UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA ECUADOR

POSGRADOS

MAESTRÍA EN

RECURSOS NATURALES RENOVABLES CON MENCIÓN EN REMEDIACIÓN Y RESTAURACIÓN

RPC-SO-17-NO.363-2020

OPCIÓN DE TITULACIÓN:

PROYECTO DE TITULACIÓN CON COMPONENTES DE INVESTIGACIÓN APLICADA Y/O DE DESARROLLO

TEMA:

PRODUCCIÓN Y VALORACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES FITOPATÓGENAS

AUTOR(ES)

MAYRA ALEXANDRA LEÓN TORRES

DIRECTOR:

MANUEL ERNESTO DELGADO FÉRNANDEZ

CUENCA – ECUADOR

2022

Autora:

Mayra Alexandra León Torres
Ingeniera Agropecuaria Industrial.
Candidata a Magíster en Recursos Naturales Renovables con Mención en Remediación y Restauración por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Cuenca.
mleonto@est.ups.edu.ec

Dirigido por:

Manuel Ernesto Delgado Fernández
Licenciado en Ciencias de la Educación en la Especialidad de Química, Biología y Ciencias Naturales.
Magister en Tecnologías para el Aprovechamiento de Recursos Naturales No Tradicionales.
Dottore di Ricerca in Ecologia Sperimentale e Geobotanica.
mdelgado@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS
2022 © Universidad Politécnica Salesiana.
CUENCA – ECUADOR – SUDAMÉRICA
MAYRA ALEXANDRA LEÓN TORRES
Producción y valoración de un biofungicida para el control biológico de enfermedades fitopatógenas

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, mis compañeros fieles en cada paso que doy.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme coincidir con personas maravillosas que siempre llevaré en corazón.

Tabla de Contenido

Resumen 8
Abstract 9
1. Introducción 10
2. Determinación del Problema 12
3. Marco teórico referencial 13
3.1. El cultivo de papa (Solanum *tuberosum*) en Ecuador 13
3.1.1. Problemas Fitosanitarios 13
3.1.2. Hongos antagonistas 14
3.1.3. Bioformulaciones 18
4. Materiales y métodos 20
4.1 Ubicación del estudio: 20
4.2 Material biológico e identificación de fitopatógenos: 20
4.3 Evaluación de la actividad antagonista 21
4.4 Formulación del biofungicida 23
4.5 Control de calidad del biofungicida 24
4.5.1 Determinación del porcentaje de germinación de conidios 24
4.5.2 Determinación de la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) 24
4.5.3 Determinación de la concentración de conidios mediante recuento en cámara de neubauer. 25
4.5.4 Porcentaje de pureza del biofungicida 26
4.5.5 Valores de pH en el biofungicida 27
4.6 Prueba de antagonismo Biofungicida a tres concentraciones diferentes vs Phytophthora *infestans* 28
4.6.1 Análisis Estadístico 28
5. Resultados y discusión 29
5.1 Ubicación del estudio 29
5.2 Ubicación taxonómica de los hongos asociados a la enfermedad. 30
5.3 Resultados de las pruebas de antagonismo 33

5.4 Formulación de Biofungicida 39
5.5 Pruebas microbiológicas para el control de la calidad. 40
5.5.1 Determinación del porcentaje de germinación de conidios 40
5.5.2 Determinación de la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) 42
5.5.3 Determinación de la concentración de conidios mediante recuento en cámara de neubauer. 43
5.5.4 Determinación del porcentaje de pureza. 44
5.5.5 Determinación del pH 45
5.6 Prueba de antagonismo Biofungicida a tres concentraciones diferentes vs *Phytophthora infestans* 46
5.7 Análisis Estadístico 49
6. Conclusiones 52
Referencias 53

Producción y valoración de un biofungicida para el control biológico de enfermedades fitopatógenas

Autor:

Mayra Alexandra León Torres

Resumen

El uso de agroquímicos en la producción agrícola ha generado resistencia de los fitopatógenos, alteración del suelo, así como también el deterioro de la salud de los seres vivos; en el presente estudio se formuló un biofungicida, para lo cual se inició con la toma de muestras de un cultivo de papa, ubicado en el cantón El Tambo de la provincia de Cañar, se aislaron las siguientes cepas fúngicas: *Phytophthora infestans, Cladosporium* sp. y *Epicoccum* sp., con las cuales se realizaron pruebas de antagonismo frente a *Trichoderma harzianum;* la calidad de la bioformulación se valoró con base en la metodología establecida por el INIAP; para determinar la concentración del bioformulado en el laboratorio, se consideran cuatro tratamientos con tres repeticiones frente a P. *infestans,* se evaluó bajo un Diseño Completo al Azar y una prueba de Tuckey al 0.5%; los resultados de la prueba de antagonismo según la escala de Bell, T. *harzianum* frente a P. *infestans* corresponde a la clase II, *Cladosporium* sp. a la clase I y *Epicoccum* sp. a la clase II, la concentración del bioformulado fue de 1 x 10^9 conidios/ml, el cual cumplió con las pruebas de calidad; según Tuckey los ensayos presentaron diferencia, donde la concentración más efectiva fue 5 x 10^6 conidios/ml la cual mostró un PICR de 94.12%; adicional a las pruebas de calidad, el bioformulado se conservó refrigerado a 4°C durante un mes, donde finalmente mantuvo la concentración de 9,47 x 10^8 conidios/ml con una geminación del 96,86%.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, antagonismo, biofungicida, fitopatógenos, control biológico.

Abstract

The use of agrochemicals in agricultural production has generated resistance of phytopathogens, soil alteration, as well as the deterioration of the health of living beings; in the present study a biofungicide was formulated, for which began with the sampling of a potato crop, located in the canton El Tambo of the province of Cañar, the following fungal strains were isolated*: Phytophthora infestans*, *Cladosporium* sp. and *Epicoccum* sp, with which antagonism tests were carried out against *Trichoderma harzianum*; the quality of the bioformulation was evaluated based on the methodology established by INIAP; to determine the concentration of the bioformulation in the laboratory, four treatments were considered with three repetitions against P. infestans, it was evaluated under a Complete Randomized Design and a Tuckey test at 0.5%; the results of the antagonism test according to the Bell scale, T*. harzianum* against P*. infestans* corresponds to class II, *Cladosporium* sp. to class I and *Epicoccum* sp. to class II, the concentration of the bioformulation was 1 x 10^9 conidia/ml, which complied with the quality tests; according to Tuckey the tests showed a difference, where the most effective concentration was 5 x 10^6 conidia/ml which showed a PICR of 94. 12%; in addition to the quality tests, the bioformulation was kept refrigerated at 4°C for one month, where it finally maintained the concentration of 9.47 x 10^8 conidia/ml with a gemination of 96.86%.

Key words: *Trichoderma harzianum*, antagonism, biofungicide, phytopathogens, biological control.

1. Introducción

La demanda de productos libres de residuos agrotóxicos ha motivado la búsqueda de alternativas ambientalmente amigables, económicas y sostenibles para el control fitopatógeno, en este ámbito, se demanda obtener producciones de calidad que obedecen al interés mundial de consumir productos denominados verdes, sin olvidar la necesidad de un margen razonable de rentabilidad utilizando tecnologías ecológicas (Encalada, 2016).

El uso de agentes biológicos para el control de fitopatógenos en agricultura sostenible recae de manera exigente sobre investigaciones relevantes en cultivos económicamente importantes (Castro et al., 2015). En este contexto, los hongos con cualidades antagónicas se presentan como alternativa para el control biológico de fitopatógenos, varios estudios realizados con el género *Trichoderma* confirman su potencial antagónico frente a numerosos agentes causantes de enfermedades en varios cultivos, empleando diferentes mecanismos de acción, al mismo tiempo, que estimula el sistema inmunológico de la planta mediante el aumento de la actividad enzimática en la misma (Martínez et al., 2013), (Companioni González et al., 2019); además, funciona como promotor de crecimiento debido a su capacidad de producir fitohormonas ya que favorece la disponibilidad de fosfatos y minerales requeridos para el metabolismo de las plantas, mejorando así el rendimiento de los cultivos y la calidad de los frutos (Ruiz-Cisneros et al., 2018).

Los bioformulados se forman a partir de microorganismos beneficiosos o sus metabolitos (Mahoma et al., 2022), éstos productos son cada vez más difundidos y (Ritika & Utpal, 2014) se promocionan como alternativa al uso de agroquímicos (Glare et al., 2012) que como es sabido son ecológicamente inaceptables, debido a sus efectos contaminantes en el suelo, agua y aire, formando parte de la cadena alimentaria y por ende en contacto con todos los seres vivos ocasionándoles daños a la salud (Ritika & Utpal, 2014), como indica (Ribas, 2010) en un estudio realizado

con la descendencia de los soldados de la guerra de Vietnam (1961-1972) que estuvieron expuesto al herbicida denominado agente naranja y que estructuralmente está conformado por dioxinas y compuestos clorados del ácido fenoxiacético, presentaron afecciones a los sistemas vascular, nervioso central, óseo y malformaciones, también generaron detrimento en los ecosistemas; de igual modo (Wright & Welbourn, 2002) manifiesta que en 1980 se descubrió la presencia de residuos de compuestos clorados y bifenilos policlorados en los animales de las zonas árticas, éstos fueron transportados a través de la atmósfera ya que en éstas regiones no se utilizaban pesticidas, constituyendo la fuente de contaminación no puntual más importante del agua subterránea (Márquez, 2021), a esto se suma el hecho de que son bioacumulables (Compuestos Orgánicos Persistentes, COPs) lo que los vuelve altamente tóxicos; en cuanto al suelo, son los microorganismos y su actividad los que presentan alteraciones que afectan la fertilidad y productividad del mismo, la distribución y persistencia de los pesticidas va a depender de sus propiedades físicas y químicas, y las condiciones climáticas (Cycoń et al., 2010); (Hernández-Soriano et al., 2007); por tanto el presente trabajo de investigación pretende obtener un biofungicida para el control de enfermedades fitopatógenas que permita disminuir el uso de agroquímicos en la producción de alimentos; para ello debe cumplir con los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos requeridos.

2. Determinación del Problema

Las enfermedades fitopatógenas son de gran interés para los seres humanos ya que dependemos de los productos de la tierra, por tanto, éstas inciden de forma directa entre una vida saludable y la muerte por hambruna (Agrios, 1998). Por el año de 1840 el hongo fitopatógeno P. *infestans* fue causante de la denominada hambruna irlandesa, provocando la muerte de aproximadamente 250 000 personas por inanición (Grünwald & Flier, 2005); como consecuencia se produce el uso abusivo de pesticidas en la producción de alimentos, causando daños al medio ambiente, entre los cuales tenemos: la resistencia desarrollada por los fitopatógenos, salinización de los suelos, inhibición de polinizadores y comunidades microbianas benéficas del suelo, así como también el deterioro de la salud de todos los seres vivos(Encalada, 2016); (Morales-Mora et al., 2020a).

El cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) constituye uno de los cultivos más importantes en Ecuador (Racines et al., 2021); mundialmente ocupa el tercer lugar luego de los cereales y su producción podría duplicarse en los siguientes 10 años y de esa manera contribuir positivamente con la seguridad alimentaria de los pueblos (FAO, 2022); (Majeed et al., 2022), por otra parte, la lancha o tizón tardío (P. *infestans*) es la enfermedad más importante del cultivo debido a su efecto devastador si no se ejecuta un tratamiento efectivo (Cuesta & Monteros, 2020).

Los hongos antagonistas inhiben los efectos negativos de los fitopatógenos (Vinale et al., 2008) , además estimulan el sistema inmunológico de la planta previo a una infección (Kamble et al., 2021; Majeed et al., 2022; Vinale et al., 2008). Cuesta y Rivadeneira (2021) determinan que los biofungicidas se presentan como una alternativa ecológica a la utilización de agroquímicos; por ello en la presente investigación se propone la formulación de un biofungicida a base de organismos antagonistas.

3. Marco teórico referencial

En este apartado se presentan conceptos e investigaciones relacionadas con el objetivo de la investigación, además se da a conocer la importancia del cultivo de la papa, los principales problemas fitosanitarios, los hongos antagonistas y las bioformulaciones.

3.1. El cultivo de papa (S. *tuberosum*) en Ecuador

En el Ecuador el cultivo de papa se desarrolla en la zona andina en el rango de altitud que va desde los 2.800 msnm hasta los 3.500 msnm (Cuesta & Monteros, 2020), según datos del INEC en el año 2020 se obtuvo un rendimiento de 14 ton/ha, donde la mayor producción se ubicó en la zona norte del país en las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua con un 56.7% de la producción nacional, de lo cual el 10% es destinada a la industria alimentaria (Cuesta & Monteros, 2020; INEC, 2020).

3.1.1. Problemas Fitosanitarios

Las principales plagas y enfermedades que afectan al cultivo de papa son: lancha tardía (P. *infestans*), rhizoctonia (*Rhizoctonia solani*), nematodos (*Globodera pallida*), sarna (*Spongospora subterránea*), gusano blanco (*Premnotrypes vorax*) (Cuesta & Monteros, 2020; Racines et al., 2021); el nivel de daño producido a las plantas depende de las condiciones ambientales favorables para dicho agente patógeno, por ejemplo en la tabla 1 se presenta las condiciones que favorecen el desarrollo del P. *infestans* (Agrios, 1998; Manawasinghe et al., 2021), la principal manifestación de este patógeno se presenta en los bordes de las hojas como manchas necróticas (Arora et al., 2014), pudiendo ocasionar importantes pérdidas económicas (Majeed et al., 2022).

Tabla 1. Condiciones que favorecen el desarrollo de P. *infestans*

Humedad relativa elevada.
Temperatura entre 12°C a 21°C.
Días lluviosos, neblina, encharcamientos
Utilización de semilla infectada.
Siembras estrechas y continuas

Fuente: (Cuesta & Monteros, 2020)

Actualmente la aplicación de agroquímicos mantiene controlado el tizón tardío, sin embargo en el transcurso del tiempo ocasiona resistencia en los fitopatógenos (Cuesta & Monteros, 2020; Mahoma et al., 2022; Majeed et al., 2022), cabe mencionar que además provocan problemas de salud en las personas por exposición a principios activos como el clorotalonil y mancozeb; entre los problemas de salud que se presentan está la dermatitis e irritación de las mucosas (Márquez, 2021), estos agentes xenobióticos tienen la capacidad de acumularse en el suelo, con una alta probabilidad de causar malformaciones y cáncer por una exposición crónica (Mena-Espino & Couoh-Uicab, 2015).

3.1.2. Hongos antagonistas

Los hongos antagonistas suprimen el crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos, el 90 % de bioformulados se los ha realizado a base del género *Trichoderma* (Adnan et al., 2019; Cruzat G. & Ionannidis N., 2008; Cubillos, 2014; Dukare et al., 2019), las especies más importantes en el área agrícola son T. *harzianum,* T. *viride,* T. *Koningii y* T. *hamatum* (Companioni González et al., 2019); además, mediante la interacción planta-hongo antagónico, los hongos antagonistas pueden estimular el sistema inmunológico de las plantas(Companioni González et al., 2019), mediante la producción de proteínas con función enzimática, homólogos de proteína, oligosacáridos, otras sustancias de bajo peso molecular que son liberadas por la planta al momento de un ataque (Centro de educación y tecnología, 2004).

El género *Trichoderma* se clasificó en 1996 (Adnan et al., 2019), actualmente se sabe que existen más de 100 especies (Companioni González et al., 2019).

Tabla 2. Clasificación taxonómica

Categoría	Clasificación
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	*Trichoderma*

Fuente: (Adnan et al., 2019).

Tabla 3. Capacidad controladora de *Trichoderma* spp. sobre diferentes fitopatógenos en distintos cultivos.

Especie Vegetal	Tipo de Aplicación	Lugar de la investigación	Variable evaluada
Reygrass (*Lolium perenne*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*)	Drench	Campo	Promueve el crecimiento, reduce hasta un 40% el requerimiento de fertilizante nitrogenado.(Acurio Vázconez & España Imbaquingo, 2017)
Banano (*Musa AAA*)	Foliar	Casa de cultivo	Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis Morelet),* eficacia antagónica del 68,8%.(Castro et al., 2015)
Fresa (*Fragaria vesca)*	Técnica dual en medio PDA	In-vitro	Ejerce poder antagónico sobre: *Colletotrichum* sp, *Pestalotiopsis* sp, *Alternaria* sp, *Rhizoctonia* sp *y Curvularia* sp. No consigue inhibir a R. *stolonifer.*(Morales-Mora et al., 2020b)

Vid (*Vitis vinífera L.)*	Foliar	Campo	Mildiu de la vid (*Plasmopara vitícola),* protección contra la enfermedad de hasta 82,9%. (Kamble et al., 2021)
Tomate (*Solanum lycopersicum)*	Directo al sustrato de semillero	Invernadero/semillero	Previene la aparición de: *Phytophthora, Fusarium, Rhizoctonia y Pythium* hasta en un 88,5%. Incrementa en 15% el contenido de materia seca.(Encalada, 2016)
	Al sustrato	Invernadero/macetas	Reduce la gravedad de la enfermedad causada por R. *solanacearum* y su población en el suelo. Mejora significativamente el crecimiento de las plantas.(L. Yan & Khan, 2021)
	Pozo de agar	In-vitro	Fuerte inhibición contra R. *solanacearum.*(L. Yan & Khan, 2021)
	Al sustrato	Invernadero/macetas	Controla eficazmente nematodos, 74,59%.(Y. Yan et al., 2021)
*Ananas comosus (*Piña)	Aspersión	Campo	Promueve el crecimiento y disminuye la incidencia de enfermedades.(Sabando-Ávila et al., 2017)
Phaseolus vulgaris (Fréjol)	Suelo	Invernadero	Controla podredumbre de la raíz (F. *solani y* R. *solani),* reduce la severidad de la enfermedad, mejora los parámetros de crecimiento.(Ketta & Hewedy, 2021)
	Técnica dual en medio PDA	In-vitro	Eficaz contra Podredumbre de la raíz (F. *solani y* R. *solani).*(Ketta & Hewedy, 2021)
	impregnación	Semilla	Protección contra la podredumbre de la raíz (F. *solani* y R. *solani*).(Ketta & Hewedy, 2021)
Pisum sativum (Arveja)	Suelo	Invernadero	Controla podredumbre de la raíz (F. *solani y* R. *solani),* reduce la severidad de la enfermedad, mejora los parámetros de crecimiento.(Ketta & Hewedy, 2021)
	Técnica dual en medio PDA	In-vitro	Eficaz contra Podredumbre de la raíz (F. *solani y* R. *solani).*(Ketta & Hewedy, 2021)
	impregnación	Semilla	Protección contra la podredumbre de la raíz (F. *solani* y R. *solani*).(Ketta & Hewedy, 2021)

Stored cowpea (Caupí)	impregnación	Semilla	100% de mortalidad de *Callosobruchus maculatus y Callosobruchus chinensis.*(Abdelgaleil et al., 2021)
Carica papaya (Papaya)	Técnica dual en medio PDA	In-vitro	Ejerce control sobre: *Asperisporium caricae* (mancha negra de la papaya) y *Sclerotium rolfsii* (tizón de la base del tallo).(Turpo & Solano, 2016)
Solanum tuberosum (papa)	Técnica dual en medio PDA Foliar	In-vitro In-planta	Inhibición y disminución de la severidad de P. *infestans* (Ma et al., 2016)*;*

Elaborado por: Autor

Los hongos del género *Trichoderma* se han venido utilizado en el biocontrol de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández-Larrea Vega, 2015; Ketta & Hewedy, 2021; Mukhopadhyay, 2020), debido a que se desarrolla en una gran variedad de suelos y sustratos (Cruzat G. & Ionannidis N., 2008), por su adaptabilidad a diferentes ambientes (Companioni González et al., 2019); las condiciones óptimas para este género son: temperatura de 25-30°C, pH de 5.5-6.5 y humedad del 60% (Martínez et al., 2013), bajo estas condiciones se logra una producción masiva de esporas (Adnan et al., 2019); favorece la disponibilidad de fosfatos y minerales para las plantas (Ruiz-Cisneros et al., 2018), promoviendo el crecimiento vegetal (Adnan et al., 2019); por otra parte también son productores de antibióticos (Vinale et al., 2008), estas sustancia pueden ser volátiles o no volátiles, entre ellas están el trichodermin que inhibe la actividad ribosomal del patógeno, viridín y harzaniolide (Benítez et al., 2004; Centro de educación y tecnología, 2004; Martínez et al., 2013). Los diferentes mecanismos de acción que posee *Trichoderma* reducen el riesgo de resistencia de los fitopatógenos (Fernández-Larrea Vega, 2015),

En cuanto al control biológico de P. *infestans* en el cultivo de papa (S. *tuberosum)* se determinó que T. *harzianum* y B. *subtilis* redujeron la severidad de la enfermedad hasta en un 84.6 y 86.1 % respectivamente(Ma et al., 2016), la especie *Thichoderma atrovirida* a nivel de laboratorio inhibió el crecimiento micelial de P. *infestans* en un 80% (Elsherbiny et al., 2020), de igual forma en otro ensayo se obtuvo una inhibición del crecimiento radial del 60.4% (Erayya et al., 2018), en la

aplicación en campo el agente biológico influye en la intensidad de la enfermedad del tizón tardío y el crecimiento de la planta de papa (Purwantisari et al., 2018), según (Yao et al., 2015) los posibles modos de acción involucrados son la antibiosis y el micoparasitismo ejercidos con eficiencia sobre P. *infestans*.

3.1.3. Bioformulaciones

Las bioformulaciones son preparados a base de consorcios de microrganismos antagonistas, su modo de aplicación puede ser al suelo o en la parte foliar de las plantas, son utilizadas para el control biológico(Sabando-Ávila et al., 2017; ЛЕОНОВ, 2021), las especies más empleadas para formulados fúngicos son T. *harzianum* y T. *viride* (Companioni González et al., 2019), constituyendo el 60% de productos registrados para T. *harzianum* (Ketta & Hewedy, 2021), en una bioformulación el sustrato a utilizar debe ser inerte y adecuado para contener al ingrediente activo, es decir, mantener una relación Carbono/Nitrógeno que permita el crecimiento del hongo, además de la presencia de trazas de microelementos como el cobre, zinc, hierro, manganeso y molibdeno, y vitaminas del complejo B, debe ser económico y no virulento; el ingrediente activo puede ser conidios, micelios, clamidosporas; y se puede utilizar un adyuvante que cumple la función de adherente o dispersante (Dukare et al., 2019; Rodriguez & Gato, 2010), cabe recalcar que de la concentración de conidios y su viabilidad depende la eficacia del bioformulado (Amilcar et al., 2017; Rodriguez & Gato, 2010), además se considera un pH de 4.6-6.8, (Amilcar et al., 2017; Arévalo et al., 2017).

La concentración comercial de un bioformulado no debe ser inferior a 10^9 conidios/g o ml, los estándares de calidad exigen una viabilidad y pureza de entre 85-100% (Cubillos, 2014).

En Ecuador, la aplicación en campo de bioformulados es limitada, debido al bajo rendimiento y deficiencia en estabilidad y viabilidad en el tiempo (Amilcar et al., 2017); un factor determinante a considerar en la utilización de microorganismos antagonistas para el control biológico y destinados a mejorar la calidad del suelo es

que éstos no deben ser genéticamente o químicamente modificados (Agrocalidad, 2020).

4. Materiales y métodos

4.1 Ubicación del estudio:

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Cuenca.

4.2 Material biológico e identificación de fitopatógenos:

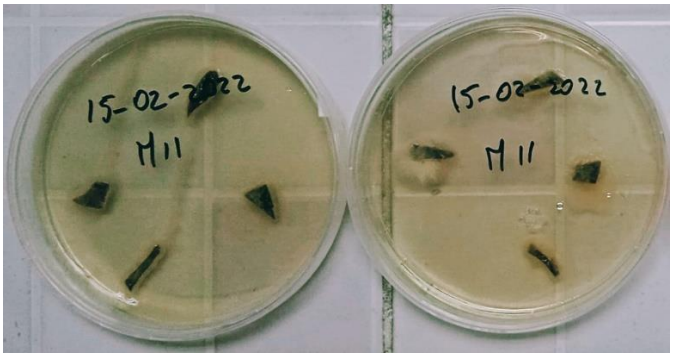
El hongo fitopatógeno P. *infestans* y los hongos saprófitos *Cladosporium* sp. *y Epicoccum* sp, se aislaron de muestras vegetales con síntomas de la enfermedad de un cultivo de papa ubicado en el cantón El Tambo de la provincia del Cañar.

La identificación de los fitopatógenos se realizó con ayuda de un microscópico con lente 40x y la consulta de claves taxonómicas (Agrios, 1998; Barnett & Hunter, 1998; Finch & Finch, 1987).

Fotografía 1. Preparación de muestras

Se procedió a cortar fragmentos de 5mm del material vegetal con síntomas de la enfermedad, que luego de ser lavados con agua estéril, fueron colocados en cajas Petri que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (Agrios, 1998; Webster,

1992), las cajas fueron selladas con Parafilm y se incubaron a 18°C por 5 días, luego se aislaron las cepas fúngicas que estuvieron presentes.



Fotografía 2. Cajas Petri con medio PDA que contienen las muestras vegetales del cultivo de papa enfermo.

El aislado fúngico codificado como F11 pertenece al género *Trichoderma*, especie *harzianum.*

4.3 Evaluación de la actividad antagonista

En cajas Petri de 8.5 cm que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se colocó discos de micelio de 5mm del aislado fúngico T. *harzianum* F11 que se confrontó de manera equidistante frente al fitopatógeno P. *infestans* y a los hongos saprófitos *Cladosporium* sp. y *Epicoccum* sp., el experimento se realizó con tres repeticiones y dos testigos, a partir de las 48 horas se inició con las mediciones del crecimiento radial de las cepas enfrentadas y los testigos (Centro de educación y tecnología, 2004); (Marín, 2016);(Erayya et al., 2018); (Miguel-Ferrer et al., 2021).

Fotografía 3. Pruebas de antagonismo. Cultivos duales

El análisis se fundamentó en lo propuesto por Bell en el año 1982, lo niveles de antagonismo se establecen en base a cinco criterios (Tabla 4).

Tabla 4. Escala de las clases de Bell

Clase	Características
I	*Trichoder*ma spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
II	*Trichoderma* spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
III	*Trichoderma* spp. y el patógeno cubre aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
IV	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de *Trichoderma* spp.
V	El patógeno crece sobre la colonia de *Trichoderma* spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Escala propuesta por Bell en 1982 para evaluar y clasificar el antagonismo por competencia de sustrato (Calvo Araya, 2012); (Sanabria Velázquez, 2020); (Miguel-Ferrer et al., 2021), el aislamiento que se ubica en la clase I es considerado muy bueno, clase II bueno, clase III pobre y las clases IV y V no son antagonistas (Alvarado-Marchena & Rivera-Méndez, 2016).

Otro análisis que permite evaluar la capacidad antagonista es el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), se fundamenta en que la reducción de la tasa de crecimiento del fitopatógeno comparado con el testigo, es indicador de la capacidad

inhibitoria del hongo antagonista (Andrade-hoyos et al., 2021), para ello se empleó la fórmula sugerida por Samaniego en 1989 (Torres et al., 2017).

$$\text{PICR} = \frac{(R1 - R2)}{R1}\ x\ 100$$

R1= crecimiento radial del fitopatógeno en el tratamiento testigo.

R2= crecimiento radial del fitopatógeno enfrentado con el antagonista.

4.4 Formulación del biofungicida

La propagación de conidios del aislado T. *harzianum* F11 se hizo con el fin de obtener un biofungicida cuya concentración sea de 1 x 10^9conidios/ml (Báez et al., 2019), para el efecto se sembraron cultivos puros en matraces de 1000ml que contenían PDA, luego de un periodo de 7 días de incubación a 27 °C se hicieron 5 lavados con 100ml cada uno con una solución de carbohidratos al 5% hasta obtener lo requerido y mediante la cámara de neubauer se determinó la concentración.

Fotografía 4. Cultivo puro de T. *harzianum* F11

4.5 Control de calidad del biofungicida

Este protocolo se sustenta en el manual de análisis de calidad para formulaciones a base de hongos biocontroladores del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador INIAP (Báez et al., 2019), en donde considera las siguientes pruebas microbiológicas:

4.5.1 Determinación del porcentaje de germinación de conidios

El porcentaje de germinación de conidios se calcula con la siguiente relación según (Báez et al., 2019; Berlanga Padilla & Hernández Velásquez, 2006)

$$\text{Germinación } (\%) = \frac{Número\ de\ conidios\ germinados}{Total\ de\ conidios\ evaluados}\ x\ 100$$

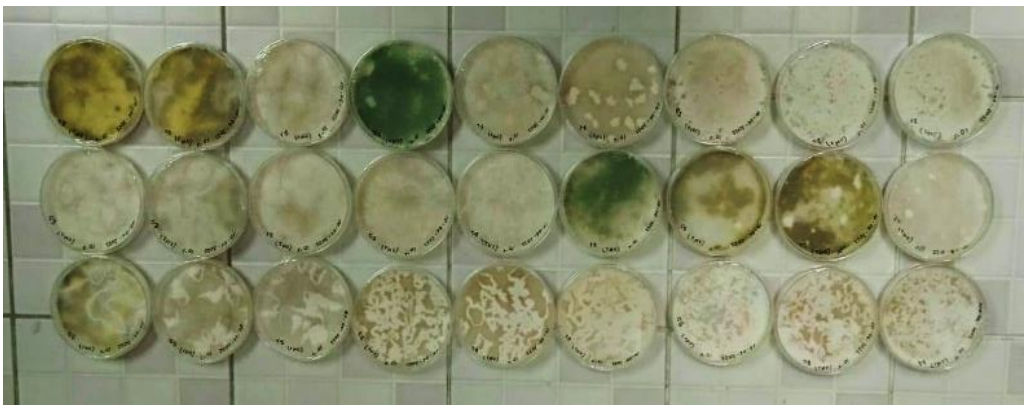
4.5.2 Determinación de la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

Se lo realiza con la siguiente relación según (Báez et al., 2019)

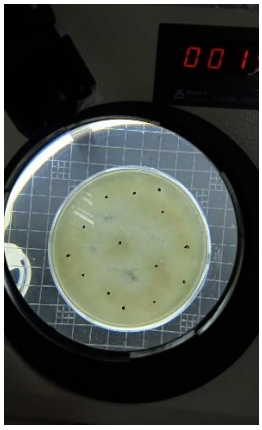
$$UFC/ml = Px\ FD, \text{ donde}$$

P = promedio del número de colonias de las tres cajas de la dilución seleccionada

FD= factor de dilución (inverso) de la dilución rotulada en la caja Petri.



Fotografía 5. Cajas Petri con las tres diluciones del biofungicida requeridas para la prueba.



Fotografía 6. Colonias del aislado fúngico T. *harzianum* F11 contenido en el biofungicida.

4.5.3 Determinación de la concentración de conidios mediante recuento en cámara de neubauer.

El conteo se lo realiza en la cámara de neubauer, y se aplica la siguiente relación (Báez et al., 2019).

$$conidios/ml = \bar{X} x\ 10\ 000\ x\ 16\ x\ FD, \text{ donde}$$

$\bar{X}$ = promedio de las 20 lecturas por área de conteo

16 y 10 000 = constantes para cuadrantes laterales

4.5.4 Porcentaje de pureza del biofungicida

El cálculo de la concentración de contaminantes se lo realiza mediante la siguiente relación según (Báez et al., 2019):

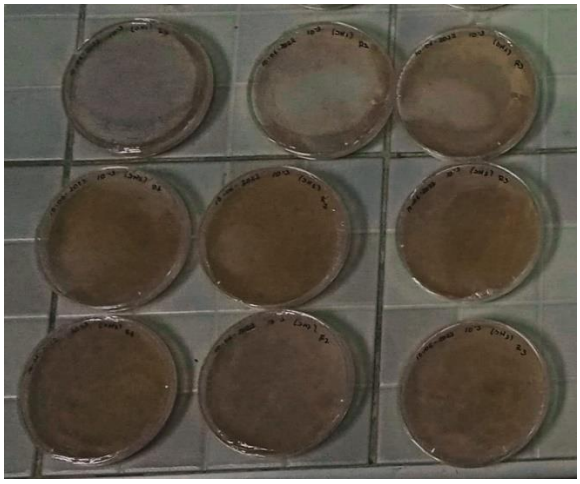
$$Pureza\ \% = \frac{(MO\ C)}{(MO\ B)+(MO\ C)}\ x\ 100, \text{ donde}$$

MO B = concentración del microorganismo biocontrolador

MO C = concentración del microorganismo contaminante

Fotografía 7. Cajas Petri con medio de cultivo agar nutritivo para el conteo de bacterias

Fotografía 8. Cajas Petri con medio de cultivo rosa de bengala con antibiótico para el conteo de mohos



Fotografía 9. Cajas Petri con medio de cultivo extracto de levadura y malta con antibiótico para el conteo de levaduras.

4.5.5 Valores de pH en el biofungicida

Se tomó una muestra de 5ml del producto, a la que se le añadió agua destilada hasta completar 50ml, con un agitador magnético a 150 rpm se procede a homogenizar por dos minutos y finalmente con la ayuda de un equipo multiparámetros se realizan tres mediciones (Báez et al., 2019).

4.6 Prueba de antagonismo Biofungicida a tres concentraciones diferentes frente a P. *infestans*

En cajas Petri de 8.5 cm que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se colocó 30µl del biofungicida que se confrontó de manera equidistante frente al fitopatógeno P. *infestans*, el experimento se realizó con tres concentraciones diferentes, a partir de las 48 horas se inició con las mediciones del crecimiento radial de las cepas enfrentadas y los testigos (Centro de educación y tecnología, 2004); (Marín, 2016);(Erayya et al., 2018); (Miguel-Ferrer et al., 2021).

4.6.1 Análisis Estadístico

Para el efecto, se hizo un DCA con 4 tratamiento y 3 repeticiones, un ADEVA con el fin de determinar las diferencias entre tratamiento y una prueba de Tuckey con un nivel de significancia del 0.5% para establecer las diferencias de los grupos de datos.

5. Resultados y discusión

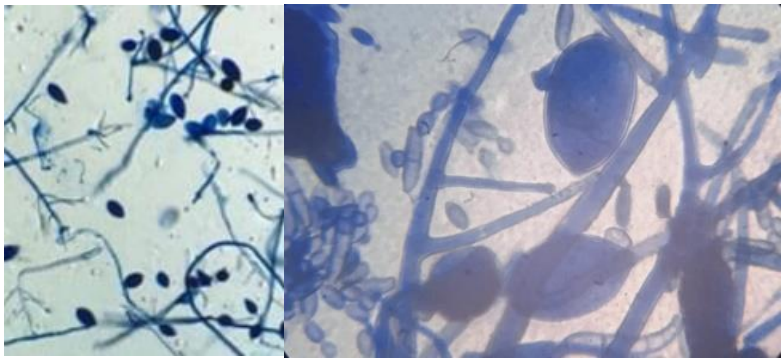
5.1 Ubicación del estudio

En la figura 1 se puede apreciar la ubicación geográfica del sitio de muestreo en las coordenadas -2.525649, -78.927927; cabe mencionar que es una zona productora de papa y que ofrece las condiciones ambientales ideales para el desarrollo de fitopatógenos como P. *infestans.*

Figura 1. Ubicación del muestreo en campo de un cultivo de papa con síntomas de la enfermedad.

5.2 Ubicación taxonómica de los hongos presentes en la enfermedad.

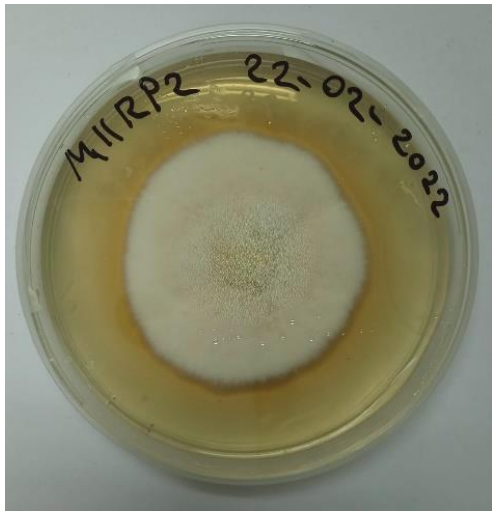
En el laboratorio con cinta transparente se tomaron muestras de micelio, en primera instancia se pudo identificar al hongo fitopatógeno P. *infestans.*



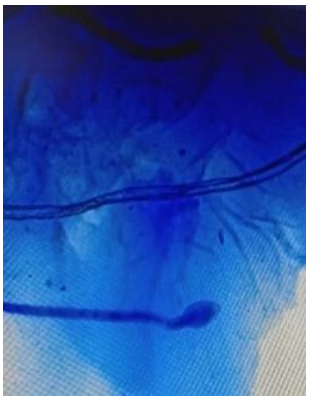
Fotografía 10. Esporangios y zoosporas de P. *infestans*, ampliación 40X

Los aislados fúngicos P. *infestans, Cladosporium* sp. y *Epicoccum* sp., se identificaron en base a características macroscópicas, microscópicas y el uso de claves taxonómicas (Finch & Finch, 1987); (Agrios, 1998); (Barnett & Hunter, 1998):

Hongo fitopatógeno P. *infestans.*

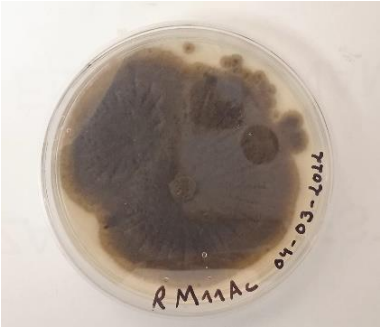


Fotografía 11. Cultivo puro de P. *infestans* en medio de cultivo PDA, colonia con aspecto algodonoso no muy elevado, con circunferencias concéntricas, coincide con lo que reporta (Ariztizabal & Torres, 2015)

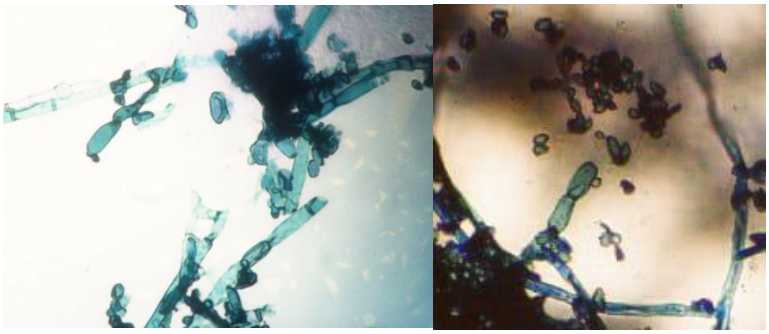


Fotografía 12. Esporangio ovoide y alargado con pedicelo del fitopatógeno P. *infestans*, coincide con lo reportado por (Ariztizabal & Torres, 2015; Finch & Finch, 1987; García-Núñez et al., 2017)

Así mismo, se pudo identificar el hongo saprófito *Cladosporium* sp.



Fotografía 13. Cultivo puro del hongo saprófito *Cladosporium* sp. en medio de cultivo PDA, colonia de color verde olivaceo (El-Dawy et al., 2021)



Fotografía 14. Conidióforos y conidios del hongo saprófito *Cladosporium* sp., concuerda con lo reportado por (El-Dawy et al., 2021; Finch & Finch, 1987)

De igual forma se identificó al hongo saprófito *Epiccocum* sp.

Fotografía 15. Cultivo puro del hongo saprófito *Epicoccum* sp. en medio de cultivo PDA, colonia madura de color negro (Barnett & Hunter, 1998)

Fotografía 16. Conidios casi esféricos con septos transversales del hongo saprófito *Epicoccum* sp. (Arias et al., 2010; Barnett & Hunter, 1998; Carrillo, n.d.)

5.3 Resultados de las pruebas de antagonismo

Tabla 5. Crecimiento radial T. *harzianum* frente a P. *infestans*

	Tiempo en horas																			
	48 h (mm)		72 h (mm)		96 h (mm)		120 h (mm)		144 h (mm)		168 h (mm)		192 h (mm)		216 h (mm)		240 h (mm)		264 h (mm)	
Dual	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
R1	33	32	39	34	39	35	43	35	44	35	85	35	85	35	85	35	85	35	85	35
R2	33	30	38	33	39	33	44	33	44	33	47	33	47	32	69	32	69	32	85	32
R3	31	32	41	35	45	38	48	13	52	38	64	13	75	38	75	13	75	38	78	38
TF11	38		45		49		85		85		85		85		85		85		85	
TPhy	30,5		35,5		38		38		39		42		45		46		53		85	

Grupo de datos de las mediciones en milímetros, realizadas en la prueba de antagonismo de T. *harzianum* frente a P. *infestans* a partir de las 48 horas hasta las 264 horas todos los días. A= Antagonista (T. *harzianum*), C= Control (P. *infestans*), TF11= Testigo T. *harzianum*, TPhy= Testigo P. *infestans*, R= repeticiones.

Tabla 6. Crecimiento radial T. *harzianum* frente a *Cladosporium* sp.

	Tiempo en horas																					
	48 h (mm)		72 h (mm)		96h (mm)		120 h (mm)		144 h (mm)		168 h (mm)		192 h (mm)		216 h (mm)		240 h (mm)		264 h (mm)		288 h (mm)		312 h (mm)	
Dual	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
R1	40	25	48	25	50	25	50	25	52	25	53	25	54	25	55	25	55	25	55	26	55	25	85	26
R2	38	25	47	25	50	25	51	25	52	25	54	26	55	26	58	27	85	27	85	27	85	27	85	27
R3	38	25	45	25	46	26	47	26	47	26,5	49	26,5	50	26,5	50	27	51	27	51	27	51	27	85	27
TF11	41		44		46		47		47,5		49		49		50		51		51		51		85	
TCL	26		27		27		27		27,5		27,5		27,5		27,5		27,5		27,5		27,5		85	

Grupo de datos de las mediciones en milímetros, realizadas en la prueba de antagonismo de T. *harzianum* frente a *Cladosporium* sp. a partir de las 48 horas hasta

las 312 horas todos los días. A= Antagonista (T. *harzianum*), C= Control (*Cladosporium* sp.), TF11= Testigo T. *harzianum*, TCL= Testigo *Cladosporium* sp., R= repeticiones.

Tabla 7. Crecimiento radial T. *harzianum* frente a *Epicoccum* sp.

	Tiempo en horas																							
	48 h (mm)		72 h (mm)		96 h (mm)		120 h (mm)		144 h (mm)		168 h (mm)		192 h (mm)		216 h (mm)		240 h (mm)		264 h (mm)		288 h (mm)		312 h (mm)	
Dual	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
R1	37	31,5	45	35	47	36	52	36	58	36	65	36	69	36	70	36	70	36	70	36	71	36	71	36
R2	37	30	48	34	49	35	50	35	54	35	73	35	75	35	77	35	77	35	78	35	78	35	78	35
R3	35	29	44	37	45	37	48	37	57	37	75	37	77	37	78	37	78	37	80	37	80	37	80	37
TF11	35		48		52		62		71		85		85		85		85		85		85		85	
TEP	31		37		37		37		37		40		41		42		43		45		46		85	

Grupo de datos de las mediciones en milímetros, realizadas en la prueba de antagonismo de T. *harzianum* frente a *Epicoccum* sp. a partir de las 48 horas hasta las 312 horas todos los días. A= Antagonista (T. *harzianum*), C= Control (*Epicoccum* sp.), TF11= Testigo T. *harzianum*, TCL= Testigo *Epicoccum* sp., R= repeticiones.

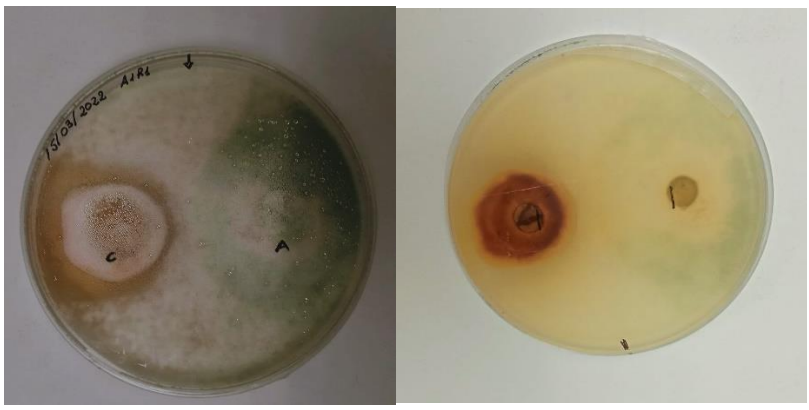
De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas de antagonismo, se procede a mostrar en la Tabla 7 la clasificación obtenida de acuerdo con la escala de Bell y al porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), valores que concuerdan por ejemplo con los obtenidos por (Ma et al., 2016) en donde T. *harzianum* y T. *viride* inhibieron fuertemente el crecimiento de P. *infestans* en un 83.3% y 75.1 % respectivamente, de la misma manera en otro estudio donde se probaron 25 especies de *Trichoderma* se puedo observar que todas fueron significativamente efectivas con un porcentaje de inhibición sobre P. *infestans* de 60.40% (Erayya et al., 2018).

Tabla 8. Resultados pruebas de antagonismo. Escala de Bell y PICR

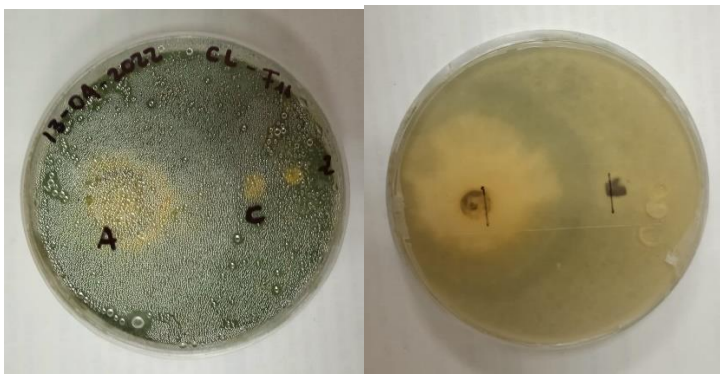
Prueba de Antagonismo	Escala de Bell	PICR
T. *harzianum* frente a P. *infestans.*	Clase 2. El antagonista crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.	83.33%
T. *harzianum* frente a *Cladosporium* sp.	Clase 1. El antagonista crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.	98.04 %
T. *harzianum* frente a *Epiccocum* sp.	Clase 2. El antagonista crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.	87.06%

Según la escala de Bell, el grado antagónico de T. *harzianum* se ubica en la clase 1 y 2 siendo muy bueno y bueno respectivamente, en cuanto al PICR podemos observar que está sobre el 80% lo cual nos indica que es factible utilizar este hongo para el biocontrol de fitopatógenos.

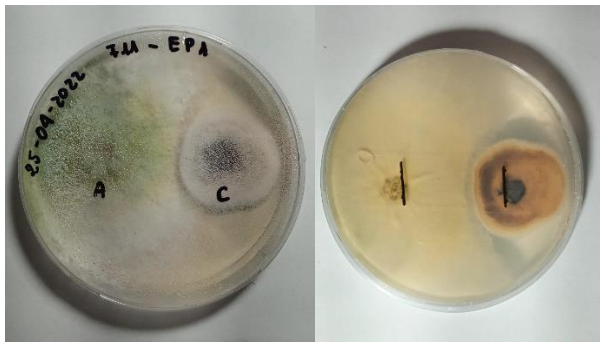
Fotografía 17. Aislado puro del hongo antagonista T. *harzianum* F11.



Fotografía 18. Prueba de antagonismo de T. *harzianum* F11*.* Frente a P. *infestans a los 11 días.*



Fotografía 19. Prueba de antagonismo de T. *harzianum* F11 frente a *Cladosporium* sp. a los 10 días.



Fotografía 20. Prueba de antagonismo T. *harzianum* F11. Frente a *Epicoccum* sp. a los 7 días.

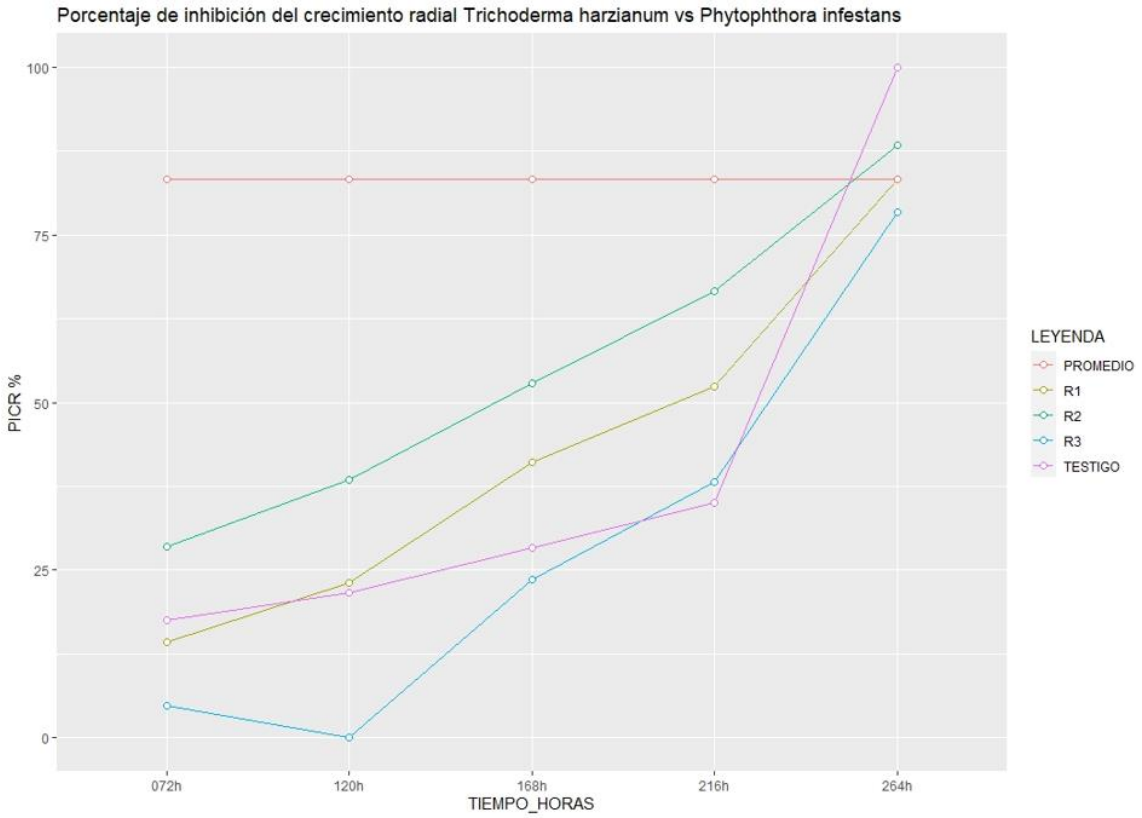


Gráfico 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial T. *harzianum* F11 frente a P. *infestans*.

Donde: R=repeticiones, TESTIGO= P. *infestans,* PROMEDIO= PICR del ensayo.

En el gráfico 1 se puede evidenciar que en el transcurso de las horas existe una clara tendencia de crecimiento del PICR, donde a las 264 horas el valor es de 83.33%, tiempo en el que culmina la prueba; por lo que puede sugerirse a esta cepa como potencial inhibidor de P. *infestans.*

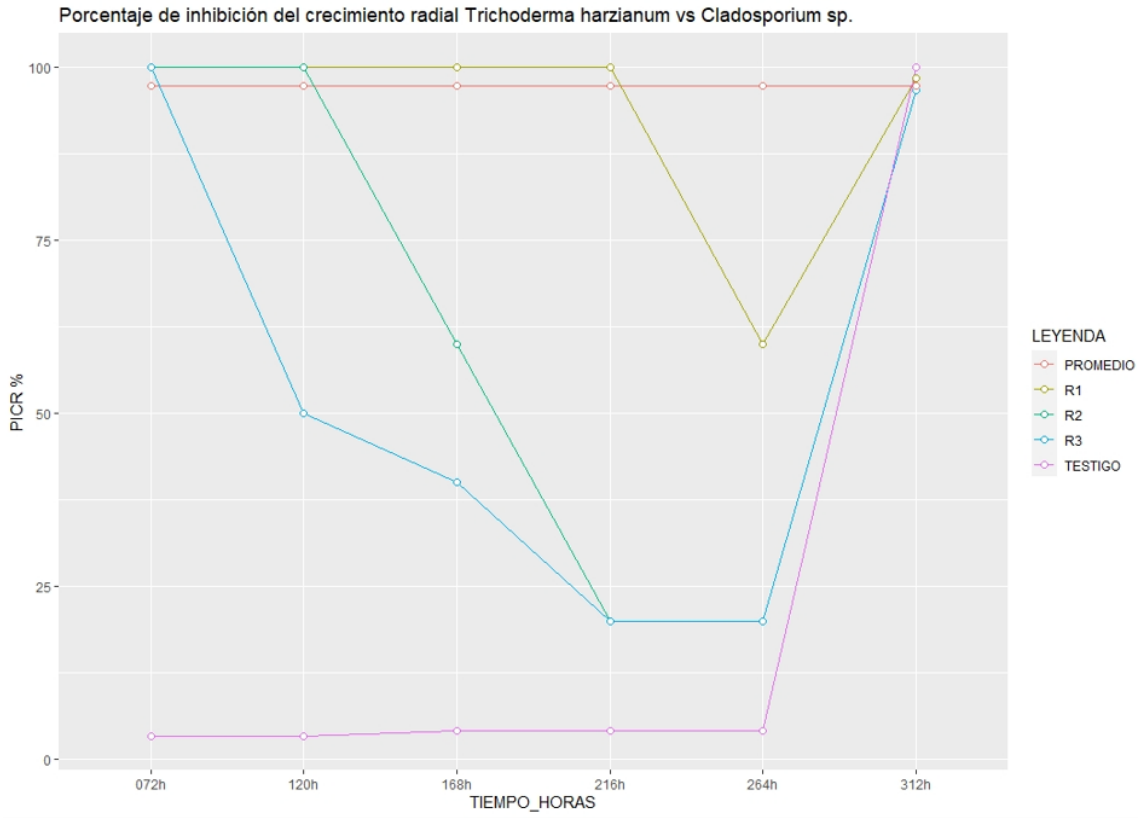


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial T. *harzianum* F11 frente a *Cladosporium* sp.

Donde: R=repeticiones, TESTIGO= *Cladosporium* sp, PROMEDIO= PICR del ensayo.

En el gráfico 2 se puede observar que en las primeras horas de la prueba de antagonismo el PICR es del 100% ya que el hongo saprófito *Cladosporium* sp. mostró crecimiento lento, observándose únicamente desarrollo en el antagonista, a las 312 horas el valor del PICR fue de 98.04%, tiempo en el que culmina la prueba, por lo tanto, se sugiere que T. *harzianum* inhibe la actividad del fitopatógeno.

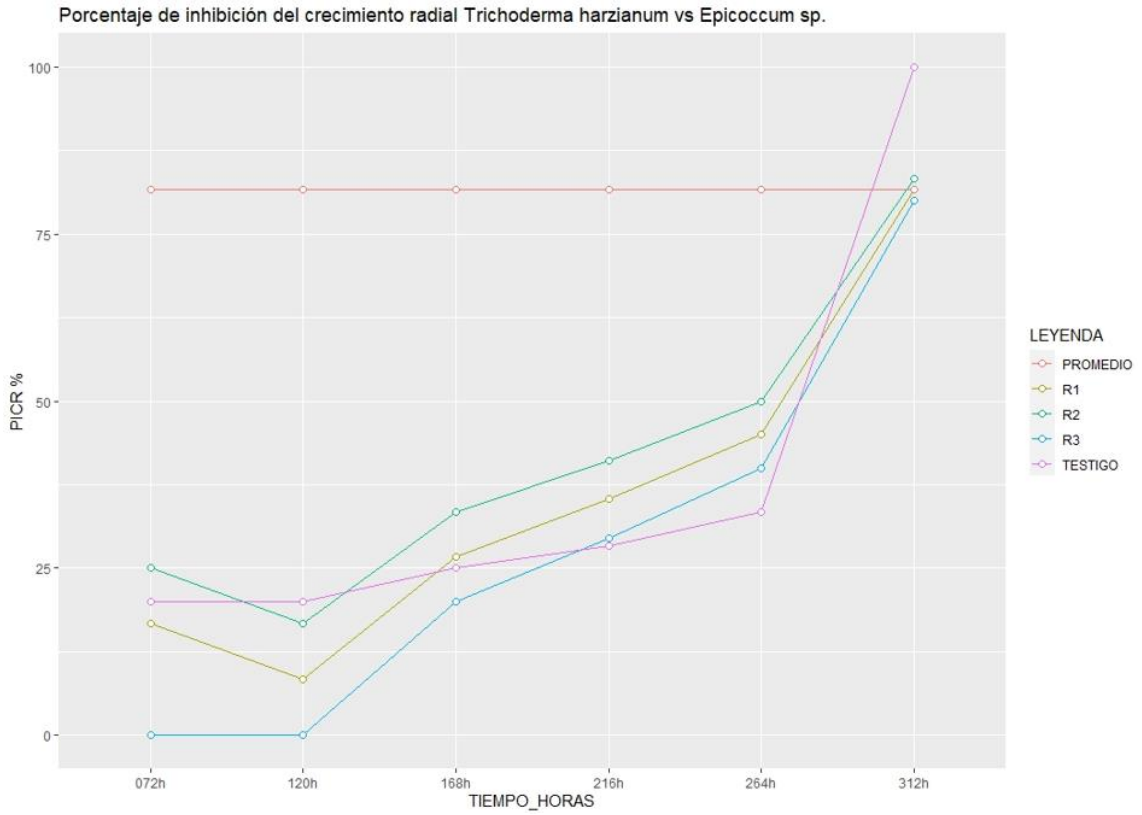


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial T. *harzianum* F11 frente a *Epicoccum* sp.

Donde: R=repeticiones, TESTIGO= *Epicoccum* sp, PROMEDIO= PICR del ensayo.

En el gráfico 3 se puede evidenciar una clara tendencia de crecimiento del PICR, donde a las 312 horas el valor es de 87.06%, tiempo en el que finalizó la prueba, mostrando potencial de inhibición frente al fitopatógeno.

5.4 Formulación de un biofungicida a base del hongo antagonista T. *harzianum.*

Como resultado se obtuvo el producto con una concentración de 1 x 10^9 conidios/ml, debe mantenerse en refrigeración a 4°C para mantener de mejor manera sus cualidades biocontroladoras.

Fotografía 21. Biofungicida a base del hongo antagonista T. *harzianum* F11.

5.5 Pruebas microbiológicas para el control de la calidad.

5.5.1 Determinación del porcentaje de germinación de conidios

El objetivo de esta prueba fue determinar el porcentaje de germinación de conidios del biofungicida en un tiempo determinado de 16 horas, del recuento realizado en la dilución 10^{-2} se tiene el siguiente grupo de datos (Tabla 9).

Fecha de elaboración del biofungicida: 31 de mayo del 2022

Fecha de realización de la prueba: 07 de junio del 2022

Factor de dilución: 10^{-2}

Tabla 9. Germinación de conidios.

N° Campos ópticos/Caja Petri	Bioformulación					
	Caja 1		Caja 2		Caja 3	
	Germinados	No germinados	Germinados	No germinados	Germinados	No germinados
1	12	1	27	0	17	1
2	23	3	8	0	10	0
3	10	3	12	1	13	0
4	8	0	16	0	16	0
5	11	1	12	0	10	2
6	8	0	12	0	11	1
7	38	0	15	0	19	2
8	21	1	13	0	12	1
9	11	0	13	1	17	0
10	21	0	8	0	15	0
Total	163	9	136	2	140	7
Promedio	16,3	0,9	13,6	0,2	14	0,7

Germinación %	96,06

Total de conidios germinados y no germinados a las 16 horas en las tres cajas Petri evaluadas mediante la observación de 10 campos ópticos en cada una. El porcentaje de germinación de T. *harzianum* en el biofungicida es de 96,06%.

Un producto de calidad debe superar el 85% del porcentaje de germinación del principio activo, el biofungicida superó este valor, además fue almacenado a 4°C durante un mes para realizar nuevamente la prueba obteniendo el 96,86% lo cual indica que el biofungicida se mantuvo viable (Báez et al., 2019).

Fotografía 22. Conidios germinados de T. *harzianum*. a las 16 horas de incubación

5.5.2 Determinación de la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

Con el fin de determinar el número de propágulos viables por unidad de volumen se procedió a registrar los siguientes datos (Tabla 10).

Fecha elaboración del producto: 31 de mayo del 2022

Fecha de realización de la prueba: 15 de junio del 2022

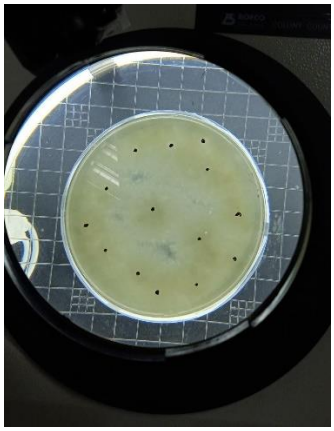
Tabla 10. Determinación de la viabilidad (UFC/ml)

Dilución sembrada (rótulo del tubo)	Factor de dilución (rótulo en las cajas Petri)	Bioformulación								
		Submuestra 1			Submuestra 2			Submuestra 3		
		Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 1	Caja 2	Caja 3
10^{-6}	10^{-7}	20	23	18	14	15	23	16	18	15
Promedio	18									
Concentración	1.8×10^{8} UFC/ml									

Conteo de colonias de T. *harzianum,* los valores fueron utilizados para el cálculo de la concentración en UFC/ml.

De acuerdo con la tabla anterior decimos que la concentración en unidades formadoras de colonias para el biofungicida es de 1.8×10^{8} UFC/ml. Se debe indicar que una colonia

puede originarse de un agregado de células, lo cual puede subestimar la cantidad real, es por ello que la viabilidad se comprueba con el porcentaje de germinación (Báez et al., 2019). Según (AGROCALIDAD, 2019), la concentración debe sobrepasar 1 x 10^5UFC/ml.



Fotografía 23. Unidades formadoras de colonia del biofungicida

5.5.3 Determinación de la concentración de conidios mediante recuento en cámara de Neubauer.

Para determinar el número de conidios por unidad de volumen de T. *harzianum* en el bioproducto se tomaron los siguientes datos (Tabla 11).

Fecha de elaboración del producto: 31 de mayo del 2022

Fecha de realización de la prueba: 02 de junio del 2022

Factor de dilución: 10^{-3}

Tamaño de la muestra: 25 µl

Tabla 11. Determinación de la concentración (conidios/ml)

Área de conteo	Lecturas										Promedio	Concentración conidios/ml	Concentración
1	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	9,6	$1,536 \times 10^{9}$	$1,45 \times 10^{9}$
	12	13	11	8	13	11	7	6	10	11			
	11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**			
	9	6	8	14	9	1	11	6	10	16			
2	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	8,6	$1,376 \times 10^{9}$	
	10	12	5	6	11	12	18	6	8	4			
	11	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**			
	11	6	5	9	8	13	7	9	6	6			

Recuento de conidios en los cuadrantes correspondientes, promedio de las lecturas tanto del área uno como del área 2 cuyos valores son necesarios para la aplicación de la respectiva fórmula

La concentración requerida para el biofungicida es de 1×10^{9} tal como recomienda (Cubillos, 2014), por tanto se realiza una dilución hasta llegar a lo deseado. A los 35 días de la fecha de elaboración del producto que estuvo almacenado a 4°C presentó una concentración de $9,47 \times 10^{8}$, se pudo observar que la concentración disminuyó en un 5%.

5.5.4 Determinación del porcentaje de pureza.

Para determinar el porcentaje de microorganismos diferentes al ingrediente activo T. *harzianum* presentes en el bioformulado como son bacterias, mohos y levaduras se tiene el siguiente grupo de datos (Tabla 12).

Tabla 12. Determinación del porcentaje de pureza

Microorganismos Contaminantes	Factor de dilución (rótulo en las cajas Petri)	Número de colonias contaminantes								
		Submuestra 1			Submuestra 2			Submuestra 3		
		R1	**R2**	**R3**	**R1**	**R2**	**R3**	**R1**	**R2**	**R3**
Bacterias	10^{-2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mohos	10^{-5}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-6}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-7}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Levaduras	10^{-2}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pureza % =	100									

Recuento de colonias de microorganismos diferentes a T. *harzianum.*

Como se observa en los resultados obtenidos, el porcentaje de pureza del biofungicida es del 100%, es decir, que la concentración de contaminantes es de cero lo cual indica que se trata de un producto puro. Según (AGROCALIDAD, 2019; Báez et al., 2019), debe superar el 90%.

5.5.5 Determinación del pH

Se trata de un parámetro crítico de viabilidad, del cual depende la sobrevivencia de los propágulos de T. *harzianum,* los resultados obtenidos se muestran en la Tabla13:

Tabla 13. Determinación del pH

Medición	Valor
1	7,39
2	7,37
3	7,37
PROM	7,38

Valores de las mediciones y el promedio de estas.

El pH que mostró el biofungicida es de 7.38, según (Martínez et al., 2013) el rango de pH que permite la conservación del bioagente es de 5.5 a 7.5.

Tabla 14. Resumen control de calidad del Biofungicida

Parámetro	Resultado obtenido	Límite de aceptación
Germinación de conidios (%)	96.06 %	> 85 %
Viabilidad (UFC/ml)	1.8×10^8 UFC/ml	$> 1 \times 10^5$ UFC/ml
Concentración de conidios (conidios/ml)	1×10^9 conidios/ml	$> 1 \times 10^5$ UFC/ml
Pureza (%)	100%	> 90 %
pH	7.38	5.5 - 7.5

Elaborado por: El autor

5.6 Prueba de antagonismo Biofungicida a tres concentraciones diferentes frente a P. *infestans*

Debido a que tanto *Cladosporium* sp. *y Epicoccum* sp. son hongos saprófitos (Agrios, 1998), la prueba de antagonismo para obtener la concentración adecuada para el biofungicida se la realizó con P. *infestans.*

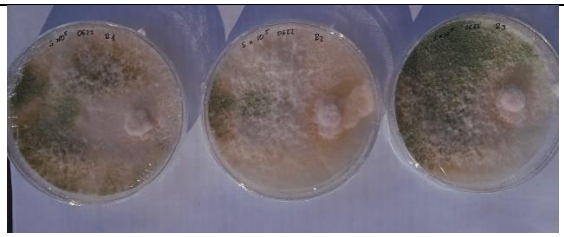
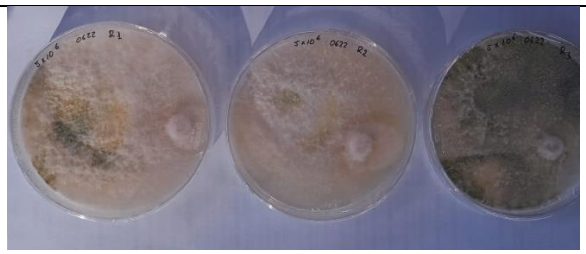
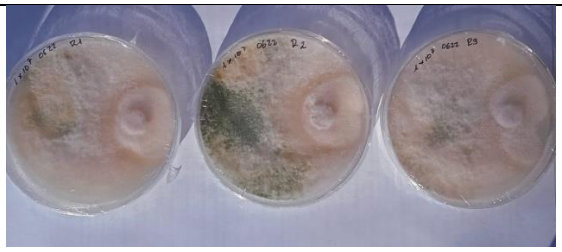
Tabla 15. Crecimiento radial Biofungicida vs P. *infestans*.

	Tiempo en horas															
Dual	48 h (mm)		72 h (mm)		96 h (mm)		120 h (mm)		144 h (mm)		168 h (mm)		196 h (mm)		216 h (mm)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
5x10 ^{5}																
A1R1	57	28	74	28	85	28	85	28	85	28	85	28	85	28	85	28
A1R2	45	32	56	33	62	33	74	33	76	33	85	33	85	33	85	33
A1R3	46	31	54	31	72	31	85	31	85	31	85	31	85	31	85	31
TP	53		65		72		83		85		85		85		85	
5x10 ^{6}																
A2R1	56	27	69	29	75	30	85	30	85	30	85	30	85	30	85	30
A2R2	56	30	63	31	69	31	82	31	85	31	85	31	85	31	85	31
A2R3	57	29	60	29	85	29	85	29	85	29	85	29	85	29	85	29
TP	45		58		65		75		85		85		85		85	
1x10 ^{7}																
A3R1	47	31	55	31	60	31	73	31	79	35	80	35	80	35	80	35
A3R2	47	34	56	35	64	35	73	35	75	35	80	35	80	35	80	35
A3R3	49	31	55	31	62	31	72	31	77	31	80	31	80	31	80	31
TP	46		58		65		76		79		84		85		85	
TPhy	33		40		46		54		58		67		72		85	

Grupo de datos de las mediciones en milímetros, realizadas en la prueba de antagonismo de Biofungicida frente a P. *infestans* a partir de las 48 horas hasta las 216 horas todos los días. A= Antagonista (Biofungicida), C= Control (P. *infestans*), TP= Testigo Biofungicida, TPhy= Testigo P. *infestans*, R= repeticiones.

Con los datos obtenidos se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) luego de que el hongo biocontrolador T. *harzianum* contenido en el biofungicida en tres concentraciones diferentes fue enfrentado al fitopatógeno P. *infestans* con el fin de determinar la concentración idónea para controlar al fitopatógeno, se procede a mostrar los resultados en la Tabla 16.

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del Biofungicida a tres concentraciones diferentes vs P. *infestans*.

Prueba de Antagonismo	**Registro fotográfico**	**PICR**
Biofungicida a una concentración de 5 x 10^5 conidios/ml.	 Fotografía 24. Prueba de inhibición del Biofungicida a una concentración de 5 x 10^5 conidios/ml vs P. *infestans* a los 7 días.	93.33%
Biofungicida a una concentración de 5 x 10^6 conidios/ml.	 Fotografía 25. Prueba de inhibición del Biofungicida a una concentración de 5 x 10^6 conidios/ml vs P. *infestans* a los 7 días	94.12%
Biofungicida a una concentración de 1 x 10^7 conidios/ml.	 Fotografía 26. Prueba de inhibición del Biofungicida a una concentración de 1 x 10^7 conidios/ml vs P. *infestans* a los 7 días.	89.80%

Los valores de PICR muestran que la concentración 5 x 10^6 conidios/ml presentó mayor inhibición del fitopatógeno P. *infestans*.

5.7 Análisis Estadístico

El presente análisis estadístico se aplicó para demostrar si existe diferencia significativa entre los grupos de datos correspondientes a las tres concentraciones evaluadas (tratamientos) indicadas en la Tabla 17 para determinar la dosis adecuada del biofungicida para el control del patógeno P. *infestans*.

Tabla 17. Tratamientos

Código	Tratamiento
A1	5×10^5
A2	5×10^6
A3	1×10^7
T	Testigo *P. infestans*

Códigos utilizados para los tratamientos en el análisis estadístico.

Tabla 18. Resumen ADEVA del antagonismo

HORAS	Fcal	0.5%	0.1%	CV
48	9.56*	4.76	9.78	17.78
72	40.20**	4.76	9.78	15.67
96	96.86**	4.76	9.78	14.09
120	210.57**	4.76	9.78	11.69
144	193.5**	4.76	9.78	12.73
168	344.08**	4.76	9.78	10.86
196	446.83**	4.76	9.78	10.05
216	777.16**	4.76	9.78	8.40

ADEVA de los grupos de datos que corresponden a las tres concentraciones diferentes de T. *harzianum* contenido en el biofungicida tanto al 0.5% como al 0.1%.

* (Significativo) = los ensayos frente al testigo presentan diferencia.

** (Altamente significativo) = los ensayos frente al testigo presentan diferencia alta.

Al realizar el análisis de variancia se obtuvo a las 48 horas significancia únicamente al 5%, de ahí en adelante, es decir, a partir de las 72 horas cambió a altamente significativo hasta el final de la prueba presentada por F calculado frente a los tabulares, esto indica que T. *harzianum* contenido en el biofungicida trabaja controlando al fitopatógeno P. *infestans*. En cuanto al coeficiente de variación (CV) calculado, muestra la confiabilidad de los datos.

De acuerdo con la prueba de Tuckey al 0.5% cuyo valor es de 5,03 se tienen los siguientes datos:

Tabla 19. Prueba de Tuckey.

Tratamiento	Media del grupo	Agrupación			
T	60	A			
A3	8,66	A	B		
A1	5,66	A		C	
A2	5	A			D

Tuckey	Valor
A1-A2	0,66
A1-A3	3
A1-T	54,34
A2-A3	3,66
A2-T	55
A3-T	51,34

Tablas de comparación de tratamientos según la prueba de Tuckey.

De acuerdo con los resultados podemos inferir, que los ensayos comparados con el testigo P. *infestans* (T) no presentan diferencia, es decir, que el patógenos tuvo crecimiento en todos los tratamientos incluido el testigo; en tanto que entre ensayos (A1, A2 y A3) sí presentan diferencia significativa ya que dependiendo de la concentración del antagonista el nivel de crecimiento del patógeno tuvo variación.

La media de los ensayos nos indica: A2 < A1 < A3, por lo tanto P. *infestans* presenta un menor crecimiento en A2 lo cual indica que éste es el tratamiento más efectivo, entonces decimos que a partir de una concentración de 1 x 10^9 conidios/ml que es la que contiene el biofungicida, se diluye para obtener una concentración de 5 x 10^6conidios/ml.

De acuerdo con los resultados exhibidos en la presente investigación decimos que el control biológico para fitopatógenos, en éste caso P. *infestans* es viable, ya *que* T. *harzianum,* demostró que ejerce control sobre dicho patógeno, lo cual concuerda con

los resultados obtenidos en un estudio en donde se evalúan los metabolitos antifúngicos producidos por T. *longibrachiatum* donde P. *infestans* fue muy susceptible, mostrando un control del 90% (Ngo et al., 2021). También se determinó que T. *harzianum* y T. *longibrachiatum* presentan antagonismos clase 2 frente a P. *infestans* (Ramon et al., 2011), además de actuar mediante resistencia inducida en el caso de T. *harzianum* sobre el mismo fitopatógeno (Fontana et al., 2021).

Se logró una concentración máxima de 1.45 x 10^9 conidios/ml y los parámetro de viabilidad y pureza estuvieron dentro del 85-100% que es lo que recomienda la literatura, por tanto, el biofungicida cumple con los requerimientos (Cubillos, 2014), (Báez et al., 2019).

6. CONCLUSIONES

De las muestras vegetales con síntomas de la enfermedad, se aisló tres hongos que posteriormente se identificaron mediante características macroscópicas, microscópicas y el uso de claves taxonómicas como: P. *infestans, Cladosporium* sp. *y Epicoccum* sp.

El aislado fúngico T. *harzianum* F11 resultó ser antagonista frente a P. *infestans* con un PICR de 83,33% y clase II en la escala de Bell, así como también frente a los hongos saprófitos *Cladosporium* sp. cuyo PICR es de 98,04% y clase I en la escala de Bell, y *Epicoccum* sp, con un PICR de 87,06% y clase II en la escala de Bell; por lo que puede postularse a ésta cepa como potencial principio activo en la formulación de biofungicidas para el control de fitopatógenos, como una alternativa segura para el medio ambiente.

Según el estado del arte, se recomienda que un producto para el control biológico debe tener una concentración de 1 x 10^9 conidios/ml, misma que se logró con el biofungicida motivo de esta investigación, de acuerdo con las pruebas de antagonismo que se le aplicó a nivel de laboratorio y considerando la media de los ensayos, se determinó que para el control de P. *infestans* la dilución más eficiente fue de 5 x 10^6conidios/ml ya que presentó el menor crecimiento del patógeno.

El biofungicida cumplió con los parámetros de calidad evaluados, según las pruebas microbiológicas y fisicoquímicas propuestas por el INIAP para la valoración de bioformulados, ver tabla 14; a un mes de elaborado el producto y conservado en refrigeración a 4°C, se determinó que el producto se mantenía viable ya que las pruebas de geminación y concentración de conidios así lo pudieron demostrar con un 96,86 % y 9,47 x 10^8 conidios/ml respectivamente.

Referencias

Abdelgaleil, S. A. M., Gad, H. A., Hamza, A. F., & Al-Anany, M. S. (2021). Insecticidal efficacy of two inert dusts and Trichoderma harzianum, applied alone or in combination, against Callosobruchus maculatus and Callosobruchus chinensis on stored cowpea seeds. *Crop Protection*, *146*(April), 105656. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105656

Acurio Vázconez, R. D., & España Imbaquingo, C. K. (2017). EN PASTURAS DE RAYGRASS (Lolium perenne) Y TRÉBOL BLANCO (Trifolium repens). *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, *25*(1), 53–61.

Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., Chen, H. Y. H., & Lu, G. dong. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus. *Microbial Pathogenesis*, *129*(January), 7–18. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042

Agrios, G. (1998). *Introducción a la fitopatología* (Limusa (ed.); 3° edición).

Agrocalidad. (2020). *Instructivo de la normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador*.

AGROCALIDAD. (2019). *Requisitos específicos para el registro de inoculantes biológicos 1. requisitos para inoculantes con: microorganismos solubilizadores de p, bacterias simbióticas y asimbióticas fijadoras de n, microorganismos estimulantes de reguladores de crecimiento, tr*. https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/req3.pdf

Alvarado-Marchena, L., & Rivera-Méndez, W. (2016). Molecular identification of Trichoderma spp. in garlic and onion fields and In Vitro antagonism trials on Sclerotium cepivorum. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, *40*, 1–9. https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20150454

Amilcar, J., Napoleón, E., Alejandro, C., Javier, F., Sulay, E., Elizabeth, S., Pineda-insuasti, J. A., Benavides-sotelo, E. N., Duarte, A. S., Burgos-rada, C. A., Soto-arroyave, C. P., Pineda-, C. A., Fierro-ramos, F. J., Mora-muñoz, E. S., & Álvarez-ramos, S. E. (2017). *Producción de biopreparados de Trichoderm ma spp : una revisión*.

Andrade-hoyos, P., Romero-arenas, O., Zacachimalpa, S. P., Villa-ruano, N., & Universitaria, C. (2021). *In vitro control of Fusarium sp . associated with onion crop through Trichoderma harzianum*. 1–15.

Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, B., & Leon, B. (2017). *Vol 19 nº 2*. *19*, 135–144.

Arias, R. M., Heredia, G., & Mena-Portales, J. (2010). Adiciones al conocimiento de la diversidad de los hongos anamorfos del bosque mesófilo de montaña del estado de Veracruz III. *Acta Botanica Mexicana*, *42*(90), 19. https://doi.org/10.21829/abm90.2010.297

Ariztizabal, N., & Torres, C. (2015). Morphological and Molecular Characterization of Phytophthora in Pepper (Capsicum frutescens var. Tabasco), Valle del Cauca. *Revista de*

Ciencias, *19*(2), 71–89. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-19352015000200005&script=sci_abstract&tlng=en

Arora, R. K., Sharma, S., & Singh, B. P. (2014). Late blight disease of potato and its management. *Potato Journal*, *41*(1), 16–40.

Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Jackson, T., Jaronski, S., & Viera, W. (2019). *Manual de análisis de calidad, formulaciones biocontrol, 112.pdf*. INIAP.

Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Fourth Edi). https://doi.org/10.3726/978-3-0353-0103-8/3

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International Microbiology*, *7*(4), 249–260. https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480

Berlanga Padilla, A. M., & Hernández Velásquez, V. M. (2006). *Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos* (C. N. de R. de C. Biológico (ed.)).

Calvo Araya, J. A. et. al. (2012). Aislamiento y evaluación. *Agronomía Mesoamericana*, *23*(2), 225–231.

Carrillo, L. (n.d.). 10. Clave. In *Los hongos de los alimentos y forrajes* (Vol. 17, Issue 16, pp. 99–118).

Castro, R., Pesántez, M., Flores, V., Díaz, C., Castro, L., & Alvarado-Capó, Y. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de Trichoderma harzianum Rifai como antagonista de Mycosphaerella fijiensis Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, *30*(2), 133–138.

Centro de educación y tecnología. (2004). *Manual de producción y utilización de Trichoderma spp.*

Companioni González, B., Domínguez Arizmendi, G., & García Velasco, R. (2019). Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, *19*(4), 237–248.

Cruzat G., R., & Ionannidis N., D. (2008). Biocontrol de Enfermedades Fungosas con Trichoderma. *Experiencias de Innovación Para El Emprendimiento Agrario FIA*, *62*, 28. https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75579_archivo_01.pdf

Cubillos, C. Á. (2014). *AGROINDUSTRIAL LA ANGOSTURA DE CAMPOALEGRE (HUILA) Introducción*. 15–20.

Cuesta, X., & Monteros, C. (2020). *Manual del cultivo de papa para la Sierra Sur. Manual No. 90* (C. Racines, Marcelo; Cuesta, Xavier; Castillo (ed.); Tercera). https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5672

Cuesta, X., & Rivadeneira, J. (2021). *IX Congreso Ecuatoriano de la Papa Agrobiodiversidad y Nutrición ARTÍCULOS DEL IX-CEP-2021 Libro de Memorias Organizado por :* (pp. 1–10). INIAP. https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5744/1/iniapsc405.pdf

Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., & Kozdrój, J. (2010). Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *64*(4), 316–323. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.03.006

Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(9), 1498–1513. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235

El-Dawy, E. G. A. E. M., Gherbawy, Y. A., & Hussein, M. A. (2021). Morphological, molecular characterization, plant pathogenicity and biocontrol of Cladosporium complex groups associated with faba beans. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-021-93123-w

Elsherbiny, E. A., Amin, B. H., Aleem, B., Kingsley, K. L., & Bennett, J. W. (2020). *Trichoderma Volatile Organic Compounds as a Biofumigation Tool against Late Blight Pathogen Phytophthora infestans in Postharvest Potato Tubers*. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03150

Encalada, E. (2016). *"Evaluación de dos especies de Trichoderma para el manejo de enfermedades fúngicas que afectan al cultivo del tomate (Solanum lycopersicum Mill) a nivel radicular en condiciones de invernadero." TESIS*. Universidad de Cuenca.

Erayya, Shukla, N., Arzoo, K., & Kumar, J. (2018). *Mass screening of Trichoderma spp . for their antagonism against some plant pathogenic oomycetes fungi*. *10*(3), 813–817. https://doi.org/10.31018/jans.v10i3.1718

FAO. (2022). *Doubling global potato production in 10 years is possible*. 30/05/2022. https://www.fao.org/newsroom/detail/doubling-global-potato-production-in-10-years-is-possible/en

Fernández-Larrea Vega, O. (2015). *Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario*. *62*, 96–100.

Finch, H. C., & Finch, A. N. (1987). *Los hongos comunes que atacn cultivos en América Latina* (Trillas (ed.); Primera).

Fontana, D. C., de Paula, S., Torres, A. G., de Souza, V. H. M., Pascholati, S. F., Schmidt, D., & Neto, D. D. (2021). Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. *Pathogens*, *10*(5), 1–28. https://doi.org/10.3390/pathogens10050570

García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M. R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C. J., & González-Esquivel, C. E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de Trichoderma y su potencial de biocontrol sobre Phytophthora infestans. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *35*(1), 58–79. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, *30*(5), 250–258. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003

Grünwald, N. J., & Flier, W. G. (2005). The biology of Phytophthora infestans at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 171–190. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906

Hernández-Soriano, M. C., Mingorance, M. D., & Peña, A. (2007). Interaction of pesticides with a surfactant-modified soil interface: Effect of soil properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *306*(1-3 SPEC. ISS.), 49–55.

https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.11.030

INEC. (2020). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020*. Mayo, 2021. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion ESPAC 2020.pdf

Kamble, M. V., Joshi, S. M., Hadimani, S., & Jogaiah, S. (2021). Biopriming with rhizosphere Trichoderma harzianum elicit protection against grapevine downy mildew disease by triggering histopathological and biochemical defense responses. *Rhizosphere*, *19*(July), 100398. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100398

Ketta, H. A., & Hewedy, O. A. E. R. (2021). Biological control of Phaseolus vulgaris and Pisum sativum root rot disease using Trichoderma species. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*(1). https://doi.org/10.1186/s41938-021-00441-2

Ma, E., Hz, A., Hm, E., & Ie, E. (2016). Biological Control of Potato Late Blight by Means of Induction Systemic Resistance and Antagonism . *Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences*, *7*(1338), 1338–1348.

Mahoma, M., Wahab, R. A., Huyop, F., Rusli, M. H., Nuratiqah, S., Yaacob, S., & Teo, L. (2022). *J. Protección de cultivo. 2022, 11 (1): 1-27*_____. *11*(1), 1–27.

Majeed, A., Siyar, S., & Sami, S. (2022). Late blight of potato: From the great Irish potato famine to the genomic era - An overview. *Hellenic Plant Protection Journal*, *15*(1), 1–9. https://doi.org/10.2478/hppj-2022-0001

Manawasinghe, I. S., Phillips, A. J. L., Xu, J., Balasuriya, A., Hyde, K. D., Stępień, Ł., Harischandra, D. L., Karunarathna, A., Yan, J., Weerasinghe, J., Luo, M., Dong, Z., & Cheewangkoon, R. (2021). Defining a species in fungal plant pathology: beyond the species level. *Fungal Diversity*, *109*(1), 267–282. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00481-x

Marín, P. (2016). Pruebas Microbiológicas Y Fisico - Químicas Para El Control De Calidad De Hongos Entomopatógenos. *Control*, *March 2002*, 1–18.

Márquez, A. (2021). Gaceta Nas Jomé. *Gaceta Nas Jomé*. https://ingenieria.unicach.mx/views/images/source/GACETA NAS JOME/Gaceta XXIV.pdf#page=20

Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). Trichoderma spp. and their role in the control of crop pests. *Rev. Protección Veg*, *28*(1), 1–11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Afile:///C:/Users/usuario/Documents/Control Biologico de Trichoderma.pdf

Mena-Espino, X., & Couoh-Uicab, Y. (2015). Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en plantaciones bananeras en México, así como su efecto en el ambiente y la salud pública. *Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable*, *IX*(May), 91–98. https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/594

Miguel-Ferrer, L., Romero-Arenas, O., Andrade-Hoyos, P., Sánchez-Morales, P., Rivera-Tapia, J. A., & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Antifungal activity of Trichoderma harzianum and T. koningiopsis against Fusarium solani in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *39*(2).

https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2101-5

Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., & Contreras-Paredes, C. A. (2020a). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of Trichoderma harzianum. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *38*(3), 434–449. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7

Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., & Contreras-Paredes, C. A. (2020b). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of Trichoderma harzianum. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *38*(3), 1–16. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7

Mukhopadhyay, R. (2020). *Trichoderma : un agente antifúngico beneficioso y conocimientos sobre su mecanismo de potencial de control biológico*. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x

Ngo, T., Van Nguyen, M., Han, J. W., Park, M. S., Kim, H., & Choi, G. J. (2021). In vitro and in vivo antifungal activity of sorbicillinoids produced by trichoderma longibrachiatum men. *Journal of Fungi*, *7*(6). https://doi.org/10.3390/jof7060428

Purwantisari, S., Priyatmojo, A., Sancayaningsih, R. P., Kasiamdari, R. S., & Budihardjo, K. (2018). *The Resistance of Potatoes by Application of Trichoderma viride Antagonists Fungus*. *14*(July 2013).

Racines, M., Cuesta, X., Rivadeneira, J., & Pantoja, J. L. (2021). *IX Congreso Ecuatoriano de la Papa Agrobiodiversidad y Nutrición ARTÍCULOS DEL IX-CEP-2021 Libro de Memorias Organizado por :* https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5746/1/iniapsc407.pdf

Ramon, P., Enrique, T., Teresa, A., Alberto, G., Laura, M., Manuel, L., & Articulo, D. (2011). *Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabólicos de Trichoderma inhamatum Bol12 QD sobre cepas nativas de Phytophthora infestans in vitro Assessment of metabolic capacity of Trichoderma inhamatum Bol12 QD biocontrol on native strains of Phytophth*. 26–33.

Ribas, B. (2010). *Desfoliantes. Agente Naranja. Otros agresivos químicos y su control* (pp. 431–450). https://core.ac.uk/download/pdf/230316143.pdf

Ritika, B., & Utpal, D. (2014). An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(17), 1749–1762. https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6356

Rodriguez, D., & Gato, Y. (2010). Métodos Alternativos En La Conservación De Trichoderma Harzianum Rifai. *Fitosanidad*, *14*(4), 241–246.

Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. D. J., Olivas-Orozco, G. I., Acosta-Muñiz, C. H., Sepúlveda-Ahumada, D. R., Pérez-Corral, D. A., & Rios-Velasco, C. (2018). Effect of Trichoderma spp . and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Mexican Journal of Phytopathology*, *36*, 444–456.

Sabando-Ávila, F., Molina-Atiencia, L. M., & Garcés-Fiallos, F. R. (2017). Trichoderma harzianum en pre-transplante aumenta el potencial agronómico del cultivo de piña. *Revista Brasileirade Ciencias Agrarias*, *12*(4), 410–414.

https://doi.org/10.5039/agraria.v12i4a5468

Sanabria Velázquez, A. D. (2020). Evaluation of Paraguayan native strains of Trichoderma spp. for the control of Colletotrichum spp. causal agent of strawberry anthracnose. *Investigación Agraria*, *22*(1), 53–62. https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2020.junio.53-62

Torres, E. J. P., Cabrera, A. B., Virelles, P. M., Mora, M. L., Reyes, Y. S., & Santana, R. C. (2017). Actividad antagónica de Trichoderma harzianum Rifai sobre el agente causal del tizón del arroz (Pyricularia grisea Sacc.). *Centro Agrícola*, *44*(3), 13–19.

Turpo, J. E., & Solano, F. (2016). *Artículo científico frente a Asperisporium caricae (Speg .) Maubl . y Sclerotium rolfsii*. *1*(1), 1–7.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002

Webster, P. (1992). *Estudio de la acción de dos fungicidas vegetales y dos químicos sobre dos especies fungales de tomate de árbol*. Universidad de Cuenca.

Wright, D., & Welbourn, P. (2002). Environmental toxicology. *Cambridge Environmental Chemistry Series/11. Cambridge: University Press*, 621. https://doi.org/10.1017/CBO9780511805998

Yan, L., & Khan, R. A. A. (2021). Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, Trichoderma harzianum. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*(1). https://doi.org/10.1186/s41938-020-00351-9

Yan, Y., Mao, Q., Wang, Y., Zhao, J., Fu, Y., Yang, Z., Peng, X., Zhang, M., Bai, B., Liu, A., Chen, S., & Ahammed, G. J. (2021). Trichoderma harzianum induces resistance to root-knot nematodes by increasing secondary metabolite synthesis and defense-related enzyme activity in Solanum lycopersicum L. *Biological Control*, *158*(February), 104609. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104609

Yao, Y., Li, Y., Chen, Z., Zheng, B., & Zhang, L. (2015). *Biological Control of Potato Late Blight Using Isolates of Trichoderma*. https://doi.org/10.1007/s12230-015-9475-3

ЛЕОНОВ, Н. Н. (2021). Биологизированный Контроль Основных Болезней Алычи Во Влажных Субтропиках Краснодарского Края. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, *56*(5), 990–998. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.5.990rus