los cuales tenían textura flocosa. En la figura 14 se puede observar a la cepa aislada de *T. harzianum*:



Figura 14: *T. harzianum* aislada de una planta de tomate

Fuente: *Elaboración propia*

La figura 15 muestra una imagen microscópica de la cepa aislada, la cual presenta conidióforos con fiálides que se asemejan a la forma de un vaso alargado, descripción que concuerda con lo mencionado por Romero & Dominguez, (2009).



Figura 15: *Imagen microscópica de T. harzianum, se pueden observar los conidióforos y fiálides en forma de botella.*

Fuente: *Elaboración propia.*

La figura 16 muestra imágenes microscópicas de *T. harzianum*, la cual presenta hifas septadas características propias de la especie.

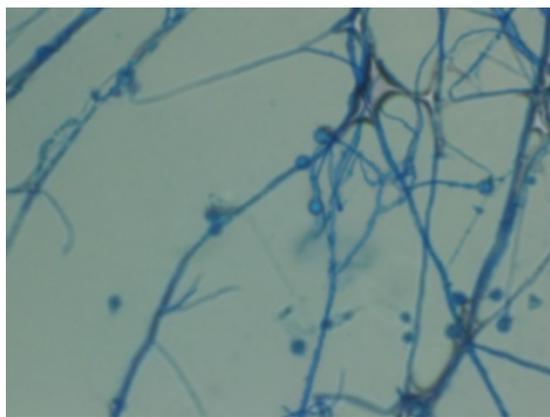


Figura 16: Imagen microscópica de *T. harzianum*, se pueden observar hifas septadas.

Fuente: Elaboración propia.

4.1.1.3 *Phytophthora infestans*

P. infestans fue cultivado en agar PDA, el mismo presentó pigmentación rosa y textura algodonosa. En el microscopio se pudo observar varias características propias del organismo como los esporangios, las hifas cenocíticas y esporangióforo; rasgos que concuerdan con lo detallado por Erwin & Ribeiro, (1998) en su trabajo “*Phytophthora* DISEASES WORLDWIDE”.

La identificación macroscópicas y microscópicas de *P. infestans* aislada de un cultivo con señales de infección se muestran en la figura 17 y 18.

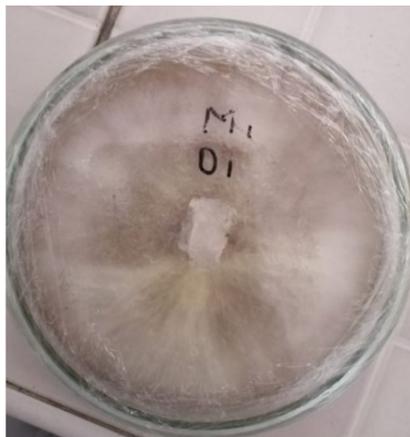


Figura 17: *P. infestans* aislado de un cultivo con signos de infección.

Fuente: *Elaboración propia*

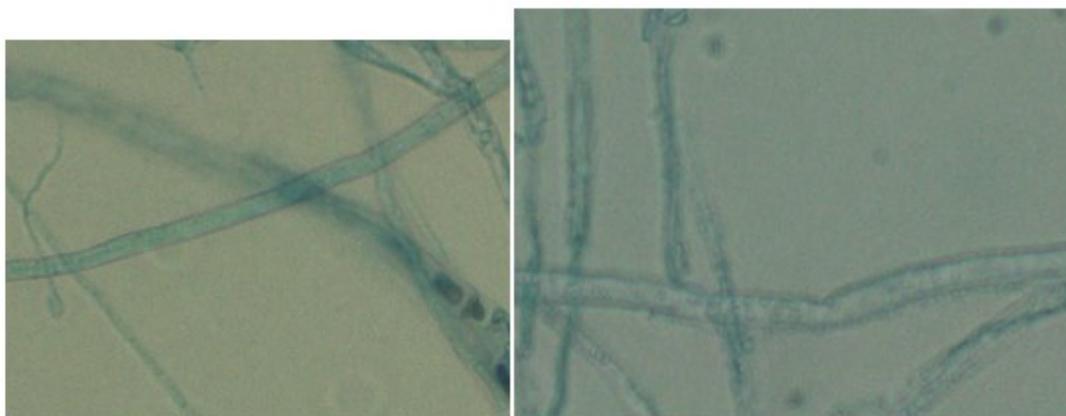


Figura 18: *Imágenes microscópicas de P. infestans, se pueden observar hifas cenocíticas.*

Fuente: *Elaboración propia*

4.1.2 Pruebas de antagonismo

4.1.2.1 Antagonismo entre *T. harzianum* y *P. infestans*

En la tabla 8 se encuentran los datos obtenidos cada 24 horas junto con el valor respectivo correspondiente al porcentaje de inhibición.

Tabla 8: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre *T. harzianum* y *P. infestans* cada 24 horas

HORAS	R1=PTOGENO TESTIGO	R2=PTOGENO PRUEBA			PICR		
		1	2	3	1	2	3
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0
24	1.4	1.2	1.3	1.3	14.3	7.1	7.1
48	2.5	2.3	2.2	2.3	8	12	8
72	4	2.7	2.5	2.6	32.5	37.50	35
96	5.6	2.8	2.6	2.6	50	53.6	53.6
120	6.9	2.8	2.7	2.7	59.4	60.9	60.9
144	7.5	2.9	2.8	2.7	61.3	62.7	64.0
168	8.5	2.9	2.8	2.8	65.9	67.1	67.1

Nota. Promedio de PICR: 66,7%

Fuente: Elaboración propia

Se observó antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* frente al patógeno. Las pruebas de antagonismo muestran que *T. harzianum* impide el desarrollo de *P. infestans* más de 60% al pasar más de 160 horas.

La figura 19 muestra el tratamiento de *T. harzianum* por triplicado después de 168 horas, mientras que la figura 20 muestra el testigo después de 168 horas en el cual fue inoculado *P. infestans*.



Figura 19: Inhibición *in vitro* de *T. harzianum* sobre *P. infestans* durante 168 horas

Fuente: Elaboración propia

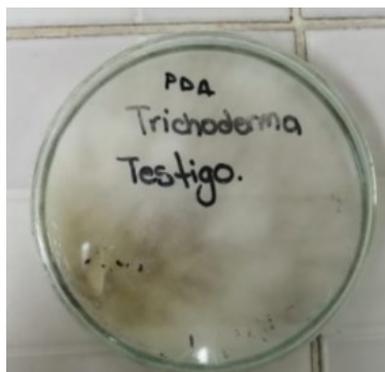


Figura 20: Testigo (*P. infestans*) por 168 horas.

Fuente: Elaboración propia

La figura a continuación muestra la relación existente entre el porcentaje de inhibición de *T. harzianum* y el tiempo. Se debe tomar en cuenta que se dejó de tomar datos en el momento en el cual la caja Petri testigo quedó completamente llena por el microorganismo patógeno.

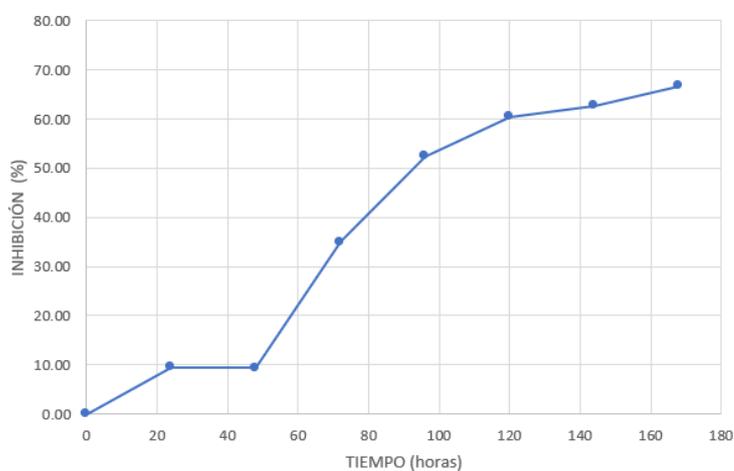


Figura 21: Porcentaje de inhibición de *T. harzianum* durante 168 horas.

Fuente: Elaboración propia

Según Guédez et al., (2012) la capacidad de inhibición de *T. harzianum* fue de tercer grado pues al pasar 160 horas *T. harzianum* cubrió más de 50% de la superficie de la caja.

4.1.2.2 Antagonismo entre *P. fluorescens* y *P. infestans*

En la tabla 9 se encuentran los datos obtenidos cada 24 horas junto con el valor respectivo correspondiente al PICR.

Tabla 9: PICR entre *P. fluorescens* y *P. infestans* cada 24 horas

HORAS	R1=PATOGENO TESTIGO	R2=PATOGENO PRUEBA			PICR		
		1	2	3	1	2	3
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0
24	1	0.7	0.8	0.8	30.0	20.0	20.0
48	1.9	0.9	1.2	1.1	52.63	37	42.1
72	2.8	1.1	1.5	1.3	60.71	46.43	53.6
96	3.9	1.4	2.3	1.5	64.1	41.0	61.5
120	4.2	1.6	2.4	1.8	61.9	42.9	57.1
144	4.5	1.9	2	2.1	57.8	55.6	53.3

Nota. Promedio de PICR: 55.6%

Fuente: Elaboración propia

La figura 22 muestra el antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* frente a *P. infestans* durante 144 horas a 28 °C en agar nutritivo.



Figura 22: Inhibición *in vitro* de *P. fluorescens* sobre *P. infestans* durante 144 horas.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 23 se muestra el testigo después de 144 horas en el cual fue inoculado *P. infestans*.



Figura 23: Testigo (*P. infestans*) por 144 horas.

Fuente: Elaboración propia

La figura 24 muestra la relación existente entre el porcentaje de inhibición de *P. fluorescens* y el tiempo. Se debe tomar en cuenta que se dejó de tomar datos en el momento en el cual la caja Petri testigo quedó completamente llena por el microorganismo patógeno.

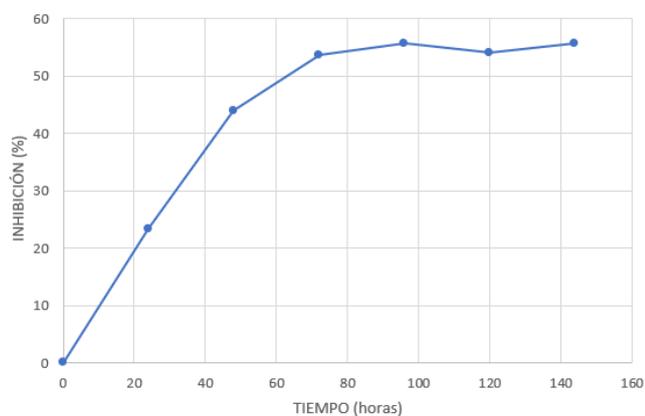


Figura 24: PICR de *P. fluorescens* durante 144 horas

Fuente: Elaboración propia

4.1.2.3 Antagonismo simultáneo

Se presentan a continuación en la tabla 10 los datos obtenidos del proceso inhibitorio de *P. fluorescens* y *T. harzianum* sobre el desarrollo de *P. infestans* al pasar 120 horas.

Tabla 10: *PICR radial entre T. harzianum, P. fluorescens y P. infestans cada 24 horas.*

HORAS	R1=PTOGENO TESTIGO			R2=PTOGENO PRUEBA			PICR		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0
24	1.1	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	36.4	45.5	45.5
48	2.5	1	0.8	1.1	1.1	1.1	60	68	56
72	3.5	1.3	1.1	1.4	1.4	1.4	62.86	68.57	60
96	3.6	1.6	1.5	1.6	1.6	1.6	55.6	58.3	55.6
120	4.5	1.9	1.8	1.9	1.9	1.9	57.8	60	57.8

Nota. Promedio de PICR: 58.53%

Fuente: *Elaboración propia*

P. fluorescens inhibe a los dos microorganismos, *T. harzianum* exhibió un mínimo desarrollo, además, *P. infestans* se inhibió en más de 57% pasadas 120 gracias a que se encontraba en presencia de los dos organismos antagonistas.

En la figura 25 se puede observar el tratamiento simultaneo por triplicado, mientras que la figura 26 muestra el testigo después de 120 horas en el cual fue inoculado *P. infestans*.



Figura 25: *Inhibición in vitro de P. fluorescens y T. harzianum sobre P. infestans durante 120 horas.*

Fuente: *Elaboración propia*

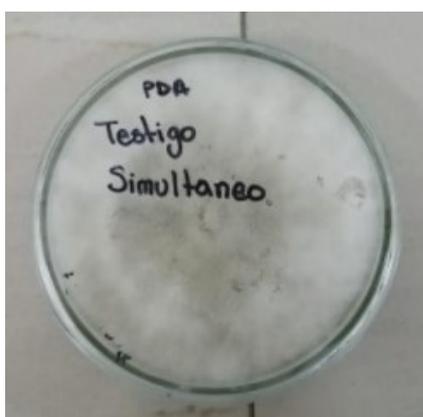


Figura 26: *Testigo (P. infestans) por 120 horas.*

Fuente: *Elaboración propia*

En la figura 27 se observa la relación que existe entre el porcentaje de inhibición del tratamiento simultáneo y el tiempo.

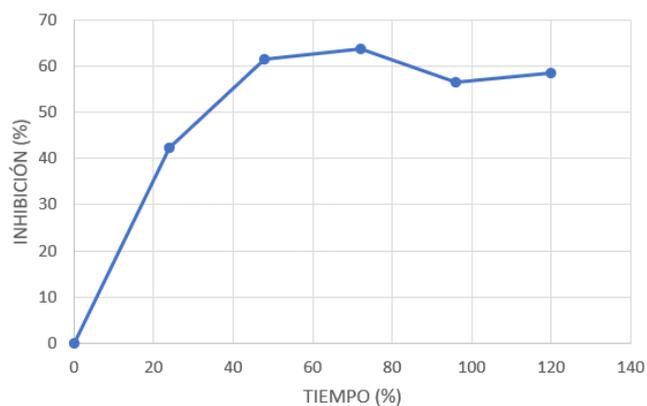


Figura 27: Porcentaje de inhibición durante 120 horas.

Fuente: *Elaboración propia*

A continuación, en la tabla 11 se presenta el valor final de la media del PICR por cada uno de los tratamientos *T. harzianum*, *P. fluorescens* y la prueba simultánea:

Tabla 11: *PICR final de cada prueba de inhibición*

Tratamiento	Promedio de PICR (%)	Tiempo (horas)
<i>T. harzianum</i>	66.7%	168
<i>P. fluorescens</i>	55.6%	144
Simultaneo	58.53%	120

Fuente: *Elaboración propia*

La figura a continuación muestra la diferencia que existe entre los PICR, de los tres tratamientos a los cuales fue sometido el fitopatógeno:

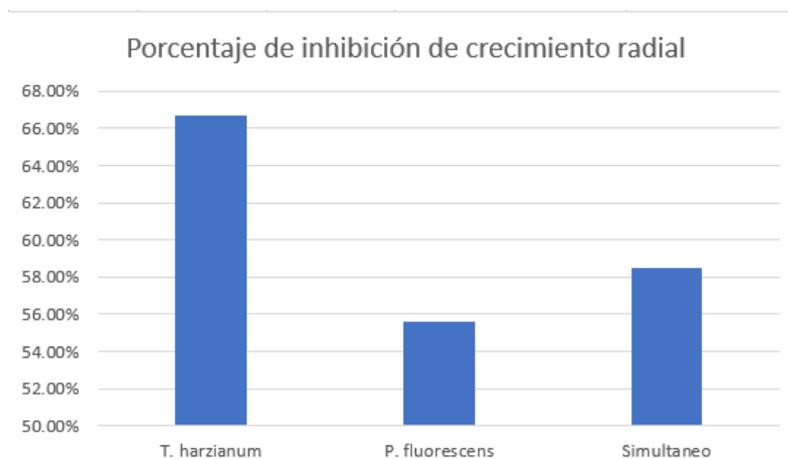


Figura 28: Gráfica que representa el promedio de PICR final de cada prueba de inhibición

Fuente: Elaboración propia

4.1.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico gratuito Minitab Statistical Software.

Ya que no se obtuvieron PICR iguales se procedió a realizar la prueba de Normalidad para comprobar que el diseño experimental a utilizar es Diseño Completamente al Azar (DCA).

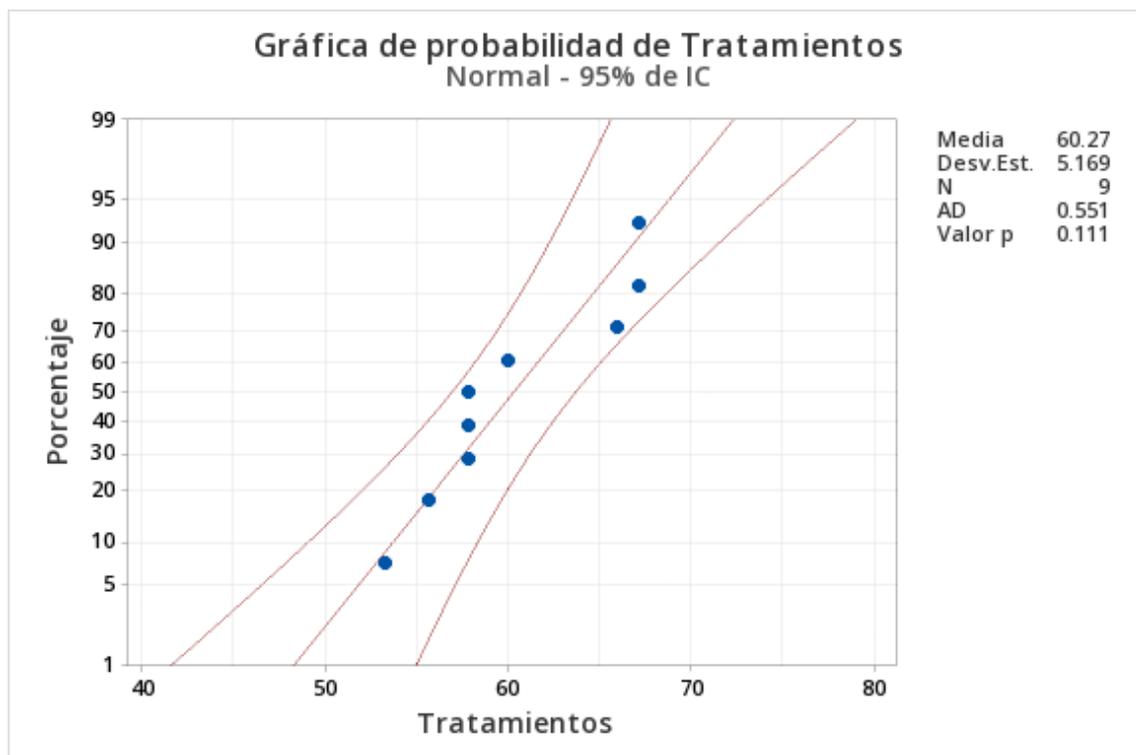


Figura 29: *Gráfica de Normalidad para el DCA*

Fuente: *Elaboración propia*

La figura 29 muestra que el valor de la significancia 0.05 es menor al valor obtenido en la prueba de Normalidad, razón por la cual se puede concluir que el supuesto de normalidad es correcto. Lo que muestra que se puede desarrollar el estadístico ANOVA del Diseño Completamente al Azar (DCA).

Las hipótesis establecidas son:

$$H_0 = u_1 = u_2 = u_3$$

$$H_a = u_1 \neq u_2 \neq u_3$$

El planteamiento de las hipótesis para el estadístico ANOVA se detalla a continuación:

Tabla 12: Planteamiento de hipótesis para ANOVA

Nivel de confianza	Significancia	H. nula	H. alternativa
95%	=0.05	Las medias son iguales	Las medias son diferentes

Fuente: *Elaboración propia*

Posteriormente, se realizó el estadístico ANOVA, el análisis se detalla en la tabla 13:

Tabla 13: ANOVA de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	199.45	99.723	41.80	0.000
Error	6	14.31	2.386		
Total	8	213.76			

Fuente: *Elaboración propia*

La tabla 13 muestra que se puede rechazar la hipótesis nula -no existe significancia en los porcentajes de inhibición del crecimiento radial- ya que el valor de la significancia 0.05 es mayor al valor de p, de esta manera se puede aceptar la hipótesis alternativa ya que si existe diferencia entre los porcentajes de inhibición.

Para identificar los posibles enfrentamientos que presenten significancia se procedió a realizar el Método de Tukey.

Tabla 14: Método de Tukey de las medias de los PICR

Factor	N	Media	Agrupación
<i>T. harzianum</i>	3	66.700	A
Simultaneo	3	58.533	B
<i>P. fluorescens</i>	3	55.57	B

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Fuente: *Elaboración propia*

La tabla 14 del Método de Tukey muestra que existe una significancia con *T. harzianum* -66.7%- con referencia a *P. fluorescens* -55.57%- y la prueba simultánea -58.53%- ya que estas dos últimas pruebas muestran un PICR menor al porcentaje de *T. harzianum*.

4.2 Discusión

La metodología empleado en este estudio fue la sugerida por Harris Valle, Bonilla & Palafox. (2020).

En la tabla 8 se pudo observar que el PICR entre *T. harzianum* y *P. infestans* es de 66.7%, valor similar al encontrado por Araque, (2014) quien al analizar la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp. sobre *P. infestans* obtuvo porcentajes de inhibición de crecimiento radial entre 50%-75%. El amplio espectro presentado por *Trichoderma* sp. posiblemente se deba a que el hongo presenta varios mecanismos para inhibir el crecimiento del fitopatógenos, entre ellos el resultante de la combinación de micoparasitismo y producción de metabolitos capaces de controlar un gran número de patógenos, además de la producción de enzimas y la antibiosis, lo cual puede contribuir a su amplio espectro de control (D. Infante & González, 2009).

De acuerdo a Asaka & Shoda, (1996); Trujillo et al., (2007) las cepas de *Pseudomonas fluorescens* son efectivas *in vitro* contra fitopatógenos. El porcentaje de inhibición de crecimiento radial obtenido por *P. fluorescens* en el presente trabajo de investigación -55.6%- supero el 50%, valor que se halla dentro de lo reportado por Flores et al., (2014) en su trabajo “SELECCIÓN, EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS NATIVOS CON POTENCIA ANTAGONISTA DE *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* PROMOTORES DEL CRECIMIENTO DE

TUBERCULILLOS DE PAPA *Solanum tuberosum L. in vitro*” donde menciona que el PICR muestra valores superiores al 50% al tener un promedio de crecimiento diario de 15 mm. Los valores obtenidos podrían estar relacionados con la capacidad que tiene el organismo de sintetizar metabolitos tóxicos y metabolitos antibióticos, además, Validov et al., (2005) señaló que varias especies de *Pseudomonas* cuentan con la característica de que pueden eliminar patógenos al producir 2, 4 dimethylphloroglucinol y pirrolnitrina.

La presencia de *P. fluorescens* en combinación con *T. harzianum* hace menos eficiente la inhibición de *P. infestans*, ya que como se pudo observar *T. harzianum* tiene un PICR superior cuando se encuentra actuando de manera independiente. Como se pudo observar en la tabla 11 *T. harzianum* presenta un PICR de 66.7%, valor superior al obtenido por *P. fluorescens* y en la prueba simultánea -55.6% y 58.53%-. Harris Valle, Bonilla & Palafox (2020) en su estudio “ANTAGONISMO DE MICROORGANISMOS NATIVOS SOBRE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary AISLADA DE *Solanum tuberosum L.*”, encontraron que se pueden utilizar varias especies de *Trichoderma* y *Pseudomona* para tratar el tizón tardío en papa, sin embargo, su trabajo muestra que los organismos antagonistas al ser inoculados individualmente son menos eficaces que al trabajar paralelamente ya que su tratamiento simultaneo reporto un PICR de 85%.

5 CONCLUSIONES

Después de culminar el presente trabajo de investigación se puede concluir lo siguiente:

- El uso de microorganismos benéficos principalmente especies de *Trichoderma* y *Pseudomona* se ha incrementado alrededor del mundo gracias a las diversas investigaciones realizadas y a los resultados positivos que generaron en la agricultura latinoamericana, dichas investigaciones mencionan la efectividad de los microorganismos en el control de plagas, así como su posible uso como potenciadores de crecimiento vegetal. Además, el uso de biocontroladores ayuda a generar una cultura agroecológica enfocada en conservar recursos como el suelo y agua, por lo cual son base indispensable para reducir el empleo de pesticidas con origen químico. A pesar de todo, la investigación de biocontroladores debe continuar fortaleciéndose para que estos sean rentables y eficientes para sus usuarios que principalmente son pequeños agricultores.

- En Ecuador, los agricultores tienen una actitud favorable hacia el uso de controladores biológicos para evitar el uso de agroquímicos. Esto se da gracias a que existen proyectos cuyo objetivo es cambiar la agricultura tradicional por una cultura agroecológica. El proyecto “Biocontrol para Sistemas Agrícolas Sustentables” inició en 2009 y lo ejecutó el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (IICA) y lo financió el Ministerio de Relaciones Exteriores y Comercio de Nueva Zelandia, el mismo ha confirmado la efectividad del empleo de controladores en la agricultura gracias al desarrollo de varias investigaciones realizadas en Ecuador.

- En la presente investigación se analizó la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* frente a *Phytophthora infestans* actuando de manera individual y de manera simultánea, el patógeno fue sometido a 3 tratamientos: *T. harzianum*, *P. fluorescens* y un tratamiento simultaneo, los cuales exhibieron un PICR superior al 50%, valores con los cuales posteriormente se procedió a realizar el estadístico ANOVA el cual reportó que si existe diferencia -significancia- entre los PICR. Además, para identificar los posibles enfrentamientos que presenten significancia se procedió a realizar el Método de Tukey, con el cual se determinó que existe una significancia con *T. harzianum* -66.7%- con referencia a *P. fluorescens* -55.57%- y la prueba simultánea -58.53%- ya que estas dos últimas presentan un PICR menor al que obtuvo de *T. harzianum*.

- *Trichoderma harzianum* después de 168 horas mostró un PICR sobre *Phytophthora infestans* de 66.67 %, resultado que coincidió con lo reportado en investigaciones previas, de igual manera, *Pseudomona fluorescens* exhibió un PICR de 55.6% después de 144 horas, valor que es similar al obtenido en investigaciones previas.

- Los dos microorganismos *T. harzianum* y *P. fluorescens* trabajando de manera simultánea después de 120 horas exhibieron un PICR sobre *Phytophthora infestans* de 58.52%, porcentaje que no coincide con reportes previos a la investigación ya que en varios documentos los organismos antagonistas cuando fueron evaluados individualmente resultaron ser menos efectivos que al trabajar paralelamente.

- Los resultados del trabajo apuntan a que *T. harzianum* y *P. fluorescens* no trabajaron sinérgicamente ya que la inhibición es superior cuando *T. harzianum* se encuentra trabajando de manera individual.

- Se observó que la disminución en el desarrollo se da cuando el organismo patógeno y el organismo antagonista se encuentran en contacto directo, sin embargo, se deberían realizar microcultivos con el objetivo de analizar la interacción inhibitoria que existe entre *T. harzianum* y *P. infestans*

- Los resultados presentados a través de la presente investigación sugieren que la utilización de especies de *T. harzianum* y *P. fluorescens* para evitar el desarrollo de *P. infestans* en cultivos de papa es una estrategia prometedora, ya que a partir de los mismos se podría dar la producción de biocontroladores a base de *T. harzianum* o *P. fluorescens*.

- Por lo expuesto se confirma la hipótesis de que *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* tienen capacidad antagonista semejante frente a *Phytophthora infestans* razón por la cual pueden ser un sustituto a plaguicidas químicos para tratar la enfermedad de tizón tardío.

6 RECOMENDACIONES

- Ya que los resultados de las pruebas *in vitro* fueron favorables, se propone seguir con el estudio *in situ* para determinar la capacidad antagonista frente a condiciones no controladas.
- Evaluar la capacidad antagonista de diferentes microorganismos propios de la microbiota de las solanáceas como *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*.
- Se recomienda la evaluación de nuevos patógenos relacionados con enfermedades que afecten la producción inicial de la papa para probar la actividad de *T. Harzianum* y *P. Fluorescens* -individual o de manera simultánea- y su posibilidad para emplearlos como controladores biológicos para tratar diferentes fitopatógenos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, I., & Remehue, I. (2008). *Manejo Integrado del Tizón Tardío y estrategias de control químico*. 64.
- Ahmad, J. S. (1987). Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. In *Phytopathology* (Vol. 77, Issue 2, p. 182). <https://doi.org/10.1094/phyto-77-182>
- Altamirano, M., Meneses, A., & Villeda, M. (2018). *Manejo de la enfermedad “tizón tardío”*. 506.
- Araque, G. (2014). *Evaluación in vitro de cepas nativas de hongos filamentosos como agentes controladores de Phytophthora infestans*.
- Arbito, M. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. *Ups*, 76.
- Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 62(11), 4081–4085.
- Badii, M., & Varela, S. (2015). *Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente | Badii | Cultura Científica y Tecnológica*. Cultura Científica y Tecnológica. <https://revistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/375>
- Borba, N. (2008). *La papa un alimento básico Posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica*. <http://www.rlc.fao.org/es/>
- Carrillo, Y. A., Gomez, M. I., Cotes, J. M., & Ñustez, C. (2010). Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio Effect of some essential oils on the growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary under laboratory conditions. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 245–253.
- Chet, I., & Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48(1), 37–43. <https://doi.org/10.1007/BF02825358>
- De Costa, D., & Erabadupitiya, H. (2005). An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*, 36(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2004.11.007>
- Erwin, D., & Ribeiro, O. (1998). *Phytophthora Diseases Worldwide*. *Plant Pathology*, 47(2), 224–225. <https://doi.org/10.1046/J.1365-3059.1998.0179A.X>
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M., & Candela Castillo, M. (2004). “*Trichoderma harzianum*” como biofungicida para el biocontrol de “*Phytophthora capsici*” en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 0(26), 35–45.
- Ezziyyani, Mohammed, Pérez Sánchez, C., Emilia Requena, M., Rubio, L., Emilia Candela, M., & E Candela, C. M. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-

- Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 69–78.
- FAO. (2002). Perspectivas a largo plazo El panorama de la agricultura. *Agricultura Mundial : Hacia Los Años 2015 / 2030 Informe Resumido*, 11–20.
- FAO. (2006). *Tesoro enterrado: la papa*. 2. <http://www.fao.org/ag/esp/revista/pdf/0611-1.pdf>
- FAO. (2008). *La papa, nutrición y alimentación*. <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/hojas.html>
- Fernández, R., & Suárez, C. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del Municipio Zona Bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 62(1), 4743–4748.
- Flores, A., Egúsqüiza, R., & Patiño, A. (2014). *Selección evaluación de microorganismos nativos con potencial antagonista de Rhizoctonia solani y Phytophthora infestans promotores del crecimiento de tuberculillos de papa Solanum tuberosum L. in vitro*. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/Theo/article/view/11935/10680>
- Forbes, G., & Pérez, W. (2008). *El tizón tardío de la papa*.
- Gavilanes, A. E. B. (2015). Control biológico del Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*) en papa (*Solanum tuberosum*) a través de consorcios microbianos. *Tesis Previa a La Obtención Del Grado de Magister En Agroecología Tropical Andina.*, 1–79. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7692/1/UPS-CT004553.pdf>
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44–49. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Harris Valle, C., Bonilla Pioquinto, E., & Palafox Rodríguez, M. (2020). Antagonismo de microorganismos nativos sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary aislada de *Solanum tuberosum* L. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 9(17), 23–43. <https://doi.org/10.23913/ciba.v9i17.96>
- Hernández, Y. (n.d.). *Pseudomona Fluorescens, un microorganismo amigo* | *Oró Espais Verds*. Retrieved August 23, 2021, from <https://www.oroespaisverds.com/pseudomona-fluorescens-un-microorganismo-amigo>
- ICA. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de la papa*.
- Infante, D. B., González, N., & Reyes, Y. (2002). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Estudios De Asia Y África*, 37(2), 14–21.
- Infante, D., & González, N. (2009). *Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

- INIAP. (2002). *El cultivo de la papa en Ecuador*.
- INIAP. (2012). *El Cultivo de la PAPA en Ecuador*. <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>
- INIAP. (2017). *Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades del cultivo de papa*.
- Jaramillo, C., & Gabriela, V. (2014). Evaluación in vitro de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. *Undefined*.
- Lozoya, H., Coyote, M. H., Ferrera, R., & Lara, M. (2005). Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. In *Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia* (Vol. 40).
- Mancero, L. (2008). Estudio de la Cadena de Papa en el Ecuador. *Fao-Esa / Cip*, 28.
- Martinez, H., Osorio, E., Estrada, B., López, J., & Varela, S. (2017). *Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de Trichoderma spp.* https://www.researchgate.net/publication/319250943_CONTROL_BIOLOGICO_DE_FITOPATOGENOS_MEDIANTE_AISLADOS_DE_Trichoderma_spp_BIOLÓGICAL_CONTROL_OF_PHYTOPATHOGENS_THROUGH_Trichoderma_spp_ISOLATES
- Mora, J., Velasco, C., Mejía, A., & Flores, R. (2018). *Midiendo pérdidas en la cadena de papa en Ecuador*. 5–24.
- Pérez Álvarez, S., Coto, O., Ii, A., Echemendía, M., Iii, P., Ávila, G., & Iv, Q. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Rev. Protección Veg*, 30(3), 225–234.
- Pérez, N. (2004). Manejo ecológico de plagas. In *Transformando el campo cubano*. <https://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecoplagas/Bibliografia.pdf>
- Pinzón, A. (2019). *Pseudomonas*. *Acta Médica Colombiana*, 44. www.the-icsp.org
- Román, M., & Hurtado, G. (2002). *Guía Técnica de cultivo de papa*.
- Romero-Arenas, O., Huerta, M., & Dominguez, F. (2008). *Características de Trichoderma harzianum, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200015
- Romero Montes, G., Lozoya Saldaña, H., Mora Aguilera, G., Fernández Pavia, S., & Grünwald, N. J. (2012). *Rendimiento de papa en función de epidemia por tizón tardío (Phytophthora infestans Mont. de Bary)*.
- Romero, O., & Dominguez, F. (2009). *Características de Trichoderma harzianum, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200015
- Ronnie, E., I□, G., Plasencia Márquez, O., Hernández-Rodríguez, A., De, Y., Fe Pérez, L., Benedicto, :, & Coca, M. (2017). Artículo Original. In *Rev. Protección Veg* (Vol.

- 32, Issue 3).
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica*.
- Tello, C., & INIAP. (2008). *Identificación de aspectos epidemiológicos relacionados con la Expresión de resistencia de la papa (Solanum tuberosum L.) para poblaciones de (Phytophthora infestans) predominantes de 3 localidades de la sierra ecuatoriana*. <https://books.google.com.ec/books?id=eoszAQAAMAAJ&pg=PA74&dq=Guía+para+el+manejo+y+toma+de+datos+de+ensayos+de+mejoramiento+de+papa&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjsLrql5LuAhXpwVkKHV8qBqkQ6AEwAHoECAAQAg#v=onepage&q=Guía+para+el+manejo+y+toma+de+datos+de+ensayos+d>
- Torres, H. (2002). *Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú*.
- Torres, L., Taípe, A., & Andrade-Piedra, J. (2011). *Manejo de lancha – Inventario de Tecnologías e Información para el Cultivo de Papa en Ecuador*. <https://cipotato.org/papaenecuador/manejo-de-lancha/#1508211422397-4af2e7a7-5143>
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., & Heydrich, M. (2007). Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1), 41–46.
- Tzortzakis, N. G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.09.002>
- Unda, J., Suquillo, G., Sevillano, C., Pumisacho, M., Ochoa, J., & Barrera, V. (2013). *“Diagnostico del Manejo del tizón tardío en la Provincia del Carchi”, Memorias del V Congreso Ecuatoriano de la Papa y, IV congreso Iberoamericano Sobre Investigación y Desarrollo en Papa*.
- Validov, S., Mavrodi, O., La Fuente, L. de, Boronin, A., Weller, D., Thomashow, L., & Mavrodi, D. (2005). Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 242(2), 249–256. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.11.013>
- Villegas, M. (2005). *Trichoderma pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. | Orius Biotech | Soluciones para la producción agropecuaria sostenible*. https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Características_generales_y_su_potencial_biológico_en_la_agricultura_sostenible.
- Wisniewski, M., & Wilson, C. (2019). Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Recent Advances. *HortScience*, 27(2), 94–98. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.2.94>
- Ximhai, R., Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Jesús, J., Camacho-Báez, R., & Lorena Vázquez-Montoya, E. (2012). *Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas*. 8, 17–29.
- Yépez, L., & Pumisacho, M. (2016). *Validación de estrategias de manejo del Tizón Tardío (Phytophthora infestans) de la papa, en tres variedades, Pillaro, 2016. August*.

Zhio, T. (2011). *La papa: La Papa: Taxonomia y Nombres Comunes*.
<https://zhiotm.blogspot.com/2011/04/la-papa-taxonomia-y-nombres-comunes.html>

8 ANEXOS

Anexo 1: *Proceso de desinfección de hojas con síntomas de infección*



Figura 30: *Hojas con síntomas de infección en proceso de desinfección.*

Fuente: *Elaboración propia*

Anexo 2: *Gráficos que indican como se encontraban rotuladas las cajas Petri.*

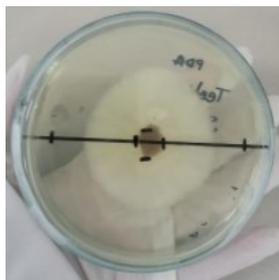


Figura 31: *Cajas Petri después de 48 horas de ser inoculada, la caja se encuentra rotulada en la parte posterior.*

Fuente: *Elaboración propia*



Figura 32: *Cajas Petri después de 168 horas de ser inoculada, la caja se encuentra rotulada en la parte posterior.*

Fuente: *Elaboración propia*

Anexo 3: Gráficos de las pruebas de antagonismo tomadas cada 24 horas

0 horas



Figura 33: Prueba de antagonismo: Testigo y tratamiento Simultaneo por triplicado al inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 34: Prueba de antagonismo: Testigo y tratamiento por triplicado con *P. Fluorescens* al inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 35: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *T. harzianum* al inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

24 horas

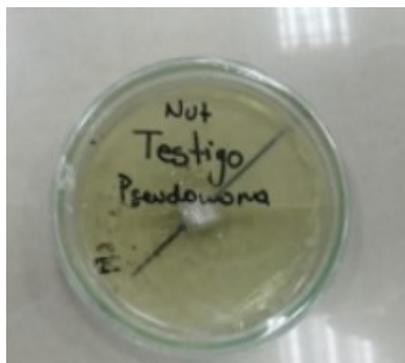


Figura 36: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *P. fluorescens* después de 24 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

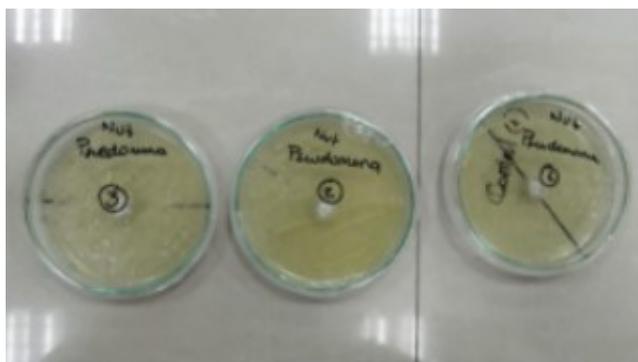


Figura 37: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *P. fluorescens* después de 24 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

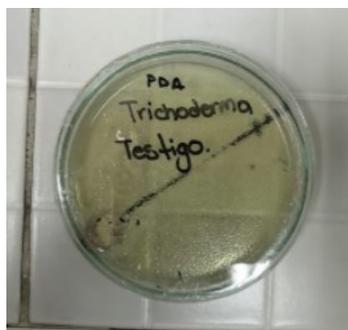


Figura 38: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *T. harzianum* después de 24 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 39: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 24 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

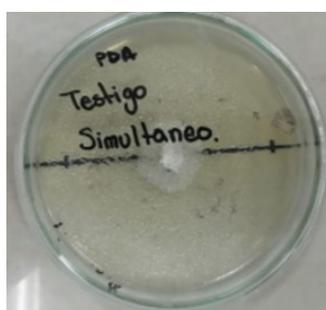


Figura 40: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 24 horas del inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 41: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 24 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

48 horas



Figura 42: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *T. harzianum* después de 48 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 43: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 24 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 44: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *P. Fluorescens* después de 48 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 45: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *P. Fluorescens* después de 48 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

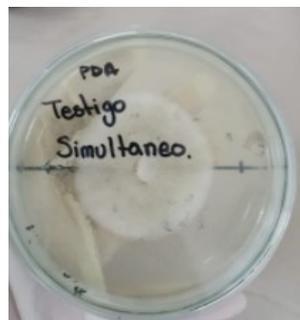


Figura 46: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 48 horas del inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 47: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 48 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

72 horas



Figura 48: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *T. harzianum* después de 72 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 49: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 72 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

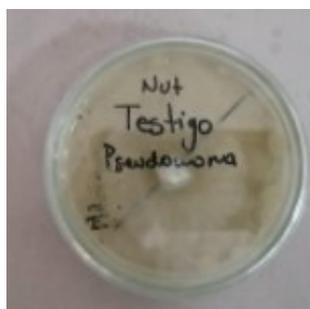


Figura 50: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *P. Fluorescens* después de 72 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 51: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *P. Fluorescens* después de 72 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

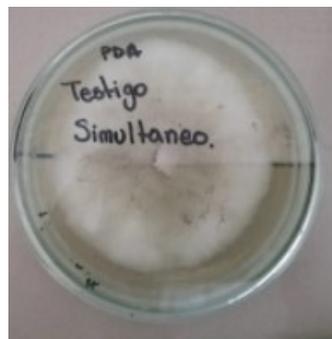


Figura 52: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 72 horas del inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 53: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 72 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

96 horas



Figura 54: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *T. harzianum* después de 96 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 55: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 96 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

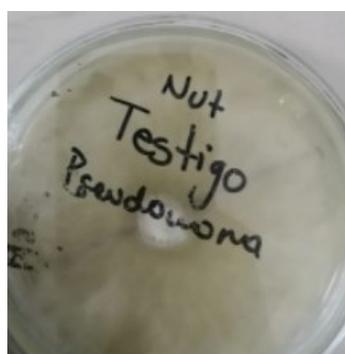


Figura 56: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *P. Fluorescens* después de 96 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 57: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *P. Fluorescens* después de 96 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

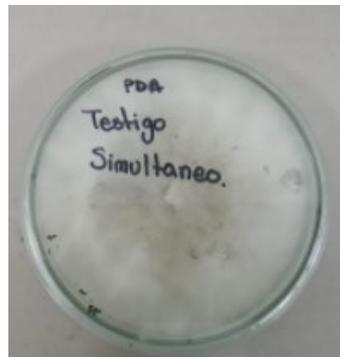


Figura 58: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 96 horas del inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 59: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 96 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

120 horas

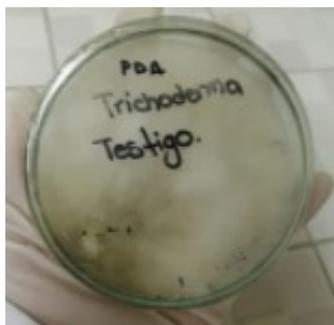


Figura 60: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *T. harzianum* después de 120 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 61: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 120 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

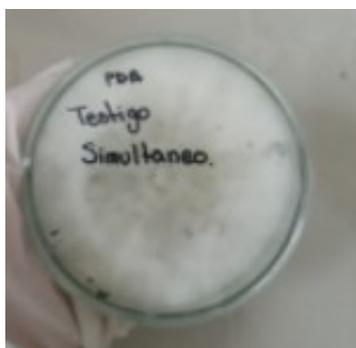


Figura 62: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 120 horas del inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 63: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 120 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 64: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *P. Fluorescens* después de 120 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 65: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *P. Fluorescens* después de 120 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

144 horas



Figura 66: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *T. harzianum* después de 144 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 67: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 144 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 68: Prueba de antagonismo: Testigo del tratamiento con *P. Fluorescens* después de 144 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 69: Prueba de antagonismo: Tratamiento por triplicado con *P. Fluorescens* después de 144 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 70: Prueba de antagonismo: Testigo de la prueba simultanea después de 144 horas del inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia



Figura 71: Prueba de antagonismo: Tratamiento simultaneo después de 144 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia

168 horas



Figura 72: Prueba de antagonismo: Tratamiento con *T. harzianum* después de 168 horas de inicio de la prueba.

Fuente: Elaboración propia