



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

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA *in vivo* DE *Trichoderma harzianum* Y *Pseudomona fluorescens* EN CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum L.*) VARIEDAD CHAUCHA MEDIANTE BIOAPLICACIONES PERIÓDICAS PARA EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*, AGENTE CAUSAL DE TIZÓN TARDÍO”

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

AUTORA: NICOLE CAROLINA UYAGUARI GUARTATANGA

TUTOR: ING. VICENTE HERNÁN AVILÉS LANDÍVAR, MSc.

Cuenca - Ecuador

2022

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Nicole Carolina Uyaguari Guartatanga con documento de identificación N° 0106424088, 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, 01 de noviembre del 2022

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carolina U.", is written over a horizontal line.

Nicole Carolina Uyaguari Guartatanga

0106424088

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

Yo, Nicole Carolina Uyaguari Guartatanga con el documento de identificación N° 0106424088, manifiesto 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 de la capacidad antagónica *in vivo* de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens* en cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad chaucha mediante bioaplicaciones periódicas para el control de *Phytophthora infestans*, agente causal de tizón tardío”, 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 entrega del trabajo en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 01 de noviembre del 2022.

Atentamente,



Nicole Carolina Uyaguari Guartatanga

0106424088

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Hernán Vicente Avilés Landívar con documento de identificación N° 0101401040, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA *in vivo* DE *Trichoderma harzianum* Y *Pseudomonas fluorescens* EN CULTIVO DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) VARIEDAD CHAUCHA MEDIANTE BIOAPLICACIONES PERIÓDICAS PARA EL CONTROL DE *Phytophthora infestans*, AGENTE CAUSAL DE TIZÓN TARDÍO”, realizado por Nicole Carolina Uyaguari Guartatanga con documento de identificación N° 0106424088, 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, 01 de noviembre del 2022

Atentamente,



Ing. Vicente Hernán Avilés Landívar, Mgs

0101401040

DEDICATORIA

En este estudio investigativo dedico a Dios por darme grandes bendiciones.

A mis padres Klever Uyaguari y Cecilia Guartatanga quienes han luchado a diario, y son mi pilar fundamental impartíendome enseñanzas y valores. Su amor, cariño, paciencia, y apoyo han permanecido presentes, motivándome a seguir con los altos y bajos en este transcurso importante de mi vida.

Nicole Carolina Uyaguari.

AGRADECIMIENTOS

A Andrea Torres, mi mejor amiga, quien ha estado presente a lo largo de este proceso investigativo, aconsejándome, motivándome y compartiendo gratos momentos en esta etapa

Universitaria.

A Mtr. Mateo León, amigo y futuro colega quien me ha enseñado, y compartido desinteresadamente sus conocimientos.

A mi tutor de tesis MSc. Hernán Avilés Landivar por orientarme, apoyarme, la paciencia y estar presente en cada etapa de este trabajo de investigación.

A mis amigos, que, aunque no aparecen con su nombre han aportado con de alguna manera haciendo de mi carrera universitaria una experiencia divertida y grandiosa.

Nicole Carolina Uyaguari.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	10
INDICE DE FIGURAS	11
INDICE DE GRÁDICAS.....	14
INDICE DE ANEXOS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMEN.....	17
ABSTRACT	18
CAPITULO 1	19
1 INTRODUCCION	19
1.1 Antecedentes.....	19
1.2 Problema de investigación.....	21
1.3 Pregunta de Investigación.....	22
1.4 Objetivos.....	23
1.5. HIPOTESIS	23
1.6. Justificación	24
1.7 Limitaciones	26
CAPITULOS 2	26
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	26
2.1 Estado del Arte	26

2.2 Bases teóricas	27
2.2.1.1 El cultivo de <i>Solanum tuberosum L.</i> en Ecuador.....	28
2.2.2.1 Clasificación Taxonómica <i>Solanum phureja</i>	29
2.2.2.2 Ciclo vegetativo de <i>Solanum tuberosum L.</i>	29
2.2.2.3 Requerimientos climáticos y edáficos	30
2.2.2.4 Siembra de la papa chaucha.....	32
2.2.2.5 Características Agronómicas	32
2.2.2.6 Principales problemas fitosanitarios del cultivo de <i>Solanum tuberosum L</i> en Ecuador.....	32
2.2.3.1 Reproducción y ciclo de vida	33
2.2.3.2 Sintomatología.....	34
2.2.3.3 Métodos de Control	36
2.2.4.1 Mecanismo de acción	38
2.2.4.2 <i>Trichoderma harzianum</i>	38
2.2.5.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	39
2.2.5.2 Clasificación taxonómica de <i>Pseudomona fluorescens</i>	40
CAPITULO 3	43
3 MARCO PROCEDIMENTAL	43
3.1 Nivel de investigación.	43
3.2 Procedimientos experimentales	45
3.2.1.1 Obtención de las cepas.....	46

3.2.1.2 Preparación de medios de cultivo	46
3.2.1.3 Inoculación de la cepa <i>Pseudomona fluorescens</i>	47
3.2.1.4 Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i>	52
3.2.2.1 Análisis físico-químico de las muestras de suelo	62
3.2.2.2 Preparación del terreno	63
3.2.2.3 Diseño de parcelas en lote experimental	63
3.2.2.4 Bioaplicaciones de los tratamientos a cultivos de <i>Solanum tuberosum L.</i> variedad chaucha	66
4 RESULTADOS Y DISCUSION	68
4.1. Determinar tres concentraciones de <i>Trichoderma harzianum</i> con <i>Pseudomona</i> <i>fluorescens</i>	68
4.2 Evaluación de incidencia y severidad de la enfermedad en el cultivo de <i>Solanum</i> <i>tuberosum L.</i>	69
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
5.1 CONCLUSIONES	83
5.2 RECOMENDACIONES	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86
ANEXOS.....	98

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>S. phureja</i>	29
Tabla 2: Etapas del cultivo <i>Solanum tuberosum</i> L	29
Tabla 3: Requerimientos climáticos y edáficos para un adecuado crecimiento vegetativo de <i>Solanum tuberosum</i> L	31
Tabla 4: Características agronómicas de la variedad <i>S. phureja</i>	32
Tabla 5: Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> sp.	37
Tabla 6: Clasificación taxonómica de <i>Pseudomona fluorescens</i>	40
Tabla 7: Escala diagramática de severidad para la evaluación de <i>Phytophthora infestans</i> en el follaje de papa en campo.	42
Tabla 8: Coordenadas geográficas del área experimental	44
Tabla 9: Tratamientos establecidos para la aplicación de las 3 concentraciones de <i>Trichoderma harzianum</i>	63
Tabla 10: Concentración muestral para los distintos tratamientos.....	69
Tabla 11: Prueba de normalidad realizada en el programa INFOSTAT.....	70
Tabla 12: Coeficiente de viabilidad	71
Tabla 13: Análisis de la varianza en el programa SPSS	72
Tabla 14: Prueba T student	72
Tabla 15: Prueba de Test de Tukey en programa SPSS.....	72
Tabla 16: Prueba de normalidad realizada en el programa INFOSTAT.....	77
Tabla 17: Coeficiente de viabilidad	78
Tabla 18: Análisis de varianza realizado en el programa SPSS.....	78
Tabla 19: Prueba T student	79
Tabla 20: Prueba de Test de Tukey en programa SPSS.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo vegetativo de <i>Solanum tuberosum</i> L.	30
Figura 2: Esporangios de <i>Phytophthora infestans</i>	33
Figura 3: Ciclo patológico <i>Phytophthora infestans</i>	34
Figura 4: Desarrollo inicial de <i>Phytophthora infestans</i> en los folículos	35
Figura 5: Contusiones necróticas en el envés de un foliolo mostrando el desarrollo de mildiú blanquecino y lesión necrótica en el haz de otro foliolo	35
Figura 6: Lesión necrótica ocasionada por <i>Phytophthora infestans</i> en el tallo	36
Figura 7: Niveles de severidad en hojas por infecciones fúngicas descrito por James 1971..	42
Figura 8: Ubicación del área experimental	44
Figura 9: Cepas <i>Pseudomona fluorescens</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> solicitadas.	46
Figura 10: Medios de enriquecimiento PDA y TSA previas a la colocación en placas petri y tubos de ensayo	47
Figura 11: Cepas <i>Pseudomona fluorescens</i> después de las 48 h de incubación	47
Figura 12: Resultados de la identificación microscópica de <i>Pseudomona fluorescens</i> mediante a) Tinción de Gram (-): las bacterias gran negativas con coloración rosado intenso, células en forma de cocos. b) la Prueba de Catalasa en la parte izquierda la inoculación de la bacteria con peróxido de hidrogeno y en derecha con solución salina.	49
Figura 13: Inoculación bacteriana en tubos de vidrio con medio TSB luego de la incubación de 48h a T° 30°C	50
Figura 14: Precipitado bacteriano en el fondo de los tubos	50
Figura 15: Preparación de solución madre suspendida con precipitado bacteriano y agua peptonada	51
Figura 16: Diluciones seriadas por duplicado previa a la medición de la absorbancia.	52

Figura 17: Medios de cultivo invertidos dispensados con PDA antes de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> .	53
Figura 18: Observación del envés <i>Trichoderma harzianum</i> con coloración verde propia del hongo.	54
Figura 19: Observación del envés <i>Trichoderma harzianum</i> con coloración amarillo blanquecino.	54
Figura 20: Técnica de la Cinta Adhesiva para la determinación de las estructuras microscópicas.	55
Figura 21: Identificación microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i> en el laboratorio	57
Figura 22: Preparación masiva de inóculos fúngicos.	58
Figura 23: Aumento de biomasa luego de la inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> .	58
Figura 24: transferencia del lavado esporas para para preparación de la solución stock	59
Figura 25: Preparación de solución madre de <i>Trichoderma harzianum</i>	59
Figura 26: Diluciones seriada de <i>Trichoderma harzianum</i> por duplicado	60
Figura 27: Observación de esporas en el microscopio con lente de 40X.	61
Figura 28: Enfoque de esporas <i>Trichoderma harzianum</i>	61
Figura 29: Preparación y almacenamiento de las concentraciones de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	62
Figura 30: Preparación del terreno antes de la siembra	63
Figura 31: Repartición de los tratamientos en bloques	64
Figura 32: Distancia de siembra de parcela, plantas y surcos.	65
Figura 33: Contabilización de hojas sanas e infectadas para la evaluación y monitoreo de incidencia y severidad década tratamiento	67

Figura 34: Muerte de cultivo de <i>Solanum tuberosum</i> L. por el ataque de <i>Phytophthora</i> infestans en tratamiento 4.....	67
Figura 35: Identificación de Cepa <i>Pseudomona fluorescens</i>	100
Figura 36: Identificación de Cepa <i>Trichoderma harzianum</i>	100
Figura 37: Primera fumigación de cultivos en la semana 3 después de la siembra	101
Figura 38: Segunda fumigacion de cultivos.....	101
Figura 39: Tercera fumigacion de cultivos	102
Figura 40: Primeras visualizaciones de incidencia y severidad cultivos	102
Figura 41: Floración del cultivo <i>Solanum tuberosum</i> L	103
Figura 42: Severidad en hojas de planta de papa escogidas al azar de cada tratamiento.....	105

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Prueba de Ryan-Joiner indicando el supuesto de normalidad sobre la incidencia realizada en el programa Minitab Statistical Software.....	70
Gráfica 2: Análisis de Tukey para la comparación de medias de cada tratamiento.....	74
Gráfica 3: Grafica de residuos tras el análisis de la varianza de un solo factor.....	75
Gráfica 4: Prueba de normalidad de severidad en hojas de Solanum phureja.	77
Gráfica 5: Análisis de Tukey para la comparación de medias de cada tratamiento.....	80
Gráfica 6: Grafica de residuos tras el análisis de la varianza de un solo factor.....	81

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Resultado de los análisis del suelo	98
Anexo 2: Capa enviadas por los laboratorios de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito	100
Anexo 3: Bioaplicaciones semanales de los tratamientos desde la brotación de hojas hasta el inicio de floración.....	101
Anexo 4: Evaluación de la severidad por tratamiento	104

LISTA DE ABREVIATURAS

PDA: Medio de cultivo Agar papa dextrosa

TSA: Medio de cultivo Agar Triptona-Soja

TSB: Caldo de soya tríptica

T1: Tratamiento 1

T2: Tratamiento 2

T3: Tratamiento 3

T4: Testigo

RESUMEN

En el Ecuador una de las principales enfermedades que se presenta en el entorno agrícola de *Solanum tuberosum L.*, es el fitopatógeno *Phytophthora infestans*, para el cual, los agricultores optan por métodos de control populares mediante la sobredosificación con pesticidas sintéticos, ocasionando la acumulación de estos químicos en la cadena alimentaria, dando como resultado efectos negativos en la salud y el medio ambiente. Sin embargo, los enfoques sostenibles y ecológicos, como el uso de microorganismos beneficiosos, han ganado una atención significativa en todo el mundo. Dentro de este marco, en el presente trabajo experimental se evaluó la capacidad antagónica *in vivo* de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* en cultivos de *Solanum tuberosum L.* como agentes de biocontrol contra de *P. infestans*, lo cual tuvo lugar en la parroquia rural de San Bartolomé localizada en el cantón SigSig, se determinaron tres concentraciones de *Trichoderma harzianum* en combinación con *Pseudomona fluorescens* mismas que fueron aplicadas en las parcelas con diferentes tratamientos durante dos meses consecutivos, se planteó 4 repeticiones por cada tratamiento y el testigo referencial, por consiguiente se realizó una cuantificación sistemática de la incidencia y severidad de la mancha necrótica en las hojas de las plantas para terminar con un modelo estadístico en la cual, se determinó que la concentración más viable en el bio control contra *P. infestans* es la del tratamiento T2 con una concentración de 10^6 , en contraposición a los tratamientos T1 con una concentración de 10^4 y T3 con 10^8 , puesto que su porcentaje de incidencia y severidad resulto menor en comparación a los dos tratamientos ya mencionados.

Palabras Claves: incidencia, severidad, micoparasitismo, antagónico, fitopatógeno.

ABSTRACT

In Ecuador, one of the main diseases occurring in the agricultural environment of *Solanum tuberosum* L, is the phytopathogen *Phytophthora infestans*, for which farmers opt for popular control methods by overdosing with synthetic pesticides, causing the accumulation of these chemicals in the food chain, resulting in negative effects on health and the environment. However, sustainable and environmentally friendly approaches, such as the use of beneficial microorganisms, have gained significant attention worldwide. Within this framework, the present study evaluated the *in vivo* antagonistic ability of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* on *Solanum tuberosum* L. crops as biocontrol agents against *P. infestans*, which was carried out in the rural parish of San Bartolomé located in the SigSig canton, three concentrations of *Trichoderma harzianum* in combination with *Pseudomonas fluorescens* were determined and applied in the plots with different treatments during two consecutive months, 4 repetitions were proposed for each treatment and the referential control, therefore a systematic quantification of the incidence and severity of the necrotic spot on the leaves of the plants was carried out to finish with a statistical model in which it was determined that the most viable concentration in the biocontrol against *P. infestans* is that of treatment T2 with a concentration of 10^6 , as opposed to treatments T1 with a concentration of 10^4 and T3 with 10^8 since its percentage of incidence and severity was lower compared to the two treatments already mentioned.

Keywords: incidence, severity, mycoparasitism, antagonist, phytopathogen.

CAPITULO 1

1 INTRODUCCION

1.1 Antecedentes

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es uno de los cultivos alimentarios más fundamentales en el Ecuador y el mundo (Totsky et al., 2020), motivo por el cual ha incrementado su producción y consumo, constituyendo un factor importante en el desarrollo y subsistencia de la sociedad actual (Syed et al., 2018).

En el año 2020, la producción de *Solanum tuberosum L* en el Ecuador se generó 408,313 ton, con una área cosechada de 24.882 ha y un promedio de 14 t ha⁻¹ (Cuesta & Rivadeneira, 2021). En la zona central andina, las provincias que conforman la mayor superficie de cultivo de *Solanum tuberosum L* son, Chimborazo (19,39%), Carchi (18,96%), Tungurahua (14,98%), Cotopaxi (14,54%) y Pichincha (10,09%), representando el 83% del total de producción en el país (Abdo et al., 2021).

La destrucción de los recursos naturales avanza en vista de las afecciones que presentan las plantas mismos que juegan un papel directo en la agricultura, dependiendo de la fuente, se estima en un nivel de 10 a 40% anual (Ghorbanpour et al., 2018). Según Angamarca, (2019) en Ecuador, *Phytophthora infestans* es la enfermedad más importante de *Solanum tuberosum L.* debido a que esta plaga, sigue siendo difícil de controlar hoy en día, destruyendo gran parte de los sembríos de una superficie, en un periodo de tiempo aproximado de una o dos semanas, cuando las situaciones ambientales son óptimas y cuando no se aplica ningún método de control (Abdo et al., 2021) su alta adaptabilidad al huésped *S. tuberosum*. (Pacilly et al., 2016), produce una variedad de proteínas efectoras que pueden cambiar la fisiología del huésped, combatir su respuesta inmunitaria y facilitar la invasión (Du et al., 2021). En consecuencia, para prevenir pérdidas en los cultivos, los agricultores optan por el uso

intensivo de fertilizantes y pesticidas, causando modificaciones en las comunidades microbianas, infestando los suelos, el agua superficial y subterránea, es decir alteran sus propiedades físicas, químicas y biológicas, porque la mayoría son altamente tóxicos (Almanza et al., 2018).

Durante las últimas décadas, se ha introducido tecnologías microbiológicas en el cultivo de plantas, para reducir la aparición de enfermedades, examinando la efectividad y la practicidad de bacterias y hongos no patógenos con la esperanza de comercializarlos como Agentes de Control Biológico (BCAs) (Subedi et al., 2020). Como resultado de los estudios realizados, se han empleado cepas bacterianas y fúngicas como *Pseudomonas spp.* y *Trichoderma spp.* que controlan con éxito las enfermedades transmitidas por el suelo de cultivos valiosos, causadas por hongos, oomicetos, bacterias y nematodos (Niu et al., 2020).

La efectividad del uso de *Trichoderma* en la agricultura depende de su actividad metabólica y del tipo de interacción con las plantas y otros microorganismos. Estos hongos colonizan eficazmente el rizoplano, la rizosfera y las raíces de las plantas, y producen varios metabolitos con características antimicrobianas (enzimas que degradan la pared celular, antibióticos, compuestos volátiles y no volátiles) y bioestimulantes (fitohormonas, fitorreguladores). Además, *Trichoderma* es conocido por su absorción intensiva de los programas de raíces y la interacción no solo con microorganismos patógenos, sino también con todo el microbioma del suelo (Jaroszuk et al., 2019). Al mismo tiempo existen una diversidad de especies del género *Trichoderma* que son promotores del crecimiento vegetal, debido a que producen fitohormonas y la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa (Tyśkiewicz et al., 2022).

En el estudio bacteriano, las *Pseudomonas fluorescens* promueven el crecimiento de las plantas al suprimir los microorganismos patógenos, incluso sintetizan hormonas vegetales que estimulan el crecimiento y generan una mayor resistencia a las enfermedades de las plantas.

1.2 Problema de investigación

Las fitopatologías fúngicas relacionadas con las enfermedades de las plantas (Leal et al., 2018), causan un impacto total en la producción y economía del Ecuador y a nivel mundial (Vinchira & Moreno, 2019), es por esto que los agricultores, optan por el uso de productos con efecto biocida como son los agroquímicos, con el fin de desafiar dos importantes factores que son la productividad y sostenibilidad agrícola y así eliminar la presencia de fitopatógenos en los cultivos (Leal et al., 2018). Sin embargo, los efectos a largo plazo del uso excesivo de estas sustancias sintéticas, crean estragos en los seres humanos y el medio ambiente, razón por la cual, se considera que las plantaciones de *Solanum tuberosum L* en ciertas zonas del Ecuador son las principales causantes de graves eventos de contaminación ambiental (Paullán, 2010). Según Gutiérrez, (2018) determinó en su estudio que solo el 0,1% del producto artificial actúa en la plaga, mientras en el suelo y agua se almacena lo restante (Abdo et al., 2021).

En la zona central del Ecuador se produce grandes cantidades de *Solanum tuberosum L*. sin embargo, estos sembríos pueden llegar a ser destruidos en 10 a 15 días por la presencia de enfermedades principales de este cultivo, tal es el caso de *Phytophthora infesta*. En el año 2000, el 30% de las parcelas del cultivo de *Solanum tuberosum L* fueron atacadas por este fitopatógeno como resultado, los agricultores al desconocer de los ingredientes activos, empleaban altas cantidades de insumos externos que llegaban a ser tóxicos hasta en un 80% (Bustamante, 2015), lo que incide en una pérdida de resistencia a los plaguicidas por las altas dosis y por tanto, el control de *Phytophthora infestans* resulta ineficiente (Abdo

et al., 2021), Por otro lado, el Ecuador presenta condiciones ambientales apropiadas para el crecimiento de estos patógenos debido a la humedad que presenta (Ramírez et al., 2016). En la parte foliar de los cultivos, se presentan mayor impacto de la enfermedad ocasionando entre el 5 al 50 % en pérdidas de cosecha de los sembríos resistentes y en cultivares susceptibles de hasta el 100 % (Pino & Ortiz, 2006).

Esta investigación tiene como factor clave desarrollar nuevas estrategias de control biológico y bioproductos de calidad (Pedraza et al., 2017). Siendo una de estas estrategias el uso de Agentes de Control Biológico (BCAs), basados en microorganismos vivos o sus metabolitos, y productos de origen natural evaluando la capacidad antagónica para controlar las poblaciones fitopatógenos, incluso la evolución de nuevas y más virulentas variantes. Visto de esta forma el estudio impulsaría a futuras investigaciones que aporten a la productividad y aseguren la rentabilidad para el agricultor (Amerio et al., 2020).

1.3 Pregunta de Investigación

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

1.4 Objetivos

1.3.1 *Objetivo General:*

Evaluar *in vivo* la capacidad antagonica de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* frente a *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum L.*) variedad chaucha para el control biológico del agente causal de tizón tardío.

1.3.2 *Objetivos Específicos:*

- Determinar tres concentraciones de *Trichoderma harzianum* con *Pseudomona fluorescens* mediante ensayos *in vitro* para el uso en cultivos de *Solanum tuberosum L.*
- Monitorear el desarrollo de manchas foliares después de la aplicación de los tratamientos, generando una base de datos con los hallazgos, evaluando la incidencia y severidad de la enfermedad en el cultivo de *Solanum tuberosum L.*
- Establecer el porcentaje de inhibición *in vivo* de *Trichoderma harzianum* en combinación con *Pseudomona fluorescens* frente *Phytophthora infestans* en cultivos de *Solanum tuberosum L.* mediante un modelo estadístico determinando la concentración más eficiente.

1.5. HIPOTESIS

1.5.1 *Hipótesis Alternativa*

La bioaplicación de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* en cultivos de *Solanum tuberosum L.* inhibe el desarrollo fungoso razón por la cual pueden ser un sustituto a plaguicidas químicos para tratar la enfermedad de “Tizón tardío” (*Phytophthora infestans*) en el cultivo.

1.5.2 Hipótesis Nula

Los microorganismos *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* no son capaces de reducir la enfermedad de “Tizón tardío” (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de *Solanum tuberosum* L. en condiciones *in vivo*, descartando su utilización para el control biológico.

1.6. Justificación

Las alteraciones superficiales presentes en los cultivos, son causadas por diversos patógenas, mismas que al no ser controladas producirían la pérdida total de los sembríos incluso llegando a ser vía de entrada para otros microorganismos, siendo una de las enfermedades más importantes a tratar *Phytophthora infestans*. huésped principal de *Solanum tuberosum* L, por consiguiente, es necesario conocer sus sintomatologías y el ciclo de la enfermedad debido a que por ser potencialmente destructiva llegaría afectar el cultivo en cualquier etapa de su desarrollo. Los productos sintéticos son las principales opciones de control que implementan los agricultores, generando en la salud humana y el ambiente efectos negativos.

Existen microorganismos que presentan un comportamiento antagónico frente a estos patógenos los cuales son estudiados para determinar su potencial como agentes de biocontrol (García et al., 2018), en vista de que actúan a través de varios mecanismos complejos, como el micoparasitismo, la degradación de las paredes celulares de los patógenos, la competencia por nutrientes y espacio, y la inducción de resistencia de las plantas. Dicho de otra manera, el principal desafío es desarrollar alternativas de protección biológica (Tyśkiewicz et al., 2022) con el fin de limitar el uso de pesticidas químicos en el sector agrícola (Leal et al., 2018).

Como se evidencia anteriormente, el estudio de los mismos aportaría al desarrollo de la biotecnología verde, con un producto capaz de competir con las alternativas sintéticas.- Entre

los microorganismos no patógenos, se encuentran cepas del género *Trichoderma spp.* (Tyśkiewicz et al., 2022), que son elementos valiosos empleados en el sector agrícola como controladores biológicos, considerándolo como un candidato óptimo para su uso en tecnologías verdes, gracias a su capacidad para excretar enzimas exógenas que les permiten portarse como biopesticidas (Acurio & España, 2017), además de amplio potencial de biofertilización y bioestimulación (Tyśkiewicz et al., 2022), contribuyendo con el enriquecimiento del suelo (Yépez, 2019). Asimismo, se han reportado diferentes especies de *Pseudomonas fluorescens* que son capaces de disminuir estas afecciones que incluye la descomposición en los tubérculos de *Solanum tuberosum L.*, al originar diferentes metabolitos antifúngicos, también la producción de antibióticos resultando beneficioso ya que incita al crecimiento de las plantas, como agente de biocontrol de bacterias dañinas al originar el componente antimicrobiano 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (García et al., 2018).

En el desarrollo de la biotecnología industrial puede servir de base para en un futuro optimizar este proceso de obtención de biopesticidas y así obtener un biocontrolador con sustento científico y competitivo. - En relación con este tema, esta investigación pretende generar nuevas alternativas para la inhibición de *Phytophthora infestans*, en el cultivo de *Solanum tuberosum L.* con productos biológicos como *Trichoderma harzianum.* y *Pseudomonas fluorescens* (Yépez, 2019), mediante la manipulación exitosa de estos antagonistas, se busca una respuesta tanto viable como positiva en el ambiente e incluso, rentabilidad en las prácticas agrícolas para el beneficio económico. De la misma manera fomentar futuros estudios *in vivo* e *in situ* de carácter biotecnológico, proporcionando soluciones eficaces a los principales problemas patológicos que afectan al sector agrícola en el país (Amerio et al., 2020).

1.7 Limitaciones

El tiempo, el uso de laboratorios ya que pueden estar ocupados por otros tesisistas o actividades académicas y factores climáticos que afectaban el suelo, aplazando el cultivo de *Solanum tuberosum L.*

CAPITULOS 2

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Estado del Arte

Los microorganismos benéficos *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens* ha sido foco de estudio de varios autores, debido a que existe la necesidad de tratar las enfermedades producidas por fitopatógenos y así evitar el uso de agroquímicos en el sector agrícola

Calero, (2020) evaluó en su investigación la etapa en la que más agrede *Phytophthora infestans*, utilizando clones de *Solanum tuberosum L.*, (sensible CAPIRO, medianamente sensible SUPERCHOLA, medianamente tolerante INIAP-NATIVIDAD - tolerante INIAP-LIBERTAD). Observó durante el desarrollo e inicio de floración y tuberización la generación de gran cantidad follaje razón por la cual crea el microclima apropiado para la presencia de esta enfermedad.

Harris et al., (2020) evaluaron en su estudio cepas antagónicas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Phytophthora infestans*, realizaron pruebas de inhibición indirecta con *Trichoderma sp.* observando el crecimiento de inhibición en un 50%, mientras que independiente ambos microorganismos inhibieron el crecimiento en un porcentaje del 65%, por ultimo finalizaron con una combinación de *Pseudomonas sp.* y *Trichoderma sp.*,

tratamiento en el que presento una reducción en el crecimiento de la enfermedad en un 80 %-92 %, considerándolo como alternativa para realizar investigaciones en cultivos *in vivo*.

Takegne, (2018) realizó un estudio basado “En el antagonismo que presentaron los cultivos de *Solanum tuberosum L.* con aislamientos de *Pseudomonas spp.* frente al desarrollo de *Alternaria solani*, el crecimiento del patógeno disminuyó marcadamente destacando *Pseudomonas protegens Pf-5* por presentar los excelentes resultados en todas las pruebas realizadas.

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 el hongo *Trichoderma harzianum*, mostró mayor porcentaje de invasión contra *Alternaria sp.* y *P. infestans*, sin embargo *T. koningii* presento el porcentaje de invasión más bajo hacia los patógenos.

Villarraga & Sarmiento, (2019) mencionan en su estudio sobre la “Agencia de Protección Ambiental Estadounidense (EPA)”. Esta agencia consta de un registro total de 114 aislamientos de microorganismos benéficos, entre ellas *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas* (EPA, 2019). Dicho de otro modo, los productos que se utilizan para el reducir la presencia de fitopatógenos en los cultivos, tienen como ingredientes activos estos microorganismos debido a sus amplios espectros de acción, lo que permite ser distribuidos por compañías entre estas la Bayer CropScience, Novozymes, BASF y Syngenta.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Generalidades de *Solanum tuberosum L.*

Solanum tuberosum L. constituye un cultivo alimento básico e importante, posicionándose como cuarto a nivel mundial, detrás del trigo, arroz, y maíz. (Romero, 2019).

Según investigaciones recientes, el origen de *Solanum tuberosum L.* se centra en la parte norte de lago Titicaca, siendo cultivada en los Andes desde más de siete mil años. Los primeros agricultores manipularon genéticamente estos cultivos con el fin de obtener amplias variedades y adaptabilidad ambiental, logrando domesticar a la papa silvestre (PS) (Tenorio & De La Cruz, 2019). En Ecuador el 0,4% del suelo agrícola es usado para la producción de *Solanum tuberosum L.* con una superficie cosechada de 43.605 ha y un rendimiento de 16,3 toneladas por hectárea. Entre las principales provincias que dan lugar a este cultivo son Carchi, Tungurahua, Pichincha, Cotopaxi y Cañar, siendo la provincia del Carchi la zona que ofrece mayor producción nacional con una proporción del 32% y un productividad promedio de 27,50 t/ha (Solano, 2018).

2.2.1.1 El cultivo de *Solanum tuberosum L.* en Ecuador

A nivel nacional, cada zona origina diferentes tipos de *Solanum tuberosum L.* mismas que se clasifican en dos clases: mejoradas y nativas (Abdo et al., 2021). El 85% de trabajadores reciclan semillas de *Solanum tuberosum L.*, en cambio la semilla certificada es empleada por los productores únicamente en un 15%. Entre los cultivos de papas más empleados, se encuentra categorizada en un cuarto puesto a la papa chaucha, con un porcentaje del 6%, detrás de la papa leona, única, y la más producida por la agricultura la superchola con un 55% (Chulde, 2019).

2.2.2 *Solanum phureja*

La papa chaucha o criolla corresponde al grupo *Phureja*, son prematuros debido a que las cosechas se dan en el tiempo de 3 a 4 meses, se plantan a una altura 2 000 a 3 400 msnm, y tienen gran acogida por los proveedores por la buena calidad culinaria (Romero, 2019). El cultivo de la papa criolla es fundamental en el sistema de nutrición debido a que se utiliza en

la dieta diaria de una gran cantidad de habitantes en los países en vías de desarrollo (Abdo et al., 2021).

2.2.2.1 Clasificación Taxonómica *Solanum phureja*

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *S. phureja*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Subgénero	Potatoe
Especie	<i>S. phureja</i>
	Tuberosa

Fuente: (Márquez et al., 2020)

2.2.2.2 Ciclo vegetativo de *Solanum tuberosum L.*

Constante, (2020) menciona en su estudio las etapas del cultivo de, iniciando en el almacenamiento de la semilla y finiquitan al momento de la cosecha (Figura 1).

Tabla 2: Etapas del cultivo *Solanum tuberosum L*

Ciclo vegetativo del cultivo de <i>Solanum tuberosum L</i>	Sub-fases	Tiempo
Fase vegetativa	Brotación	15 a 90 días
	Emergencia	16 a 30 días
	Desarrollo	50 a 90 días
	Inicio floración y tuberización	100 a 120 días
Fase reproductiva	Fin floración y tuberización	120 a 140 días.
	Engrose los tubérculos	130 y 150 días.
Fase de maduración	Maduración y cosecha	125 hasta 200 días.

Fuente: Autor

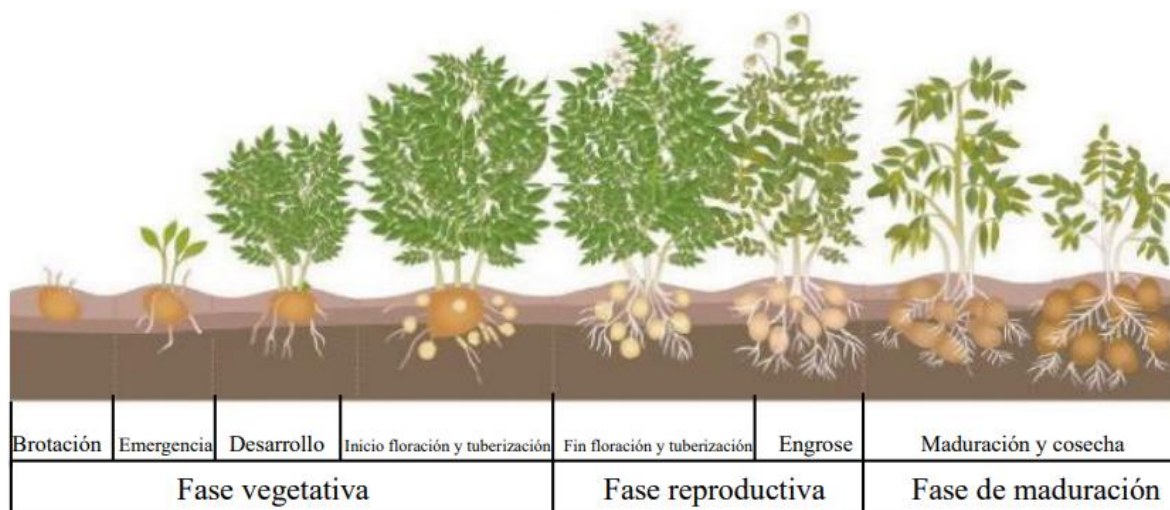


Figura 1: Ciclo vegetativo de *Solanum tuberosum* L.

Fuente: (Constante, 2020)

Los diferentes tipos de papa pueden tener cambios en la etapa de desarrollo por diferentes factores externos como la superficie donde son cultivadas, el tipo de semilla, los cambios climáticos, motivo por el cual los tiempos establecidos no serán puntuales. Esto quiere decir que en un periodo de 4 meses se desarrollan las variedades tempranas, a los 5 meses las variedades semitardías y las variedades tardías en un periodo de 6 meses o más, tomando en cuenta lugares templados el desarrollo será rápido y en lugares fríos el desarrollo del cultivo se alargará (Constante, 2020).

2.2.2.3 Requerimientos climáticos y edáficos

Debido a las temperaturas altas, invasión de insectos y patógenos, restricción de agua, salinidad de superficie se ven limitados el desarrollo de los cultivos de *Solanum tuberosum* L. y el rendimiento de los tubérculos (Dahal et al., 2019), de ahí que es necesario conocer sobre los requerimientos climáticos y edáficos que requieren los sembríos para su etapa de crecimiento (Romero, 2019), estos requerimientos son los siguientes:

Tabla 3: Requerimientos climáticos y edáficos para un adecuado crecimiento vegetativo de *Solanum tuberosum* L

Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Entre los 15 y los 25 °C para un óptimo desarrollo y rendimiento de tubérculos
Altitud	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Adaptación de cultivos a alturas entre los 1000 a 2400 m.s.n.m..
Vientos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Deterioro y pérdida de cultivos por presencia de vientos que superan los 20 km/h
Luz	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Si la intensidad de luz es mayor, la fotosíntesis será superior permitiendo la una buena tuberización y crecimiento vegetativo será duradero.
Precipitación	<ul style="list-style-type: none"> ▪ varían entre los 600 a 1000 milímetros los requerimientos de humedad en las plantaciones.
Pendiente del terreno	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se produciría retención de agua por las precipitaciones o el riego, por lo cual la velocidad y el volumen de agua de escorrentía incrementaría, ocasionando la erosión del suelo.
Suelo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ pH de 5.0 a 7.0 ▪ buen drenaje y ventilación ▪ suelos francos: arcillosos, arenosos y limosos. ▪ Materia orgánica del 3,5% ▪ densidad de 1.20 g/cm³ ▪ conductividad eléctrica inferior a 4 dS/m.
Profundidad de la siembra	<ul style="list-style-type: none"> ▪ profundidad apropiada es de 15 a 20 cm

Fuente: Autor

En el trabajo de García, (2018) menciona que los desórdenes fisiológicos que presentan las plantas son la respuesta ante las principales circunstancias del estrés, esto se puede notar al realizar un control cultural inapropiado en el desarrollo del cultivo, elevadas temperaturas, retención de humedad, selección de los cultivares susceptible, manejo o almacenamiento, el pH del suelo, producción inadecuada de nutrientes. También las alteraciones fisiológicas como la necrosis foliar, agrietamiento, cambio de color, entre otros, son la respuesta a un estrés nutricional en la vegetación producto de la lixiviación de nutrientes como el nitrato.

2.2.2.4 Siembra de la papa chaucha

La distancia entre surcos y plantas es importante debido a que evita la competencia por la luz y nutrientes, impide que se ocasione humedad relativa muy alta, favorece a una mejor sanidad del cultivo y optimiza su rendimiento. Es recomendable una distancia 1.20m entre surco y 0.50m entre plantas (Bautista et al., 2010).

2.2.2.5 Características Agronómicas

Tabla 4: Características agronómicas de la variedad *S. phureja*.

Zonas Recomendadas	Carchi, Pichincha y Chimborazo
Tiempo de floración	90
Tiempo de cosecha	120 temprana
Modo de crecimiento	Semirecto
Nº de tubérculo por planta	18
Requerimientos en campos de productores	4 4 a 10 T/ha

Fuente: (Paca, 2010)

2.2.2.6 Principales problemas fitosanitarios del cultivo de *Solanum tuberosum L* en Ecuador

El cultivo de *S. phureja*. es sensible a *Phytophthora infestans* (lancha), moderadamente tolerante a *Puccinia pittieriana* (roya), y resistente al (*Globodera padilla*) que es un nematodo presente en el quiste de la papa (Paca, 2010).

2.2.3 Tizón tardío, lanchar negra o gota

Phytophthora infestans es un patógeno de los oomicetos que causa el tizón tardío (S et al., 2022), evoluciona rápidamente y adaptándose al entorno del huésped (Hidalgo, 2017). Los síntomas del tizón tardío puede destruir toda la planta. En las hojas se pueden observar cómo lesiones o manchas necróticas empapadas de agua de color marrón oscuro (Manobanda, 2020). y las condiciones favorables para desarrollar esta enfermedad son zonas y épocas lluviosas combinadas de días templados, temperaturas bajas entre 15 y 22 °C y cultivo de variedades susceptibles acompañado de alta humedad relativa mayor al 80%. La

desaminación de esporas son una de las principales maneras de contagio, ya que al realizar el riego de agua, el viento cumple el trabajo de esparcirlas (Cadena, 2018).

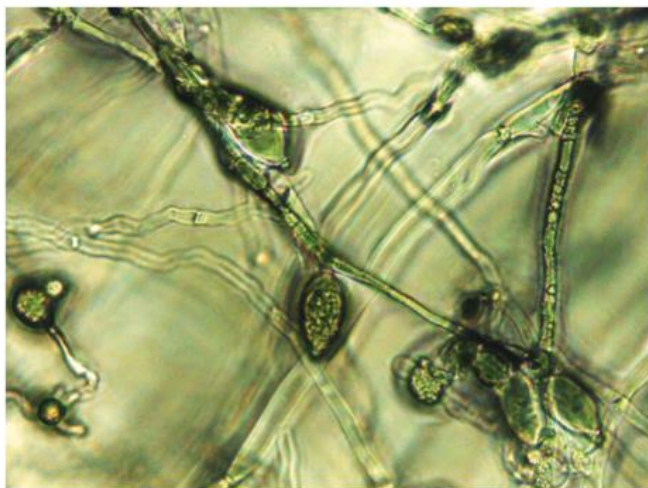


Figura 2: Esporangios de *Phytophthora infestans*

Fuente: (Chañag et al., 2018)

2.2.3.1 Reproducción y ciclo de vida

Debido a que *P. infestans* es un parásito específico del huésped, necesita tejido vegetal para crecer. Este patógeno se reproduce asexualmente. Su ciclo de vida generalmente comienza cuando los esporangios son transportados por el viento, aterrizando en el tejido vegetal y liberando sus zoosporas, lo cual, se denomina germinación indirecta. Generalmente no sobreviven viajes de larga distancia debido a la desecación y exposición a la radiación solar, por ende, las condiciones deben ser húmedas y frescas. Las esporas están biflageladas, presentando un flagelo largo como un latigazo que es característico de la oomicota y se propagan hasta que se enquistan en el huésped. Cuando las condiciones de temperatura son más cálidas, *P. infestans* infectará la planta por germinación directa, es decir, se formará un tubo germinativo a partir del esporangio y penetrará en el tejido del huésped, lo que le permitirá obtener nutrientes de su huésped como se muestra en la figura 2. La reproducción sexual puede ocurrir cuando ambos tipos de apareamiento están presentes. Los núcleos de anteridio y oogonio (las únicas partes haploides en el ciclo de vida de *P. infestans*) se

fusionarán (cariogamia) cuando el anteridio entre en el oogonio. Formarán una oospora diploide, que se convertirá en un esporangio y el ciclo continuará como lo haría asexualmente (Tenelema, 2017).

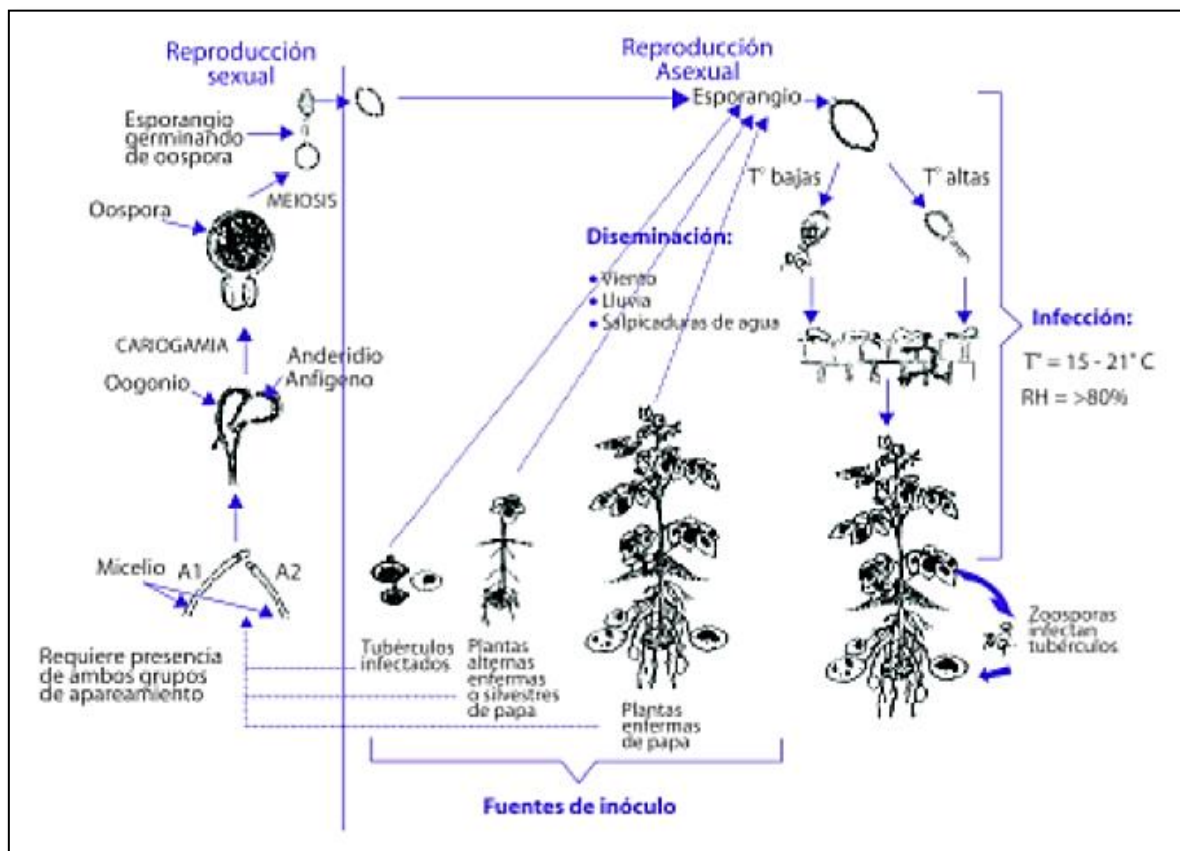


Figura 3: Ciclo patológico *Phytophthora infestans*

Fuente: (Jaramillo, 2022)

2.2.3.2 Sintomatología

En las hojas se pueden observar lesiones irregulares de tonalidad verde opaco generalmente desarrolladas en los filos y ápice de los folíolos que con el pasar del tiempo se aumentan velozmente, dando lugar a lesiones necróticas grandes de color pardo a negro rodeadas de un halo amarillento (Torres, 2002). En el haz y envés de las hojas se desarrollan un mildiú blanquecino, constituido por esporangioforos y esporangios (Figura 4 y 5). En la mayoría de las situaciones, las hojas que se encuentran en la base de la planta es donde comienza a

presentarse estas infecciones distribuyéndose rápidamente hasta alcanzar la zona alta de la planta, formando focos de infección (ICA, 2011).



Figura 4: Desarrollo inicial de *Phytophthora infestans* en los folículos

Fuente: (Torres, 2002)



Figura 5: Contusiones necróticas en el envés de un foliolo mostrando el desarrollo de mildiú blancuicino y lesión necrótica en el haz de otro foliolo

Fuente: (Torres, 2002)

En cambio, en los tallos, los síntomas se localizan en el tercio medio o superior de la planta con coloración oscuras continuas, con la posibilidad de cubrir los 10 cm de longitud o superiores a este (Figura 6). Los trabajadores al transitar y realizar ciertas actividades culturales, pueden quebrar los cultivos con facilidad ya que la consistencia de la planta se torna quebradiza y frágil. Además, las brisas al ser fuertes también influyen ruptura de la planta (Torres, 2002).



Figura 6: Lesión necrótica ocasionada por *Phytophthora infestans* en el tallo

Fuente: (Torres, 2002)

2.2.3.3 Métodos de Control

- Neira, 2022 menciona que para evitar el desarrollo de *Phytophthora infestans* en el Ecuador utilizan especies de *Solanum tuberosum L.* con características de resistencia con el fin de mejorar genéticamente estas variedades para un alto rendimiento vegetativo denominado un método de control genético.
- Gavilanes, (2015) menciona que control químico abarca el uso de productos sintéticos que permiten controlar infecciones ocasionadas por enfermedades de las patatas, disminuyendo la patología antes o después de su aplicación en cultivos, sin embargo, ocasiona efectos adversos en el consumo alimenticio de los seres humanos y daños en el entorno.
- En el control biológico ocurre la disminución de la densidad de los inóculos o las acciones de fabricación de enfermedades de un patógeno o parásito en su estado dinámico o estático, por parte de uno o más organismos, que se logra de forma natural o mediante la alteración del entorno, el huésped o el antagonista (Asad, 2022).

2.2.4 *Trichoderma spp*

Estos hongos son organismos anaerobios facultativos (Yépez , 2019), saprofitos de los suelos, ampliamente distribuidos de manera natural, e incluso pueden permanecer en diversos entornos a temperaturas elevadas. Cabe mencionar que, para la asimilación de nutrientes, *Trichoderma spp.* contribuye en la desintegración orgánica alrededor de la raíz, además no perjudica a los organismos útiles que favorecen al control de los patógenos. Asimismo, son capaces de resistir en ambientes con contenidos de productos químicos como los pesticidas (Sood et al., 2020) .

Para una óptimocrecimiento de *Trichoderma spp.* se debe cumplir ciertos parámetros que incluyen:

- Temperatura optima de crecimiento puede estar entre un rango de 15-35°C, siendo la más recomendable 25°C
- El porcentaje óptimo de humedad oscila entre el 20 y 80%, siendo la principal a 70%.
- pH: debe estar entre 6 – 7,5. Cuando el pH es superior a 7,0, es decir alcalino, el medio se torna ácido por la liberación de ácidos orgánicos (Yépez, 2019).
- La celulosa es la principal fuente para el Carbono (Riera, 2017).

De acuerdo a Infante, (2009) el género *Trichoderma spp.* se sitúa taxonómicamente en:

Tabla 5: Clasificación taxonómica de *Trichoderma spp.*

Reino	Fungi
División	Mycota
Subdivisión	Eumycota
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	Trichoderma

Fuente: (Infante, 2009)

2.2.4.1 Mecanismo de acción

De acuerdo a Infante et al., (2009) la acción biocontroladora que poseen estos organismos se debe a que actúan mediante la acción de distintos mecanismos deteniendo el avance de la enfermedad, siendo los principales el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por espacio y nutrientes, por tanto, la acción en contra del patógeno es directa. Asimismo, mencionan otros autores que la fabricación de compuestos inhibidores y secreción de enzimas son otros de los mecanismos que efectúan esta actividad biocontroladora.

- Micoparasitismo es el desarrollo del microorganismo antagónico sobre el patógeno, beneficiándose de nutrientes y desintegrando su pared celular por la acción de enzimas extracelulares.
- Competencia mecanismo antagónico que ocurre cuando distintos macroorganismos, antagonista – patógeno requieren del mismo recurso, en concreto espacio, luz, nutrientes como carbono, nitrógeno y hierro etc., por lo tanto, limita la sobrevivencia del otro.
- Antibiosis presencia de metabolitos o sustancias nocivas originados por la interacción directa de un organismo sobre otro de distinta especie.

2.2.4.2 *Trichoderma harzianum*

Este hongo anaerobio corresponde a la subdivisión Deuteromycetes, generalmente se localizan de forma natural en las superficies agrícolas, y en una amplia variedad de sustancias. Este hongo antagónico frente a microorganismos patógenos de cultivos, proporcionan múltiples beneficios para el control biológico en la agricultura, con esto se quiere decir que para retener o matar a los competidores del entorno y que viven en el suelo (micoparasitismo)

generalmente estos aislamientos fabrican secreciones tóxicas, que permiten en las plantaciones un rápido desarrollo y crecimiento (Salazar, 2018). También cabe señalar que son tolerantes a hábitats y ambientes extremos, incluso a sitios con contenidos característicos de pesticidas y otros compuestos artificiales.

2.2.5 *Pseudomona spp*

Son bacterias gramnegativas habitantes del suelo que pertenece al género de bacilos aerobios de la familia *Pseudomonadaceae*. conformada por varias especies entre las que cabe destacar, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *P. putida* (Pinzón, 2019). Este género tiene un gran potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presentando la capacidad de colonizar el sistema radicular vegetativo, fabrican biopelículas y son manipulables desde el punto de vista genético (Guerra et al., 2011). Algunas bacterias son capaces de vivir a temperaturas bajas, es decir son psicrófilos, en cambio otros por su alto valor taxonómico sintetizan sideróforos fluorescentes (Pinzón, 2019).

2.2.5.1 *Pseudomonas fluorescens*

Son bacterias aerobias, bacilos unicelulares, con eje largo recto o curvo, pero no helicoidal, motilidad por uno o más flagelos polares, gramnegativos, no formadores de esporas, tallos o vainas (Kumar et al., 2019). Son bacterias que elaboran sustancias estimuladoras del crecimiento denominándolas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Las auxinas, giberelinas y citoquininas son los componentes principales de las hormonas que generan estas bacterias (Pérez et al., 2015). Además, son excelentes colonizadoras es por ello que abundan en suelos y raíces, no son difíciles de manipular genéticamente, mediante la producción de sideróforos y antibióticos permiten reducir la acción de fitopatógenos, actuando como inoculante para su aplicación, además presenta una amplia tasa de crecimiento. Los

principales mecanismos para el biocontrol en los cultivos, se basa en la reducción de metabolitos secundarios y en la inducción de resistencia sistemática de la planta (León, 2014).

Pseudomonas fluorescens favorece su desarrollo a temperaturas que oscilan entre los 25 a 30 °C, sin embargo, puede variar el rango de temperatura de 5 hasta 42 °C. El pH deber ser neutro y en condiciones ácidas interrumpe su crecimiento pH: 4,5 (Álvarez et al., 2015).

2.2.5.2 Clasificación taxonómica de *Pseudomona fluorescens*

Según Pérez, (2015) *Pseudomonas fluorescens*. se clasifica taxonómicamente en:

Tabla 6: Clasificación taxonómica de *Pseudomona fluorescens*

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

Fuente: (Pérez et al., 2015)

2.2.6 Antagonismo microbiológico

Cantillo, (2018) menciona que un organismo debe ser considerado como antagonista cuando cumple con ciertas características generales:

1. Capacidad rápida de colonizar plantas y poder permanecer en la misma zona.
2. Alcanzar mayor competencia de nutrientes frente al patógeno
3. Capacidad de habitar bajo diversos escenarios ambientales

Asimismo Cantillo, (2018) mencionan que un microorganismo antagonista debe constar de características específicas, como son las siguientes:

1. Mantenerse genéticamente estable
2. Eficiencia al trabajar a concentraciones bajas
3. Flexible en los requerimientos nutricionales
4. Sobrevivir a un ambiente en condiciones desfavorables
5. Efectividad frente a una gran cantidad de organismos patógenos
6. Poder reproducirse en medios de crecimiento que sean económicos
7. Conservar una formulación por un prolongado tiempo de su vida
8. De fácil empleo sin esperar a que origine metabolitos secundarios que sean tóxicos para los seres humanos y animales
9. No ser una amenaza para la planta huésped.

2.2.7 Incidencia y severidad en hojas

- **Incidencia:** Porcentaje de hojas cubierta por síntomas
- **Severidad:** Porcentaje de superficie de la hoja cubierta por síntomas

La incidencia consiste en evaluar el porcentaje de hojas infectadas por planta realizando una cuantificación total de las hojas, seguida por una cuantificación de las hojas infectadas empleando la siguiente ecuación (Martínez, 2019)

Formula:

- I: Incidencia
- HE: Total de hojas enfermas por planta
- HT: Número total de hojas por planta

$$I = \frac{HE}{HT} \times 100$$

Por otro lado, la severidad consiste en el determinar el porcentaje del área del tejido infectado mediante un diagrama visual y una escala diagramática como se puede observar en la Tabla 7. La información que será guía para la evaluación de la severidad, será el descrito por James (1971), citado por Gabriel et al., (2020) (Figura 7).

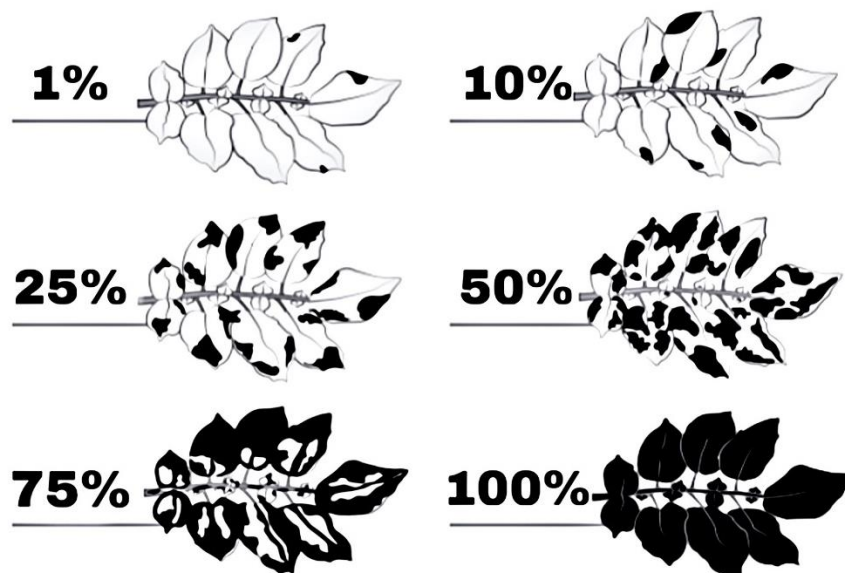


Figura 7: Niveles de severidad en hojas por infecciones fúngicas descrito por James 1971.

Fuente: (Gabriel et al., 2020)

Tabla 7: Escala diagramática de severidad para la evaluación de *Phytophthora infestans* en el follaje de papa en campo.

Escala	Porcentaje	Descripción de daño
1	1%	3 a 5 lesiones pequeñas presentes en el área del tejido
2	10%	10 a 15 lesiones
3	25%	Lesiones intermedias alrededor de la superficie
4	50%	La mitad de la hoja está cubierta de la infección
5	75%	La superficie de la hoja presenta mínima coloración verde
6	100%	Área foliar completamente cubierta con la infección

Fuente: Autor

CAPITULO 3

3 MARCO PROCEDIMENTAL

3.1 Nivel de investigación.

3.1.1 Diseño de investigación

La presente investigación fue un diseño de tipo experimental cuantitativo debido a que las variables dependientes se modifican por aplicación de las variables independientes, es decir el estudio tiene como objeto evaluar e interpretar el porcentaje de inhibición del patógeno o la reducción de incidencia de la mancha necrótica foliar causada por la enfermedad de *Phytophthora infestans* en cultivos de *Solanum tuberosum L.* con la inoculación de dos tipos de agentes antagonistas *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* a diferentes concentraciones, se dará a conocer el efecto beneficioso al aplicar en combinación, lo cual, brindará la información idónea y suficiente para obtener resultados verídicos.

3.1.2 Población y muestra

La fase de campo al cabo ente los meses de mayo y julio considerando limitada el tiempo e intervención de factores climáticos. El lote escogido para la siembra de los cultivos de *Solanum tuberosum L.*, se encuentra ubicada en la parroquia rural de San Bartolomé, cantón SigSig, provincia del Azuay (Figura 7), teniendo como muestra representativa de 1152 semillas variedad chaucha obtenidas en el mercado de la Feria Libre y características propias de la investigación tales como: medición del área, ubicación, altura aproximada, clima, y las coordenadas geográficas. Las cepas *Trichoderma harzianum* y *Pseudomona fluorescens* fueron enviadas desde los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito mediante la Ing. Laura Elizabeth Huachi Espín tomando en cuenta los parámetros de conservación y contaminación. La población se considera limitada por el tiempo.

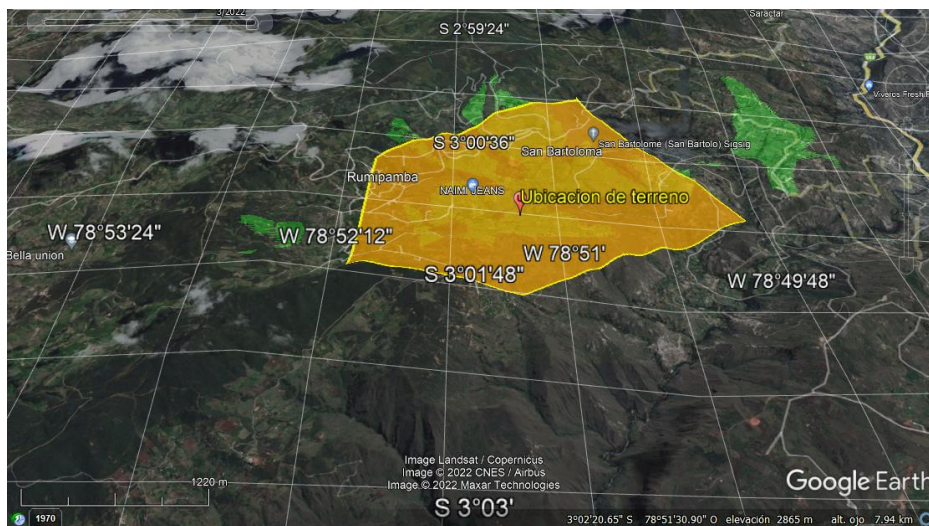


Figura 8: Ubicación del área experimental

Fuente: (Google Earth, 2022)

Tabla 8: Coordenadas geográficas del área experimental

Coordenadas	
Latitud (Y):	3°1'10"
Longitud (X):	78°51'13"
Altura:	2690m

Fuente: Autor

3.1.3 Variables

- **Variable Dependiente:** Porcentaje de incidencia y severidad en cultivos de *Solanum tuberosum L.* con mancha necrótica del desarrollo de *Phytophthora infestans*.
- **Variable Independiente:** Inoculación de microorganismos antagonistas: *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*.
- **Variable Intervenientes:** Temperatura, humedad, clima.

3.1.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se maneja la técnica de observación documental, recopilando los datos de interés mediante una matriz que ordene la información por etapas, tablas estadísticas y revisión bibliográfica de revistas, artículos científicos, manuales, tesis, libros tanto en español, inglés, y portugués, explorando en las bases científicas como son: SCIELO, PubMed, SCOPUS, y ScienceDirect,

Dialnet, Springer, Google Escolar enfocada a investigaciones desde el año 2018 hasta el 2022 y programas de referencia bibliografía como Zotero. Adicionalmente, la parte práctica del proyecto será evidenciado en conjunto con instrumentos como fotografías, diarios de campo, fichas de laboratorio, y videos.

3.1.5 Métodos de manejo estadístico de datos

Se procedió a clasificar, analizar y tabular los datos recopilados, mediante la utilización del programa estadístico Minitab Statistical Software. Se realizó el test de Ryan-Joiner, que es una prueba similar a Shapiro Wilk para analizar y asegurar que los datos provienen de una población normal, una vez que se afirmó el supuesto, se empleó un modelo estadístico ANOVA para el análisis de varianza del Diseño Completamente al Azar (DCA).

Al confirmarse que estadísticamente hubo diferencias significativas, por último, el porcentaje de inhibición entre tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey 5%, en los programas de INFOSTAT y SPSS.

Según los datos obtenidos, se realizaron diferentes pruebas estadísticas con el fin de alcanzar un nuevo enfoque en cuanto a la aplicación de la combinación de estos dos microorganismos de interés biotecnológico, los diferentes porcentajes para los distintos tratamiento tanto de incidencia como severidad demostraron si se puede aplicar a nivel *in situ* en los cultivos de *Solanum tuberosum L.*, ya que estos al ser elevados o bajos permitieron llegar a una conclusión que aporte a futuras investigaciones.

3.2 Procedimientos experimentales

El desarrollo de la parte experimental se realizó en dos fases: La primera fase es de laboratorio y la segunda fase es de campo abierto, donde se realizaron los procesos de reactivación, caracterización, cuantificación, y conservación de las cepas de estudio *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*.

3.2.1 FASE DE LABORATORIO

3.2.1.1 Obtención de las cepas

Las cepas de *Pseudomona fluorescens* y *Trichoderma harzianum* fue solicitada a la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, esta fue resembrada e incubada en el caso del hongo a 25 °C por 10 días y la bacteria por 24h.

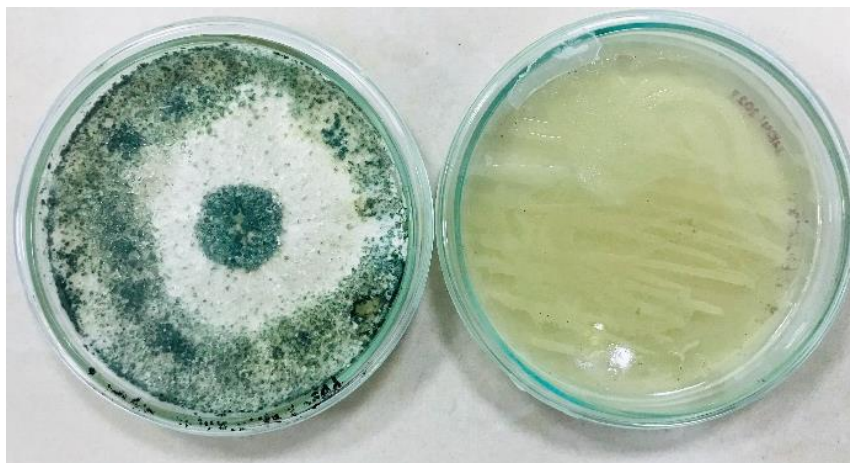


Figura 9: Cepas *Pseudomona fluorescens* y *Trichoderma harzianum* solicitadas.

Fuente: Autor

3.2.1.2 Preparación de medios de cultivo

En el caso de las bacterias se utilizó el medio de cultivo TSA: (Trypticase Spy Agar), utilizando un matraz de 250 ml se disolvió 4,8 g de TSA en 120 de agua destilada estéril, se mezcló bien hasta disolver los grumos del medio y se autoclavó durante 20 min.

En el caso del hongo se utilizó el medio de cultivo PDA, utilizando un matraz de 250 ml se disolvió 4,7 g de PDA en 120 ml de agua destilada estéril. Se mezcló bien hasta disolver el medio completamente y se autoclavó durante 20min.

Por último, se sometieron las cepas a los medios de enriquecimientos para reactivar su desarrollo.



Figura 10: Medios de enriquecimiento PDA y TSA previas a la colocación en placas petri y tubos de ensayo

Fuente: Autor

3.2.1.3 Inoculación de la cepa *Pseudomona fluorescens*

Para la inoculación de la cepa *Pseudomona fluorescens*, en la cámara de flujo laminar, se utilizó una asa microbiológica redonda estéril para recoger 1 muestra colonizada de *Pseudomona fluorescens* puro de la caja Petri, para posteriormente sembrar en las nuevas cajas Petri con medio TSA, mediante la técnica de siembra por estrías, (esterilización por cada formación de estrías en cuadrantes), las cajas fueron sellada con parafilm y se colocó en la estufa de forma invertida a 30°C, durante 48 h en ausencia de luz.

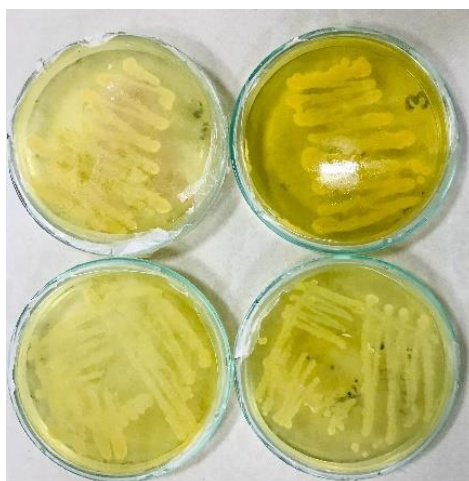


Figura 11: Cepas *Pseudomona fluorescens* después de las 48 h de incubación

Fuente: Autor

3.2.1.3.1 Identificación de del cultivo bacteriano

Para la identificación de la cepa bacteriana *Pseudomona fluorescens*, se efectuó mediante la tinción de gram, y la prueba de catalasa.

En tinción de gram se realizó un frotis de las bacterias recogiendo una pequeña cantidad, luego se trasladó sobre una gota de agua que se colocó en el porta objetos, y se lo dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se fijó la muestra por calor utilizando un mechero de alcohol. Una vez fijada la bacteria se empleó primero sobre la superficie de la muestra el colorante cristal de violeta al 1% responsable de teñir las células de color morado, pasado 1 min se procedió a retirar el colorante, a continuación se le agregó una gota Lugol cubriendo la zona de tinción, se esperó 1 min para retirar el Lugol, luego se decoloró con alcohol- acetona 95%, en las bacterias gram negativas el alcohol retira el cristal de violeta y para terminar se añadió safranina que es el colorante de contraste mismo que tiñó las células gram negativas, después se retiró la safranina con agua destilada y se procedió a observar la muestra en el microscopio.

En la prueba de catalasa se procedió aplicar 2 gotas de peróxido de hidrogeno encima del porta objetos, se utilizó un asa redonda para realizar un frotis de la colonia bacteriana e inocularla sobre el porta objetos. Para el control negativo se coloca una gota de solución salina sobre el porta objetos y de la misma forma se inoculo la muestra bacteriana sobre la solución salina. En la figura 11 se puede observar que la inoculación de la parte izquierda del porta objetos hay efervescencia por lo tanto es - positivo la catalasa y en la inoculación con solución salina de la parte derecha la prueba es - negativo.

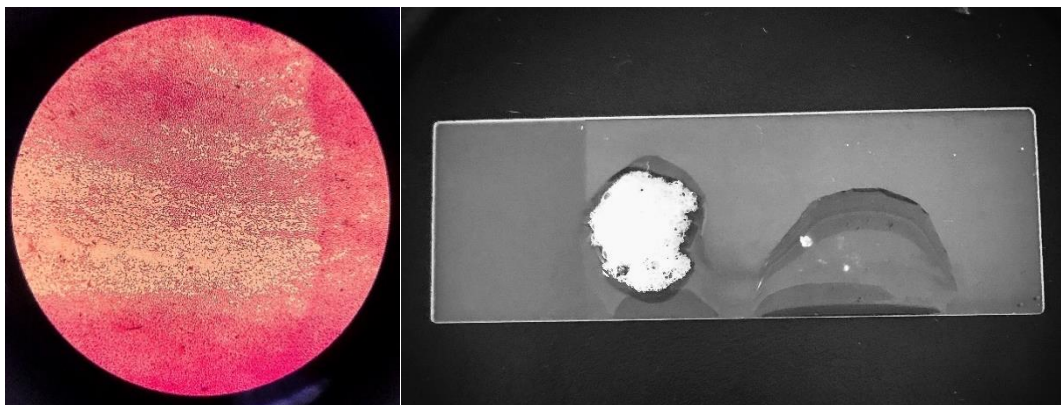


Figura 12: Resultados de la identificación microscópica de *Pseudomonas fluorescens* mediante a) Tinción de Gram (-): las bacterias gran negativas con coloración rosado intenso, células en forma de cocos. b) la Prueba de Catalasa en la parte izquierda la inoculación de la bacteria con peróxido de hidrogeno y en derecha con solución salina.

Fuente: Autor

3.2.1.3.2 Etapas para la preparación de la concentración de Pseudomonas fluorescens

Se planteo las siguientes etapas: preparación del inóculo bacteriano y de la solución madre, diluciones seriadas, cálculo de concentración por espectroscopia UV-VISIBLE y la aplicación del inóculo a los tratamientos que se detallan a continuación.

3.2.1.3.3 Preparación del inóculo bacteriano

En 6 tubos de vidrio se suspendió 10ml de medio TSB, luego se procedió a inocular con la ayuda de un asa microbiológica redonda realizando un raspado sobre una de las colonias de *Pseudomonas fluorescens* sembradas en las cajas petri, para la incubación se colocaron en la estufa por 48 h a una temperatura de 30 °C.



Figura 13: Inoculación bacteriana en tubos de vidrio con medio TSB luego de la incubación de 48h a T° 30°C

Fuente : Autor

3.2.1.3.4 Centrifugación de los cultivos bacterianos

Pasado las 48 h de incubación se procedió a separar la suspensión bacteriana de los 6 tubos en la centrifugadora a 3500 rpm durante 20 minutos, descartando el medio TSB y preservando solo el precipitado bacteriano en la base de los tubos.

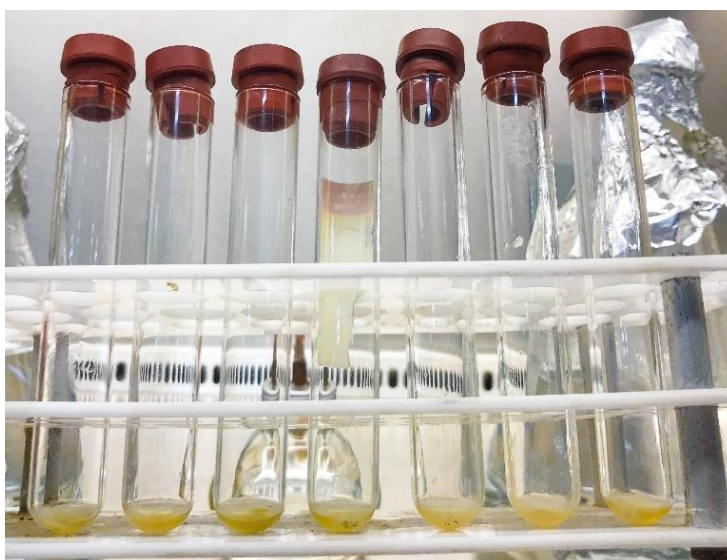


Figura 14: Precipitado bacteriano en el fondo de los tubos

Fuente: Autor

3.2.1.3.5 Preparación de Solución Madre

Se suspendían el precipitado de *Pseudomona fluorescens* de cada tubo con 10ml de agua peptonada, mismos que fueron homogenizados en el vortex para terminar colocando estas suspensiones en un matraz de 1000ml estéril en cual se preparó 940ml de agua peptonada. Se incubo la solución madre por 48 h a una temperatura de 30 °C.

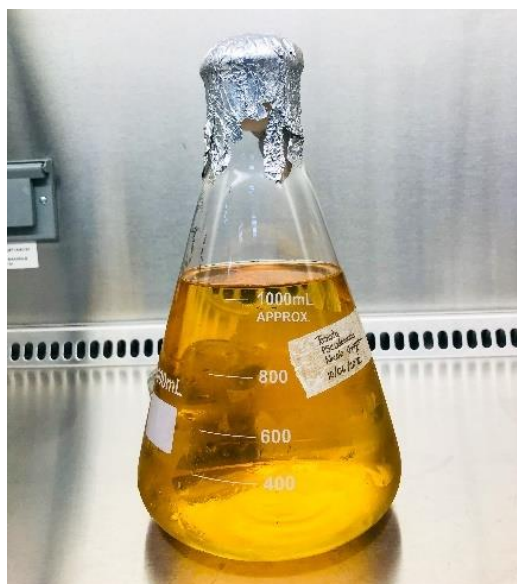


Figura 15: Preparación de solución madre suspendida con precipitado bacteriano y agua peptonada

Fuente: Autor

3.2.1.3.6 Preparación de diluciones

Para la preparación de los inóculos con *Pseudomona fluorescens* será el descrito por Pozo, (2018). Se empleo la técnica de dilución seriada con el fin de cuantificar las células bacterianas. En tubos de tapa rosca y con la ayuda de una micropipeta se procedió a diluir en base 10, 1ml del stock o muestra madre en 9ml de agua peptona, luego se homogenizó por 30 segundos en el vortex y se obtuvo la dilución 10^1 a partir de esta dilución se pipeteo 1ml para transferirlo al tubo de la dilución 10^2 , este proceso se realizó sucesivamente hasta obtener la dilución 10^6 . Este proceso se realizó por duplicado.

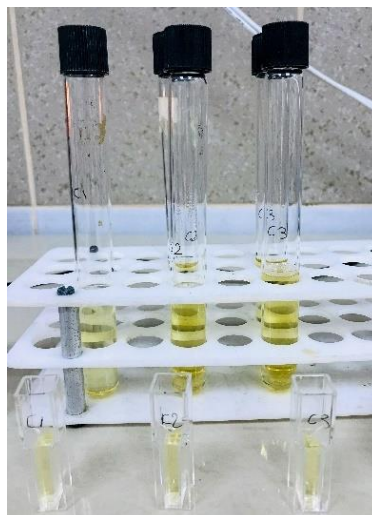


Figura 16: Diluciones seriadas por duplicado previa a la medición de la absorbancia.

Fuente: Autor

3.2.1.3.7 Medición de la concentración por espectrofotometría UV-VISIBLE

En las celdas plástico del espectrofotómetro UV visible se colocó 1ml de la primera dilución realizada, y así sucesivamente con todas las diluciones, estas celdas fueron trasladadas al espectrofotómetro UV visible previamente calibrado a una longitud de onda de 655 nm utilizando agua peptonada como solución blanco, luego esta solución blanco se ubicó en el porta celdas hasta que el contador se presente en 0. Para finalizar se retira el blanco, para colocar una de las celdas que contenía el 1ml de la dilución, se realizó la lectura de la turbidez de cada una de las celdas hasta alcanzar una absorbancia de 0.200 ± 0.010 , y conseguir una concentración de 10^6 UFC/ml.

3.2.1.4 Inoculación de *Trichoderma harzianum*

Para la inoculación de la cepa *Trichoderma harzianum*, se manipuló una asa microbiológica recta estéril, realizando un raspado superficial y ligero de la cepa *Trichoderma harzianum* puro de la caja Petri, procediendo a sembrar en las nuevas cajas Petri dispensado con medio PDA, y se mantuvo en incubación de forma invertida a 25°C , durante 8 días (Torres & Morales, 2020).

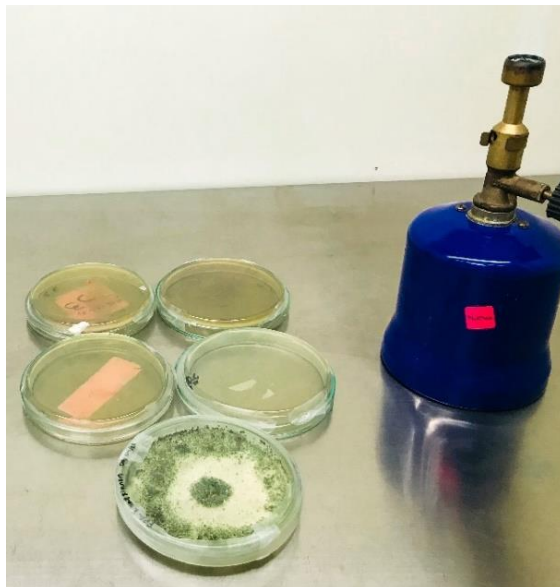


Figura 17: Medios de cultivo invertidos dispensados con PDA antes de la inoculación de *Trichoderma harzianum*.

Fuente: Autor

3.2.1.4.1 Identificación de cepas de Trichoderma harzianum

Para realizar la identificación de cepas de *Trichoderma harzianum* se realizó la caracterización macroscópica y microscópica *Trichoderma harzianum*

3.2.1.4.2 Caracterización macroscópica de Trichoderma harzianum

La determinación de estructuras macroscópicas se determinó empleando los cultivos en placa Petri incubadas por 8 días, posteriormente se evaluó la tonalidad verde por el haz y el amarillo blanquecino del envés del medio de cultivo, su forma de crecimiento de los halos del hongo, su textura, y el tamaño del micelio por el envés y haz de la caja.

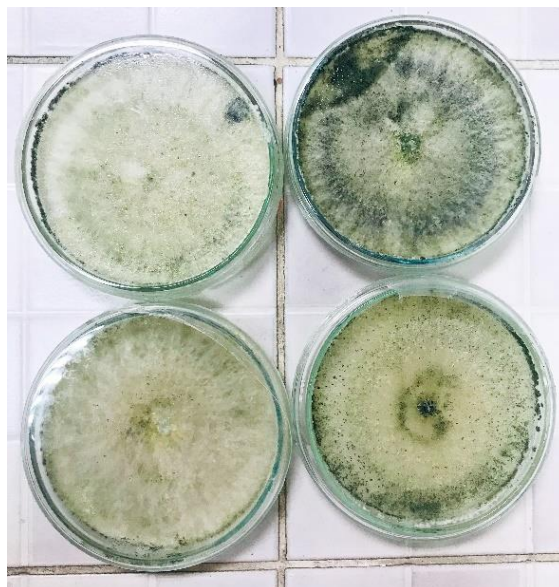


Figura 18: Observación del envés *Trichoderma harzianum* con coloración verde propia del hongo.

Fuente: Autor

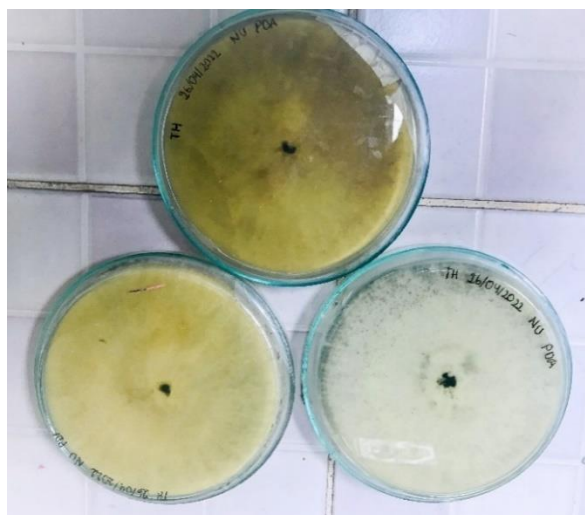


Figura 19: Observación del envés *Trichoderma harzianum* con coloración amarillo blanquecino.

Fuente: Autor

3.2.1.4.3 Caracterización microscópica de Trichoderma Harzianum

Fue empleada la Técnica de la Cinta Adhesiva para la determinación de las estructuras microscópicas. Sobre un porta objetos se realizó una tinción colocando una gota de azul


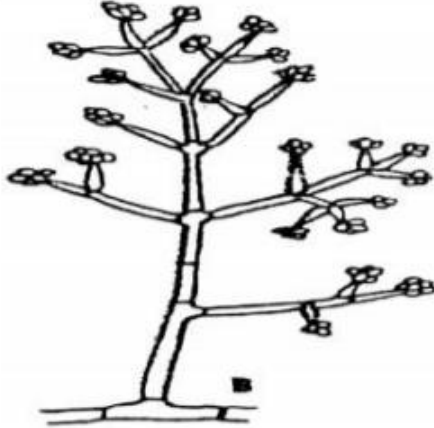
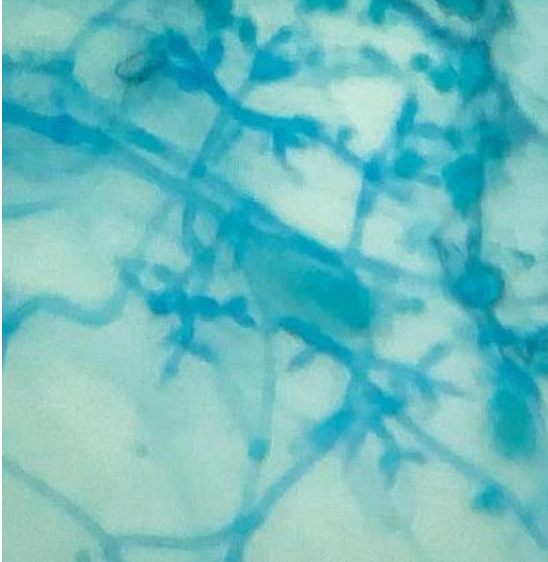
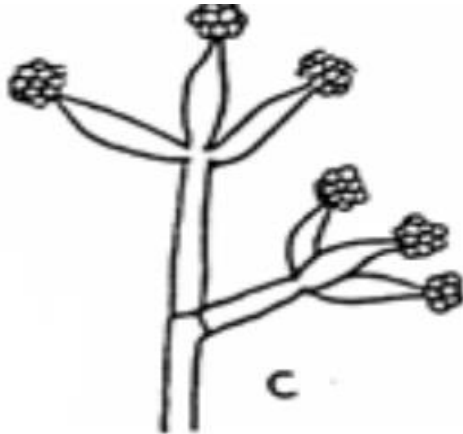
lactofenol, después, se cortó un fragmento de cinta scotch colocándose sobre la superficie del medio de *Trichoderma Harzianum*, luego se trasladó la cinta sobre el portaobjetos que contenía la gota de azul de lactofenol, y para la observación se utilizó en el microscopio con lente de 40 X.



Figura 20: Técnica de la Cinta Adhesiva para la determinación de las estructuras microscópicas.

Fuente: Autor

Para la evaluación microscópica de las estructuras se compararon mediante las claves taxonómicas de *Trichoderma* Figura 21, observando mediante el microscopio conidióforos con ramificación en racimos, fiálides individuales o en grupos, conidios, hialinas ovoides”.

Identificación microscopica en el laboratorio	Identificación microscopica de fuente bibliográficas
	
<p>a) Conidioforos con extensa ramifixación Fuente: Autor</p>	<p>b) Conidioforos Fuente: Ilustraciones tomadas del libro Illustrated genera of imperfect fungi-fourth (Barnett, 1967)</p>
	
<p>c) Fiálides a los 8 dias de incubacion con produccion de conidios Fuente: Autor</p>	<p>d) Fiálides Fuente: Ilustraciones tomadas del libro Illustrated genera of imperfect fungi-fourth (Barnett, 1967)</p>

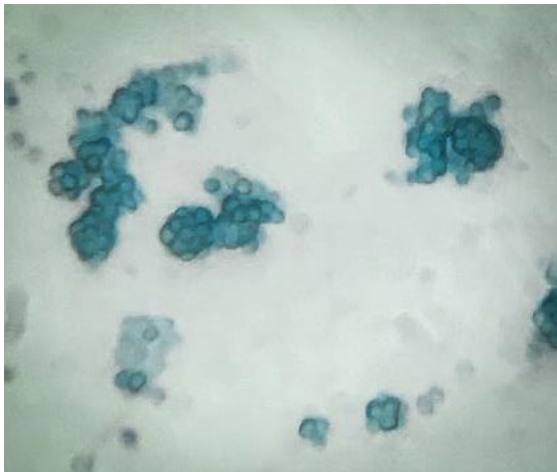

	
<p>e) Conidios a los 8 días de incubacion Fuente: Autor</p>	<p>f) Conidios Fuente: Ilustraciones tomadas del libro Illustrated genera of imperfect fungi-fourth (Barnett, 1967)</p>

Figura 21: Identificación microscópica de *Trichoderma harzianum* en el laboratorio

Fuente: Autor

3.2.1.4.4 Preparación masiva de inóculos fúngicos

El protocolo empleado para la preparación de los inóculos con *Trichoderma harzianum* será el descrito por Granda, (2017). En la cámara de flujo se prepararon los inóculos de *Trichoderma harzianum*. Utilizando el asa microbiológica se procedió a hacer un raspado superficial de una de las cajas Petri que contenía la cepa activada y se colocó en el interior de uno de los matraces de 250ml con medio PDA estériles, luego se repitió el proceso hasta completar la inoculación de 10 matraces. A continuación, los medios permanecieron en incubación por un tiempo de 10 días a una temperatura de 27°C para finalmente obtener el aumento de biomasa del *Trichoderma harzianum*.



Figura 22: Preparación masiva de inóculos fúngicos

Fuente: Autor



Figura 23: Aumento de biomasa luego de la inoculación de *Trichoderma harzianum*

Fuente: Autor

Se planteo etapas para la preparación de las concentraciones de *Trichoderma harzianum* que se muestran a continuación: lavado de esporas, solución madre, diluciones seriadas, y cuantificación de esporas.

3.2.1.4.5 Lavado de esporas y preparación de solución stock

Se esterilizó 500ml de agua destilada para realizar los lavados de esporas con 10ml de agua destilada en cada uno de los matraces de 250ml que contenía el hongo esporulado. Se empleo un embudo para vertir el lavado de esporas de cada matraz de 250ml a un frasco de tapa rosca

de 1000ml hasta llegar a un volumen de 490ml de solución, adicional a esto se colocó 10ml de tween 80 al 1% completando el volumen de 500ml.



Figura 24: Transferencia del lavado esporas para para preparación de la solución stock

Fuente: Autor



Figura 25: Preparación de solución madre de *Trichoderma harzianum*

Fuente: Autor

3.2.1.4.6 Preparación de diluciones seriadas

Se empleó la técnica de dilución seriada con el fin de cuantificar las esporas. En tubos de tapa rosca y con la ayuda de una micropipeta se procedió a diluir en base 10, 1ml del stock o muestra madre en 9ml de agua destilada estéril, luego se homogenizó por 30 segundos en el vortex para obtener la dilución 10^1 a partir de esta dilución se pipeteo 1ml para transferirlo al tubo de la dilución 10^2 , y de esa disolución se vuelve a repetir el proceso hasta la dilución 10^6 . Este proceso se realizó por duplicado.



Figura 26: Diluciones seriada de *Trichoderma harzianum* por duplicado

Fuente: Autor

3.2.1.4.7 Conteo de esporas

De las diluciones previamente preparadas y mediante la ayuda de una micropipeta fue extraído 1ul de uno de los tubos seleccionados, colocando el líquido sobre los bordes de la cámara de Neubauer con el fin de que penetre por capilaridad para luego colocar en la superficie del cubre objetos.

En la bandeja del microscopio se ubicó la cámara de Neubauer, se enfocó hasta observar nítido con el lente de 40X los cuadrados extremos, el cuadrado central y las células. Por último, se contabilizaron las células viables y mediante el uso de la siguiente fórmula se realizó los cálculos para establecer las 3 concentraciones fúngicas (Hidalgo & Osorio, 2013).

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} = \# \text{ de Esporas contadas} \times 10.000 \times \text{Factor de dilucion}$$

$$\text{Esporas totales} = \frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} \times \text{Vol. De la suspensión original de esporas}$$

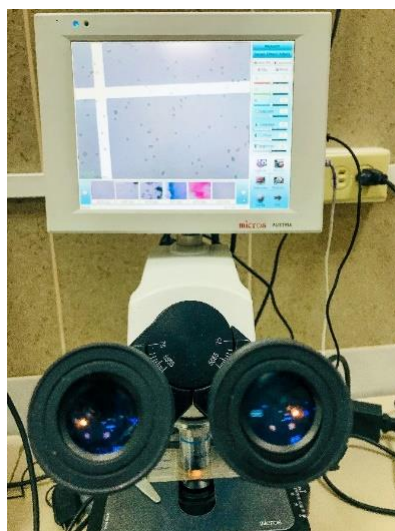


Figura 27: Observacion de esporas en el microscopio con lente de 40X

Fuente: Autor

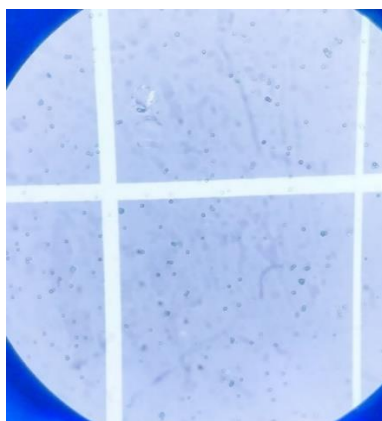


Figura 28: Enfoque de esporas *Trichoderma harzianum*

Fuente: Autor

3.2.1.4.8 Preparación de los consorcios microbianos

Se esterilizo agua destilada en cada una de las botellas de vidrio para proceder a transferir la cantidad de la solución madre de acuerdo a los cálculos realizados hasta completar un volumen de 500ml.



Figura 29: Preparación y almacenamiento de las concentraciones de *Pseudomona fluorescens* y *Trichoderma harzianum*

Fuente: Autor

3.2.2 FASE DE CAMPO

3.2.2.1 Análisis físico-químico de las muestras de suelo

Conocer la actividad biológica del suelo es de gran importancia para el aporte de la viabilidad del trabajo investigativo, de manera que se muestreo en zig zag todo el lote. Estas muestras se mezclaron bien en un saco y se llevaron al Laboratorio de Suelos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP, Estación Experimental del Austro para los respectivos análisis físico-químico Anexo 1.

De acuerdo al análisis físico-químico del suelo los valores indican el pH es ácido, ideal para el cultivo de *Solanum tuberosum L.*

3.2.2.2 Preparación del terreno

Se realizó de manera manual tomando en cuenta la textura ya que las precipitaciones que se presentaban, dificultaban el proceso de preparación del suelo por el aspecto lodoso. Sin embargo se lo realizó utilizando picos con 15 cm de profundidad y se nivelaba con el hecho de que quede mullido y listo para la siembra. (Cárdenas & Garzón, 2011).



Figura 30: Preparación del terreno antes de la siembra

Fuente: Autor

3.2.2.3 Diseño de parcelas en lote experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, considerando 3 tratamientos, un testigo y 4 repeticiones por cada tratamiento, dando 16 unidades experimentales (Fig. 31).

Para la aplicación de los tratamientos se evaluaron 3 concentraciones *Trichoderma harzianum* conjuntamente con una concentración de *Pseudomonas fluorescens*: T1, T2, T3 como se presenta en la tabla 9.

Tabla 9: Tratamientos establecidos para la aplicación de las 3 concentraciones de *Trichoderma harzianum*.

T1:	<i>Trichoderma harzianum</i> 10 ⁴ + <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁶
T2:	<i>Trichoderma harzianum</i> 10 ⁶ + <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁶
T3:	<i>Trichoderma harzianum</i> 10 ⁸ + <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10 ⁶
T4:	Testigo referencial se basó únicamente en la aplicación de agua.

Fuente: Autor

La parcela tuvo forma rectangular con un largo de 20 metros y un ancho de 10 m. El para total fue de 200 m²

T1	T3	T4	T2	T1	T2	T4	T3
T2	T1	T3	T4	T2	T3	T1	T4

Figura 31: Repartición de los tratamientos en bloques

Fuente: Autor

La aplicación de los tratamientos en los ensayos de campo será cada semana en dosis diferentes.

3.2.2.3.1 Cualidades de la unidad experimental

El lote seleccionado debía cumplir ciertas parámetro con respecto a un espacio amplio para la cantidad de plantas a sembrar, textura del suelo suelto, pendiente para evitar que se acumule el agua por la frecuencia de las precipitaciones. Después se procedió a medir y diseñar las parcelas en forma rectangular dividiéndoles con ramas propias del lugar para distinguir entre los tratamientos y su correcta aplicación. En cada parcela se situaron 36 plantas distribuidas en 4 hileras de 9 plantas, en total el lote constó de 576 plantas. La distancia de siembra entre surcos es de 0,8m y entre plantas es de 0,5m (Figura 32). La distancia entre subparcelas es de 1m. Se sembró 2 tubérculos para cada planta, seleccionando

solamente los sanos, con características adecuadas color-forma y tamaño apropiado para la semilla.

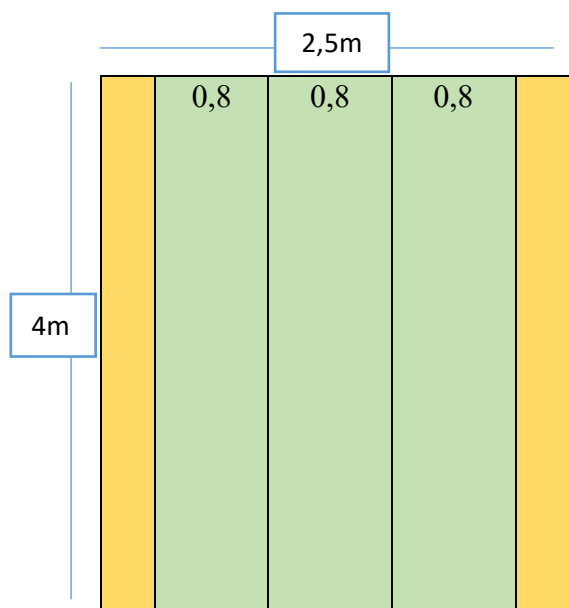


Figura 32: Distancia de siembra de parcela, plantas y surcos

Fuente: Autor

3.2.2.3.2 Manejo cultural del cultivo

Es importante seguir un manejo cultural en el cultivo, considerando actividades que aporten a un buen desarrollo de *Solanum tuberosum L.* cómo se menciona a continuación:

- Selección y el saneamiento de la semilla antes de la siembra.
- Debido a las constantes precipitaciones se planifico la época de siembra ya que el suelo al estar en humedad, toma una textura enlodada, por ende, no permitió que la siembra se realice en el momento establecido.
- Se realizaron aporques cada 3 semanas, la primera antes de iniciar el estudio.
- Otro aspecto importante es la distancia entre plantas, para evitar la humedad en el follaje.

- Debido a la época lluviosa de abril-julio, el riego se dio de forma natural y por ser el terreno en pendiente se evitó la acumulación excesiva de humedad en el suelo.

3.2.2.4 Bioaplicaciones de los tratamientos a cultivos de *Solanum tuberosum* L. variedad chaucha

Las concentraciones de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*, fueron vertidas en el interior del automatizador de plástico, mismo que contenía agua para homogenizar con la primera concentración. Luego se procedió a la bioaplicación de parcelas del primer tratamiento rociando la superficie foliar en su totalidad. Al mismo tiempo se realizó el mismo proceso con el resto de tratamientos. El periodo de aplicación fue de 1 vez por semana tomando en cuenta un tiempo estimado de dos meses, iniciando desde la brotación de hojas hasta el inicio de floración.

3.2.3 Incidencia y severidad de mancha necrótica en lote experimental

Utilizando un método de muestreo al azar, se evaluó 6 patrones representativos de cada parcela, mismo que se tomaron de manera sistemática, recorriendo el extremo superior, centro y el extremo inferior de la parcela se examinaba un sitio de muestreo. Luego se contabilizó todas las hojas de cada planta tanto sanas como infectadas para evaluar la incidencia, por otro lado, se evaluó la severidad tomando 6 hojas a diferentes alturas de la planta y se visualizó el porcentaje de área foliar afectado.



Figura 33: Contabilización de hojas sanas e infectadas para la evaluación y monitoreo de incidencia y severidad década tratamiento.

Fuente: Autor



Figura 34: Muerte de cultivo de *Solanum tuberosum* L. por el ataque de *Phytophthora infestans* en tratamiento 4.

Fuente: Autor

CAPITULO 4

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Determinar tres concentraciones de *Trichoderma harzianum* con *Pseudomona fluorescens*

Las tres concentraciones se prepararon en base a la bibliografía, teniendo como referencia a la autora Nugra, (2018) menciona en su estudio acerca de las concentraciones óptimas para el empleo de *Trichoderma* tanto *in vivo* como *in situ*, establecidas a partir 1×10^6 a 1×10^8 esporas/ml. En la Cámara de Neubauer, se realizó la cuantificación de las células viables por duplicado de cada dilución obteniendo valores óptimos para establecer diferentes concentraciones.

En relación a lo señalado en la literatura anteriormente, son pocos los estudios realizados en condiciones *in vitro* e *in situ* donde *Pseudomona fluorescens* establezca parámetros de concentraciones óptimas para el biocontrol de enfermedades en plantas sin embargo de acuerdo al estudio de Uribe et al., (1999), mencionan la importancia de conocer las características intrínsecas de los aislamientos, ya que nos permite manipular e incrementar las alternativas de los estudios de interés agronómico y/o biotecnológico, frente al control de agentes fitopatógenos en gran variedad de cultivos.

Las diluciones sucesivas permitieron llegar a la absorbancia que nos refiere el autor Muñoz, (2016), que es de 0.200 ± 0.010 , lo que permitió tener la concentración óptima para mezclar con la hongo, permitiendo así obtener como dice Jaramillo, (2022) una simbiosis óptima para poder combatir a esta afección fúngica.

Tabla 10: Concentración muestral para los distintos tratamientos

Tratamiento	Concentraciones
T1:	<i>Trichoderma harzianum</i> 10 ⁴ + <i>Pseudomona fluorescens</i> 10 ⁶
T2:	<i>Trichoderma harzianum</i> 10 ⁶ + <i>Pseudomona fluorescens</i> 10 ⁶
T3:	<i>Trichoderma harzianum</i> 10 ⁸ + <i>Pseudomona fluorescens</i> 10 ⁶
T4:	Testigo refencial se basó únicamente en la aplicación de agua.

Fuente: Autor

4.2 Evaluación de incidencia y severidad de la enfermedad en el cultivo de *Solanum tuberosum* L.

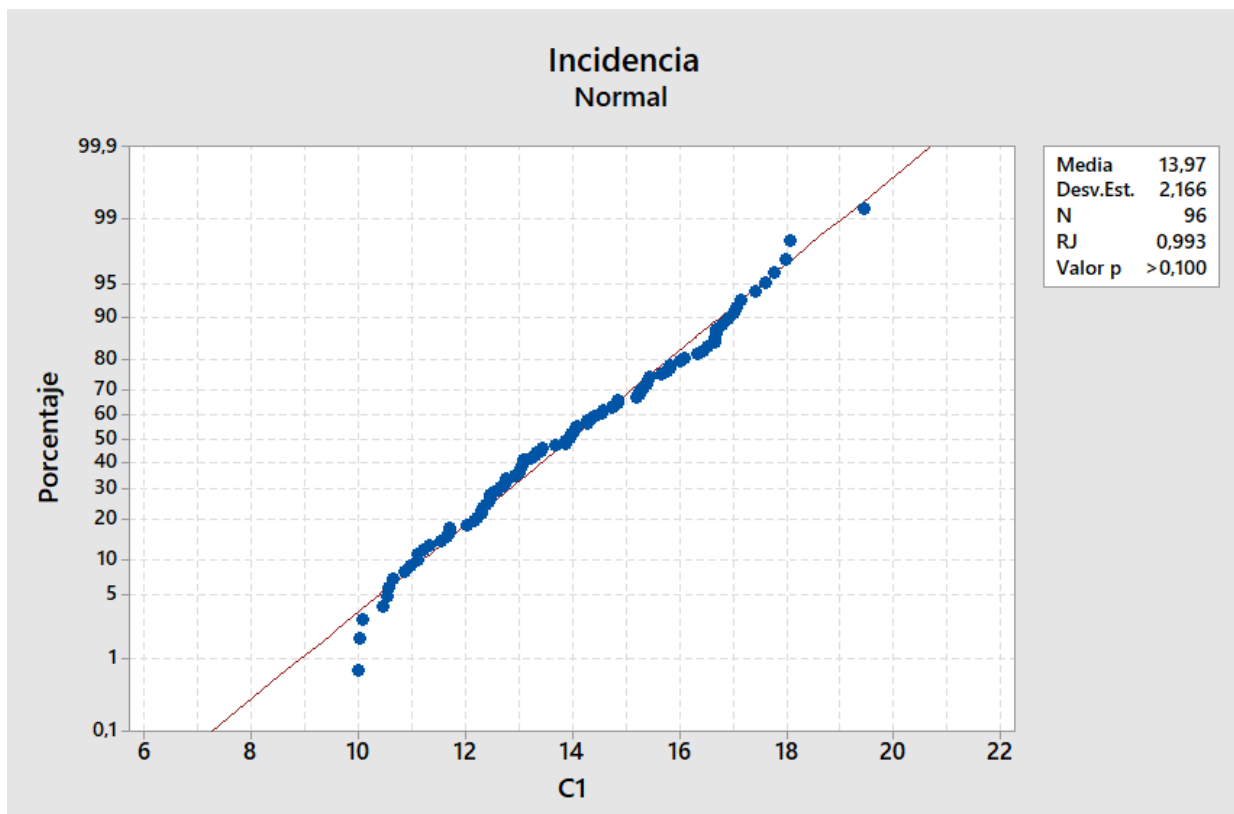
4.2.1 Análisis de normalidad incidencia

Se empleo el test de Ryan-Joiner, que es una prueba similar a Shapiro Wilk para el estudio de la normalidad de los datos presentes en cada tratamiento, este estadístico es utilizado para el análisis de información mayor a los 30 casos.

Para el análisis de normalidad se planteó la siguiente hipótesis:

- Ho: Los datos pertenecen a una distribución de tipo normal
- H1: Los datos no pertenecen a una distribución de tipo no normal.

El nivel de confianza 95%



Gráfica 1: Prueba de Ryan-Joiner indicando el supuesto de normalidad sobre la incidencia realizada en el programa Minitab Statistical Software.

Fuente: Autor

Tabla 11: Prueba de normalidad realizada en el programa INFOSTAT

Media	D.E.	n	p
13,97	2,17	96	0,0832

Fuente: Autor

Se utilizó algunos métodos estadísticos como Anderson darling, mismo que permite establecer si cumplen el supuesto de normalidad, mide que tan bien los datos siguen una distribución específica, y mejor se ajuste la distribución a los datos menor será este estadístico. Por otro lado, el test Ryan-Joiner cuantifica si los datos coinciden con una distribución normal mediante la relación entre los datos y las puntuaciones normales de los datos. Si el coeficiente de correlación de acerca a 1 se acepta la hipótesis nula mientras que si el valor es menor a 1 se acepta la hipótesis alternativa

Se utilizó los programas, el primero INFOSTAT debido a que el valor (p) se presenta de modo específico y Minitab Statistical Software para la gráfica, planteando un nivel de confiabilidad del 95%. En la tabla 11, se observó que el valor p es 0,0832 con respecto a la incidencia, es superior a 0,05 de modo que se afirma que los datos provienen de una línea de normalidad conforme se detalló en la hipótesis nula.

4.2.2 ANOVA

Al corroborar que los datos recolectados resultan de una población normal, se procedió al análisis entre los tratamientos para ostentar las diferencias significativas que existe entre ellos, es decir, las varianzas entre las medias de los distintos grupos del Diseño Completamente al Azar (DCA). Mediante la formula estadística ANOVA, se aceptará o negará las siguientes hipótesis:

- Ho: Las medias obtenidas de la incidencia para los distintos tratamientos son iguales.
- H1: Al menos una media de incidencia presenta distinto rendimiento al resto de tratamientos

Para lo cual se usó un nivel de confianza del 95%. En este proceso se ha determinado lo siguiente:

Tabla 12: Coeficiente de viabilidad

Variable	N	R^1	$R^1 3A_j$	CV
Tratamiento	96	0,33	0,30	12,94

Fuente: Autor

Tabla 13: Análisis de la varianza en el programa SPSS

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	145,20	3	48,40	14,82	0,0001
Tratamientos	145,20	3	48,40	14,82	0,0001
Error	300,79	92	3,27		
Total	445,87	95			

Fuente: Autor

Una vez realizado el ANOVA, este proporcionó el valor p el cual permitió estimar más adelante si existe una diferencia significativa entre las medias. Se realizó Tukey para la comparación de medias como se ve en la tabla 15.

Tabla 14: Prueba T student

Valor de prueba = 0

t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias.	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
				Inferior	Superior
Parcela	63,198	95	,000	13,97063	13,5318

Fuente: Autor

4.2.3 Test de Tukey

Tabla 15: Prueba de Test de Tukey en programa SPSS

Columna 2	Medias	n	E.E.	
2,00	12,78	24	0,37	A
3,00	12,89	24	0,37	A
1,00	14,45	24	0,37	B
4,00	15,77	24	0,37	B

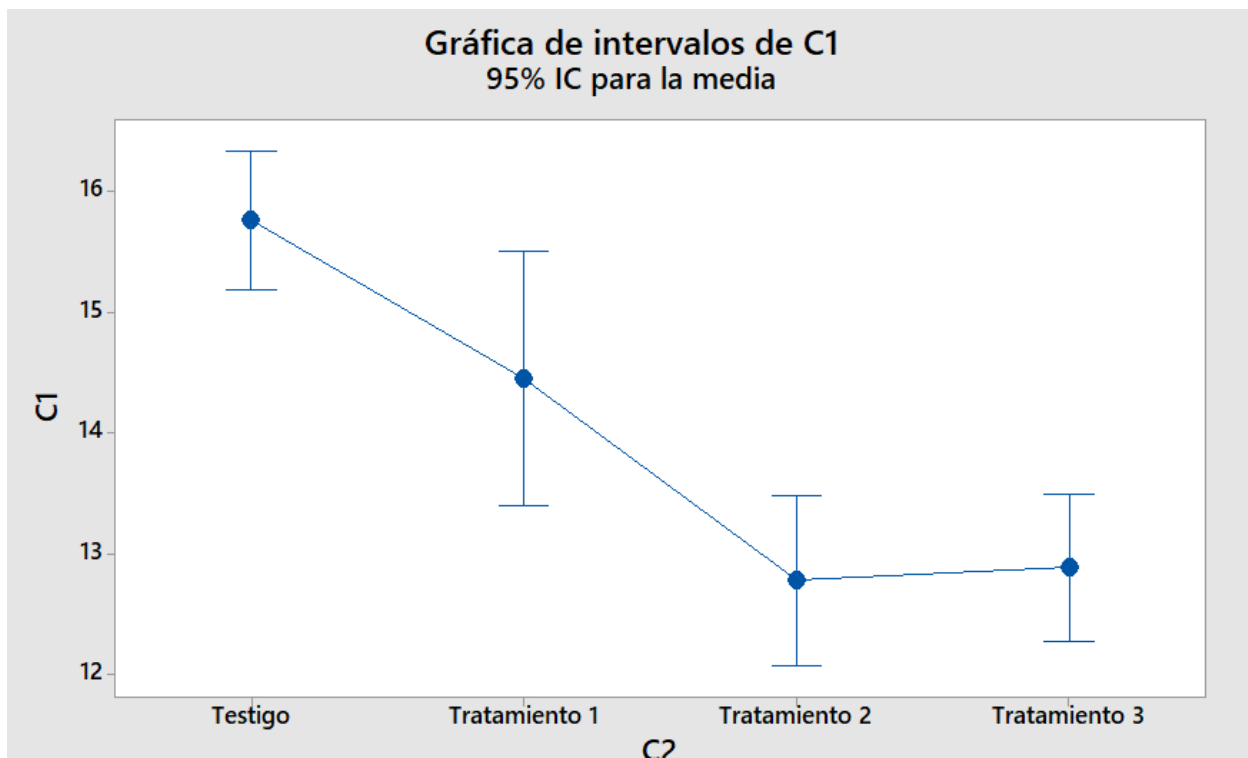
Fuente: Autor

4.2.4 Interpretación de los resultados estadísticos

En campo es permitido un coeficiente de viabilidad del 25%, por ende, como se ve en la tabla 13, el coeficiente de viabilidad está en el rango permitido ya que presenta un 12,94 %, es decir que el ensayo es correcto. Si el coeficiente de viabilidad es superior al porcentaje establecido significa que hay datos atípicos, extraños por falta de datos o una recopilación no adecuada.

El valor que dio de p, demuestra que no existe igualdad entre las medias de los distintos tratamientos que se llevaron a cabo, la incidencia promedio da un rango de 13,97%, resultado que se asemeja al estudio llevado a cabo por Huilcapi, (2012) que en un periodo de 85 días tubo un porcentaje del 15,5722% de incidencia en las hojas de papa chola. Para el tratamiento 2 y 3 se tiene una media inferior al 13% por lo que se puede decir, que favorece a disminuir los niveles incidencia del “Tinzón tardío” en las hojas. Otros trabajos como de los autores Noroña & Tipanquiza, (2010) en variedades genéticamente modificadas se tiene incidencias menores al 12%.

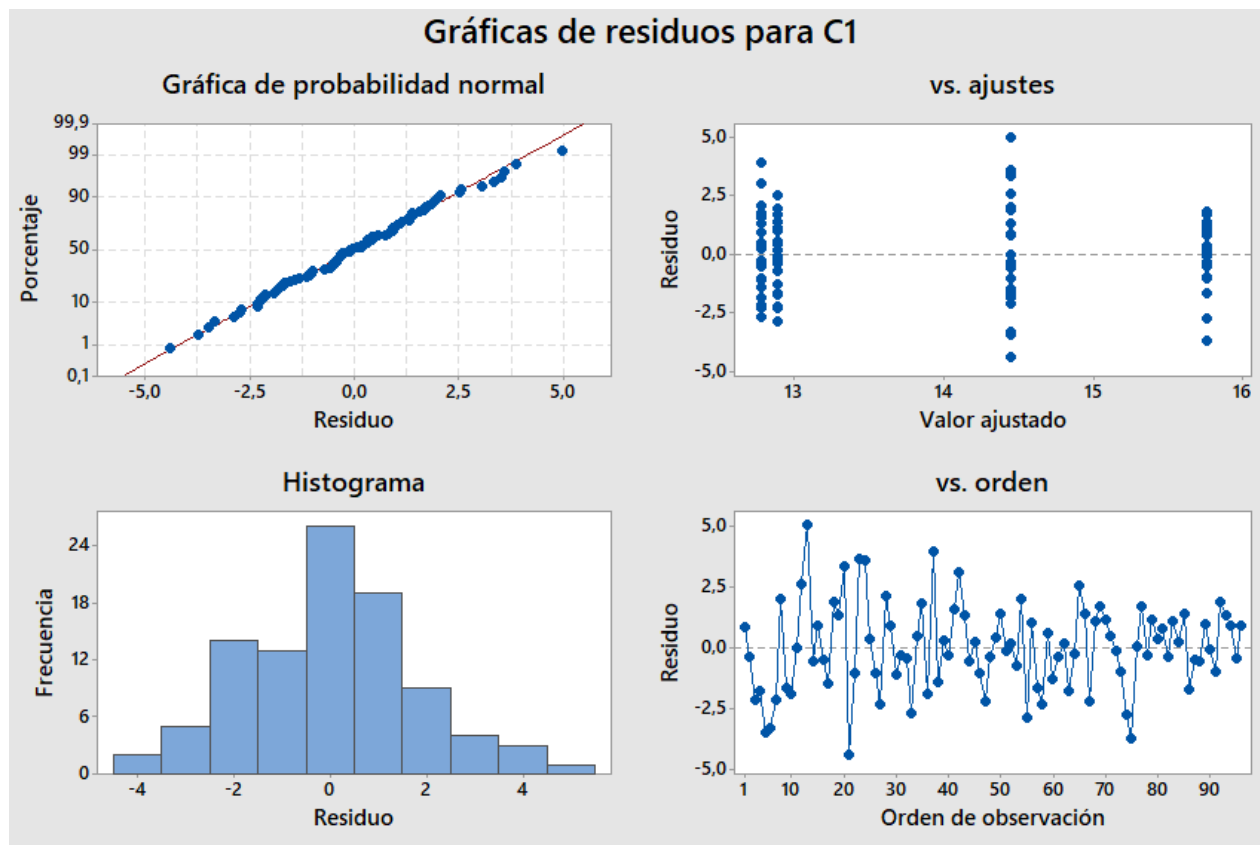
Según el análisis de Tukey, en la tabla 12 la comparación de medias se observa que el T2 y T3 tienen valores aproximados en cuanto a la incidencia, es decir, están en el mismo grupo mientras que T1 su media se acerca más a la del testigo.



Gráfica 2: Análisis de Tukey para la comparación de medias de cada tratamiento.

Fuente: Autor

La incidencia de las hojas en el tratamiento 2 y 3 presentan un mayor porcentaje de resistencia a *Phytophthora infestans*, esto concuerda con el estudio de los autores Cárdenas et al., (2005) donde aplica una concentración de 10^6 como referente óptimo del *Trichoderma spp.* para sus cultivos *in vitro*, por el contrario, concentraciones inferiores a 10^4 de hongo en asociación con otro microorganismo resultan ineficaces.



Gráfica 3: Grafica de residuos tras el análisis de la varianza de un solo factor.

Fuente: Autor

La grafica de probabilidad normal muestra que los residuos están distribuidos normalmente ya que sigue aproximadamente una línea recta, lo que permite establecer que los intervalos de confianza y el valor p son exactos de acuerdo al método estadístico que se mencionó anteriormente.

Para la gráfica de residuos vs ajuste se buscan que los puntos estén ubicados en ambos lados de 0 sin un patrón reconocible. En la grafica a medida que aumenta el valor de los ajustes, la dispersión entre los residuos no se amplía, lo que indica que la varianza de los residuos es constante. Al no observarse valores extraños, todos los datos han sido tomado en cuenta para el estudio del ANOVA.

De acuerdo al histograma que nos presentan los datos obtenidos se puede observar que no existe valores atípicos, en cambio, si hubiera una larga cola en una dirección se debe considerar que existe asimetría en los datos.

En la gráfica de residuos vs orden se establece que se tiene un patrón, donde los residuos son independientes entre sí, ya que no se observan la disposición de los datos en una tendencia o ciclos.

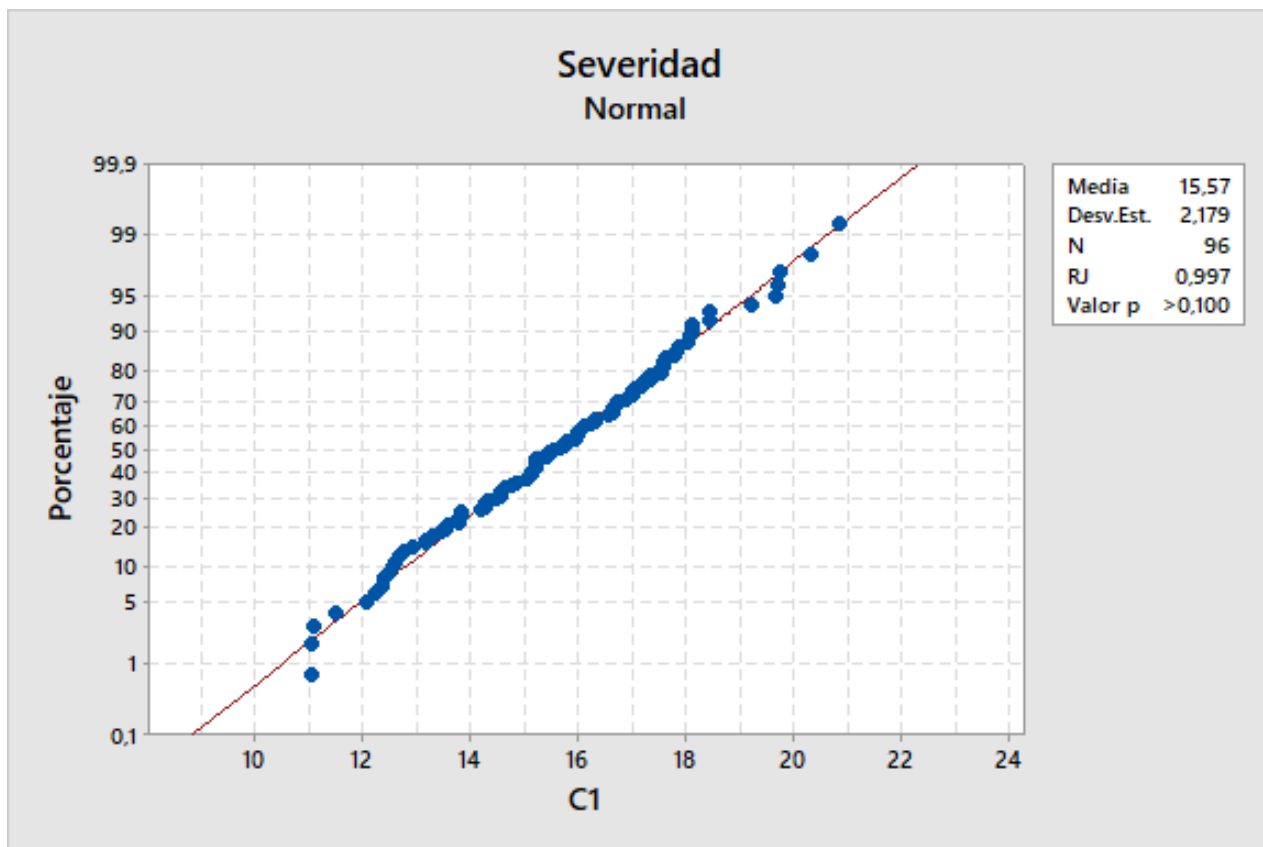
4.2.5 Análisis de normalidad severidad

De la misma manera, se empleó el test de Ryan-Joiner, que es una prueba similar a Shapiro Wilk para el estudio de la normalidad de los datos presentes en cada tratamiento, este estadístico es utilizado para analizar información mayor a los 30 casos.

Para el análisis de normalidad se plantea la siguiente hipótesis:

- Ho: Los datos pertenecen a una distribución de tipo normal.
- H1: Los datos no pertenecen a una distribución de tipo no normal.

El nivel de confianza 95%.



Gráfica 4: Prueba de normalidad de severidad en hojas de *Solanum phureja*.

Fuente: Autor

Tabla 16: Prueba de normalidad realizada en el programa INFOSTAT

Media	D.E.	n	p
15,57	2,18	n: 96	0,3497

Fuente: Autor

Planteando un nivel de confiabilidad del 95%, en la tabla 16, se observó que el valor p es 0,3497, con respecto a la severidad, es superior a 0,05 de modo que afirma que los datos provienen de una línea de normalidad.

4.2.6 ANOVA

Al corroborar que los datos recolectados resultan de una población normal, se procedió al análisis entre los tratamientos para ostentar las diferencias significativas que existe entre ellos, es decir, las varianzas entre las medias de los distintos grupos del Diseño Completamente al Azar (DCA). Mediante la fórmula estadística ANOVA, se aceptará o negará las siguientes hipótesis:

- Ho: Las medidas alcanzadas de la severidad entre los tratamientos son iguales.
- H1: Las medidas alcanzadas de la severidad entre los tratamientos no son iguales

En relación a todo esto, se empleó un nivel de confianza del 95%. En este proceso se ha determinado lo siguiente:

Tabla 17: Coeficiente de viabilidad

Variable	N	R ¹	R ¹ 3Aj	CV
Tratamiento	96	0,56	0,55	9,42

Fuente: Autor

Tabla 18: Análisis de varianza realizado en el programa SPSS

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	253,10	3	84,37	39,24	0,0001
Columna 2	253,10	3	84,37	39,24	0,0001
Error	197,78	92	2,15		
Total	450,87	95			

Fuente: Autor

Una vez realizado el ANOVA, se observa el valor p, mismo que permite estimar más adelante si existe una diferencia significativa entre las medias. Para la comparación de medias se realizó la prueba estadística Tukey como se ve en la tabla 18.

Tabla 19: Prueba T student

Valor de prueba = 0

	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias.	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
Parcela	70,036	95	,000	15,57219	15,1308	16,0136

Fuente: Autor

4.2.7 Test de Tukey

Tabla 20: Prueba de Test de Tukey en programa SPSS

Columna 2	Medias	n	E.E	
2,00	13,74	24	0,30	A
3,00	14,24	24	0,30	A
1,00	16,73	24	0,30	B
4,00	17,59	24	0,30	B

Fuente: Autor

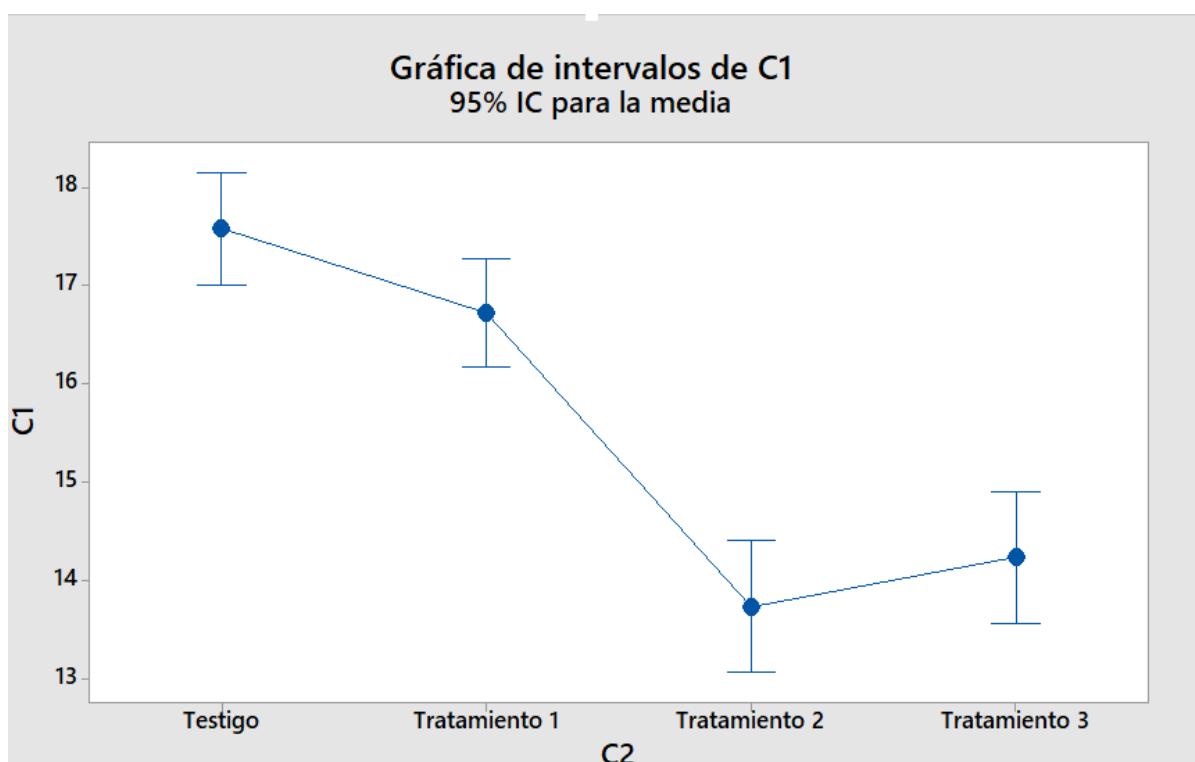
4.2.8 Interpretación de los resultados estadísticos

En campo es permitido un coeficiente de viabilidad del 25%, por ende, como se observa en la tabla 17, el coeficiente de viabilidad está en el rango permitido, ya que presenta un 9,42%, es decir, que el ensayo es correcto. Si el coeficiente de viabilidad es superior al porcentaje establecido, significa que hay datos atípicos, extraños, falta de datos o una recopilación no adecuada.

El valor que presentó p demuestra que no existe igualdad entre las medias de los distintos tratamientos que se llevó a cabo, la severidad promedio es de 15%. A este nivel de severidad según la tabla 19 establecida en el marco referencial, indica síntomas de lesiones leves.

Desde la perspectiva más general, se puede apreciar que los valores de incidencia y severidad son aproximados, estudios indican que para otras enfermedades la incidencia y severidad están altamente correlacionadas, por lo tanto, concluyeron que midiendo solamente la incidencia se tenía una evaluación correcta de la enfermedad (Cepero et al., 2019).

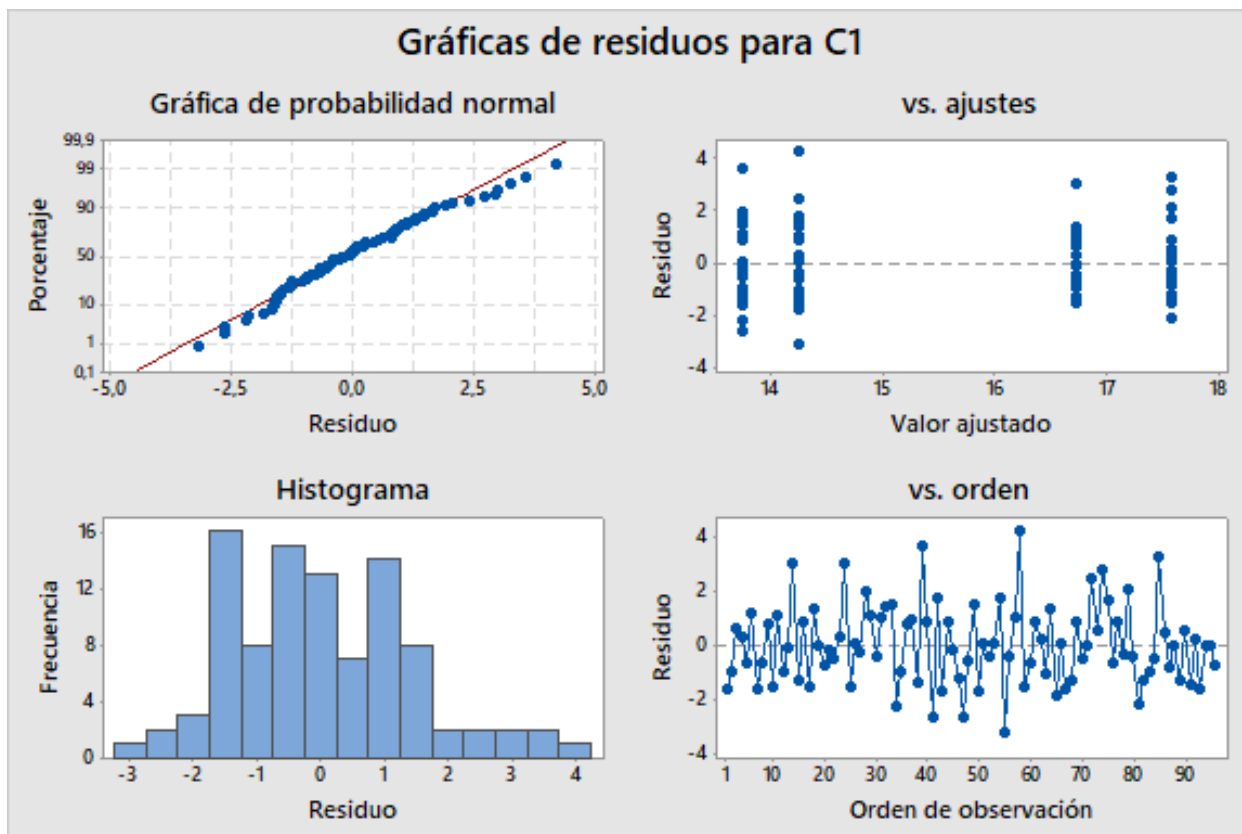
Según el análisis de Tukey (Tabla 20), en la comparación de medias se observa que el tratamiento 2 y 3 pertenecen al mismo grupo, es decir, sus medias son aproximadas, pero T2 presenta significativamente una mayor capacidad de control a *Phytophthora infestans*.



Gráfica 5: Análisis de Tukey para la comparación de medias de cada tratamiento.

Fuente: Autor

En la gráfica de intervalos, se puede apreciar que existe una diferencia significativa entre el T2 y T3 con relación a T1 y el testigo, ya que estos dos últimos sobrepasan sus medias, de la misma forma se observó en el campo que T1 presentaba lesiones en las hojas similares al testigo, por lo cual, el porcentaje de resistencia a *Phytophthora infestans* resultaría bajo.



Gráfica 6: Grafica de residuos tras el análisis de la varianza de un solo factor

Fuente: Autor

La gráfica de probabilidad normal mostró que los residuos están distribuidos normalmente ya que sigue aproximadamente una línea recta, si bien tiende a presentar una curva no se la puede considerar como una distribución con colas largas, lo que permitió establecer que los intervalos de confianza y el valor p son exactos de acuerdo al método estadístico que se mencionó anteriormente.

Para la gráfica de residuos vs ajuste se buscan que los puntos estén ubicados en ambos lados de 0 sin un patrón reconocible. En nuestra grafica a medida que aumenta el valor de los ajustes, la dispersión entre los residuos no se amplía, lo que indica que la varianza de los residuos es constante. Al no observarse valores extraños, todos los datos han sido tomados para el estudio del ANOVA.

De acuerdo al histograma, este presenta tres picos por lo que podría indicar que es necesario analizar la información por separado ya que se tiene datos multimodales, razón por la que ocurre cuando la información se recopila a partir de varias condiciones.

En la gráfica de residuos vs orden se establece que se tiene un patrón, donde los residuos son independientes entre sí, ya que no se observan la disposición de los datos en una tendencia o ciclos.

CAPITULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

La concentración usada en los cultivos de *Solanum tuberosum L.* coincide con la información de los autores Cárdenas et al., (2005) en el cual establece que en pruebas *in vitro*, a una concentración 10^6 , resultado idóneo para el control fúngico debido al porcentaje alto de inhibición que presento en comparación al resto de tratamientos, permitiendo el desarrollo de la planta, en cuanto a la *Pseudomonas fluorescens* no existe una información detallada de su composición y acerca de estudios que hayan establecido una concentración puntual a usarse para combatir los fitopatógenos que presentan las plantas de *Solanum tuberosum L.*

En relación a las concentraciones aplicadas con *Trichoderma harzianum* en combinación con *Pseudomonas fluorescens*, el tratamiento que obtuvo los mejores resultados en el periodo de 80 días fue T2, debido a los niveles bajos que manifestó la enfermedad en las hojas, reportando un porcentaje del 12,78% de incidencia y 13,74% de severidad, razón por la cual hay un mejor rendimiento foliar a lo largo del desarrollo de *Solanum tuberosum L.* variedad chaucha, considerándole la concentración apropiada para el control de *Phytophthora infestan*.

Cabe considerar por otra parte que T3 presenta un porcentaje cercano a T2, representando un mecanismo de defensa del 12,89% con respecto a la incidencia y 14,24% de severidad, controlando el “tizón tardío” significativamente, no obstante, es importante considerar que a una concentración máxima no existe un efecto fitotóxico, pero se observó diferencias morfológicas significativas que incluyen poca producción foliar, desarrollo interrumpido, coloración verde-amarillento en relación con el T2.

En el testigo, el rango de hojas sanas es inferior a la cantidad de hojas enfermas debido a que en este tratamiento se observó un porcentaje de incidencia y severidad alto frente al “tizón tardío”, ya que al no recibir ninguna aplicación de biocontrol reporto una media de 15,77% de incidencia y 17,59% de afección en las hojas en la severidad. Esta enfermedad se manifestó a los 80 días a partir de la siembra por lo que los rendimientos resultan bajos.

La combinación de *Trichoderma harzianum* con *Pseudomonas fluorescens* no se reporta en otros estudios, por lo cual, determinar en esta asociación, que mecanismo de cada microorganismo actúa para inhibir el Tinzón tardío resultaría útil para estudios a posterior.

En cuanto a los cambios climáticos, la presencia de precipitaciones influye en el incremento o disminución de la incidencia y severidad, por consiguiente, el porcentaje establecido se debe a la respuesta antagónica de la enfermedad ante este factor que no se puede controlar influyendo en la morfología de las plantas de cada parcela.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar a gran escala, bioensayos sobre la actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* con *Pseudomonas fluorescens* e incluso en periodos de tiempo más extensos, ya que, al trabajar en un espacio y tiempo limitado, la recopilación de datos requerida variaría, obteniendo una información reducida para la evaluación de la investigación.
- Se recomienda seguir minuciosamente una línea de estudio de *Trichoderma harzianum* incorporado con *Pseudomonas fluorescens* para aclarar la acción antagónica frente a las enfermedades concernientes a *Solanum tuberosum* L.
- Cabe considerar que, al trabajar en condiciones no controladas, en este caso la presencia agentes externos como precipitaciones, es necesario fomentar e implementar nuevas alternativas de cultivo asegurando el tiempo de siembra, mayor rentabilidad en la producción e incluso que no influya en el control biológica del sector agrícola.
- Cabe señalar que en la actualidad los productores se inclinan hacia los productos sintéticos, razón por la cual es necesario inculcar a capacitaciones para mayor conocimiento sobre el uso de los productos biotecnológicos en la producción agrícola, para así concientizar a la población el consumo de alimentos orgánicos, beneficiando la salud y por ende a mejorar la protección del entorno.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdo-Peralta, P., Haro, J., & Carrera, K. (2021). Evaluation of Three Organic Products With Three Doses for Boal Control (*Phytophthora infestans*) in Potato Cultivation (*Solanum Tuberosum* cv. Frippa) Riobamba Canton, Chimborazo Province. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 430-447. <https://doi.org/10.18502/epoch.v1i1.9582>
- Acurio Vásconez, R. D., & España Imbaquingo, C. K. (2017). AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE *Trichoderma* spp. COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS (*Lolium perenne*) Y TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens*). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 25(1), 53-61. <https://doi.org/10.17163/lgr.n25.2017.05>
- Amerio, N. S., Castrillo, M. L., Bich, G. A., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2020). *Trichoderma* en la Argentina: Estado del arte. *Ecología austral*, 30(1), 113-124. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1667-782X2020000100015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Angamarca, H., Cuvi, M., Sierra, N., Realpe, J., & Pozo, M. (2019). *Desarrollo de principios de manejo del tizón tardío (phytophthora infestans) de la papa en Ecuador*. Quito, EC: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina 2019. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5353>
- Arbito Riera, M. P. (2017). *Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de Trichoderma spp. Frente a Fusarium spp.* <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/14419>
- Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases—A review. *Ecological Complexity*, 49, 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978>

- Barnett, H. L. (1967). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Pub. Co.
- Bautista Zeas, C. G., León Escandón, W. A., & Rojas Orellana, A. G. (2010). *Evaluación del rendimiento del cultivo de papa (Solanum tuberosum) variedad chaucha con el manejo fisionutricional (MFN) frente al manejo tradicional en la hacienda «San Patricio» ubicada en la Parroquia Tomebamba del cantón Paute provincia del Azuay*.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/3877>
- Bustamante Gavilanes, A. E. (2015). *Control biológico del Tizón Tardío Phytophthora infestans en papa Solanum tuberosum a través de consorcios microbianos formados por hongos nativos del género Trichoderma sp.*
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/7692>
- Cadena Bedoya, I. A. (2018). *Evaluación de fertilizantes edáficos quelatados con macro y micronutrientes en el rendimiento de papa (Solanum tuberosum)*.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15728>
- Cantillo, K. (2018). Microorganismos como biocontroladores de fitopatógenos en post cosecha de cítricos. *Microciencia*, 7.
<https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/microciencia/article/view/5613>
- Cárdenas, J. C. G., García, J. M. M., & Acosta, A. G. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de Trichoderma spp. Contra Fusarium oxysporum agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (Carica papaya L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 5(1), 45-47.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221589>
- Cárdenas M., A., & Garzón, J. P. (2011). *Guía de manejo de pastos para la Sierra sur ecuatoriana*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2318>

- Cepero, V. C., Amez, S. B., Otiniano, A. M. J., Ventura, R. B., Huamán, L. A., & Vera, N. J. (2019). Relación entre la incidencia y la severidad de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en San Ramón, Chanchamayo, Perú. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación*, 4(4), 1-9. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7368046>
- Chañag, H. A., Álvarez, S. L., Lagos, L. E., & Burbano-David, D. M. (2018). Sensibilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes de *Solanum tuberosum* a tres fungicidas sistémicos. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(3), 592-601. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i3.7859>
- Chulde Minda, J. A. (2019). *Alternativas de fertilización para el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) con el empleo de Microorganismos solubilizadores de fósforo, Micorrizas y Extracto de algas en la Finca San Francisco Cantón Huaca* [Thesis, Universidad Politécnica Estatal del Carchi]. <http://www.repositorio.upec.edu.ec/handle/123456789/763>
- Colcha Paullán, E. M. (2010). *Evaluación del impacto ambiental de tecnologías para producción de papa (Solanum tuberosum) con alternativas al uso de plaguicidas peligrosos en Tiazo San Vicente, provincia de Chimborazo*. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/341>
- Constante Calero, K. M. (2020). *Evaluación de resistencia a tizón tardío (Phytophthora infestans) en clones de papa (Solanum tuberosum)*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/31392>
- Cuesta Subía, H. X., & Rivadeneira Ruales, J. E. (2021). *Estado actual de la investigación de la papa en el Ecuador*. Quito, EC: INIAP-EESC, 2021. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5744>

- Cumbagin Torres, A. J., & Flores Morales, C. A. (2020). *Evaluación de sustratos orgánicos destinados a la propagación de Trichoderma harzianum como biocontrolador para fincas agroecológicas de la ASOCAMCAY, al norte de la provincia de Pichincha—Ecuador*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19492>
- Dahal, K., Li, X.-Q., Tai, H., Creelman, A., & Bizimungu, B. (2019). Improving Potato Stress Tolerance and Tuber Yield Under a Climate Change Scenario – A Current Overview. *Frontiers in Plant Science*, 10, 563. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00563>
- Du, Y., Chen, X., Guo, Y., Zhang, X., Zhang, H., Li, F., Huang, G., Meng, Y., & Shan, W. (2021). Phytophthora infestans RXLR effector PITG20303 targets a potato MKK1 protein to suppress plant immunity. *New Phytologist*, 229(1), 501-515. <https://doi.org/10.1111/nph.16861>
- Freire Tenelema, M. A. (2017). *Validación de una estrategia en el control de tizón tardío (Phytophthora infestans) en papa (Solanum tuberosum L.) con las variedades INIAP-libertad, INIAP-cecilia y superchola, en la provincia de Tungurahua*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/25472>
- Gabriel, J., Ortuño, N., & Vera, M. (2020). *MANUAL PARA EVALUACION DE DAÑOS DE ENFERMEDADES EN CULTIVOS AGRICOLAS* (Diagramación). Grupo Compas. <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/2093>
- Gakegne, E. R., Márquez, O. P., Hernández-Rodríguez, A., Pérez, Y. de L. F., & Coca, B. M. (2018). Actividad antagónica de Pseudomonas spp. Fluorescentes ante Alternaria solani Sorauer, patógeno de la papa (Solanum tuberosum L.). *Revista de Protección Vegetal*, 32(3), Article 3. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/924>
- García-Ávila, C. de J., Valenzuela-Tirado, G. A., Florencio-Anastasio, J. G., Ruiz-Galván, I., Moreno-Velázquez, M., Hernández-Macías, B., López-Buenfil, J. A., Bravo-Pérez, D.,

- Pineda-Ríos, J. M., Quezada-Salinas, A., & Ávila-Quezada, G. (2018). Organismos asociados a daños en tubérculos de papa en postcosecha. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(2), 308-320. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1801-1>
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R., & Kariman, K. (2018). Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117, 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>
- Guerra, G. A., Betancourth, C. A., & Salazar, C. E. (2011). ANTAGONISMO DE *Pseudomonas fluorescens* Migula FRENTE A *Fusarium oxysporum* fsp. Pisi Schtdl EN ARVEJA *Pisum sativum* L. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 33-42. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-42262011000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Harris, C., Pioquinto, E. B., & Rodríguez, M. P. (2020). Antagonismo de microorganismos nativos sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary aislada de *Solanum tuberosum* L. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias: CIBA*, 9(17), 23-43. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7362201>
- Hidalgo Dávila, J. L. (2017). *La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola: El sector florícola ecuatoriano*. <http://repositorio.uasb.edu.ec/handle/10644/6095>
- Hidalgo Ramírez, C. E., & Osorio Muñoz, E. A. (2013). *Evaluación y determinación de la capacidad secuestrante de los metales pesados cromo (CR) y cadmio (CD) por taxas de mohos aisladas de los alrededores de los ríos Cutuchi y Machángara*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/6006>

- Huilcapi Chauca, E. F. (2012). *Combate de tizón tardío (Phytophthora infestans) con activadores de defensas naturales en el cultivo de papa (Solanum tuberosum) c.v. Superchola*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/1607>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Instituto Colombiano Agropecuario, B. (Colombia). (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de la papa (Solanum tuberosum subsp. Andigena y S. phureja) :medidas para la temporada invernal*. ICA. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/2281>
- Jaramillo, C., & Gabriela, V. (2014). *Evaluación in vitro de la capacidad antagónica de Trichoderma spp. Frente a Fusarium sp., Alternaria sp. Y Phytophthora sp. - CORE*. <https://core.ac.uk/display/161342880>
- Jaramillo Neira, M. J. (2022). *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.)*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/22466>
- Jaroszuk-Ściśeł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., & Janusz, G. (2019). Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic Trichoderma DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>

- Kumar, H., Franzetti, L., Kaushal, A., & Kumar, D. (2019). *Pseudomonas fluorescens*: A potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology*, 69(9), 873-883. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7>
- Leal-Almanza, J., Gutiérrez-Coronado, M. A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Cortes-Jiménez, J. M., Santos-Villalobos, S. de los, Leal-Almanza, J., Gutiérrez-Coronado, M. A., Castro-Espinoza, L., Lares-Villa, F., Cortes-Jiménez, J. M., & Santos-Villalobos, S. de los. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra. *Agrociencia*, 52(8), 1149-1159. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-31952018000801149&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Manobanda Pilamunga, G. L. (2020). *Evaluación in vitro de tres extractos vegetales para el control de Phytophthora infestans y Puccinia pittieriana en papa (Solanum tuberosum)*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/30897>
- Márquez-Vasallo, Y., Salomón-Díaz, J. L., Acosta-Roca, R., Márquez-Vasallo, Y., Salomón-Díaz, J. L., & Acosta-Roca, R. (2020). Análisis de la interacción genotipo ambiente en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 41(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362020000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Martínez Arauz, E. R. (2019). *Dinámica temporal de moho azul (Peronospora tabacina Adam) manejado con fungicidas sintéticos en tabaco (Nicotiana tabacum cv Habano criollo 98), San Ramon, Esteli 2018-2019*. <https://core.ac.uk/reader/200260401>
- Mosquera Gutierrez, J. J. (2018). *Valoración de la aplicación de inóculos de microorganismos benéficos (MOBs) en el cultivo de rábano (Raphanus sativus) en la granja experimental- Paute*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16423>

- Muñoz Cuaical, S. D. (2016). *Evaluación de la eficacia de Trichoderma sp y Pseudomona sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13228>
- Niu, B., Wang, W., Yuan, Z., Sederoff, R. R., Sederoff, H., Chiang, V. L., & Borriss, R. (2020). Microbial Interactions Within Multiple-Strain Biological Control Agents Impact Soil-Borne Plant Disease. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.585404>
- Noroña Castellano, J. P., & Tipanquiza Ibáñez, J. J. (2010). *Evaluación del comportamiento en el cultivo de papa (solanum tuberosum) variedades «INIAP; Natividad, INIAP Estela»; versus un testigo, la variedad tradicional «Bolona» en el cantón Paute provincia del Azuay*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4744>
- Nugra Sánchez, A. N. (2018). *Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del Trichoderma spp*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15121>
- Paca Malca, J. H. (2010). *Respuesta del cultivo de la papa (Solanum tuberosum l.) variedad chaucha a la aplicación de cuatro tipos de abonos en tres dosis*. <http://dspace.esoch.edu.ec/handle/123456789/343>
- Pacilly, F. C. A., Groot, J. C. J., Hofstede, G. J., Schaap, B. F., & van Bueren, E. T. L. (2016). Analysing potato late blight control as a social-ecological system using fuzzy cognitive mapping. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(2), 35. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0370-1>
- Pedraza-Zapata, D. C., Sánchez-Garibello, A. M., Quevedo-Hidalgo, B., Moreno-Sarmiento, N., & Gutiérrez-Rojas, I. (2017). Promising cellulolytic fungi isolates for rice straw degradation. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 55(9), 711-719. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6282-1>

- Pérez Álvarez, S., Coto Arbelo, O., Echemendía Pérez, M., & Ávila Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno?: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen? *Revista de Protección Vegetal*, 30(3), 225-234. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522015000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Pérez Pozo, M. R. (2018). *Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando pseudomonas fluorescens*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15446>
- Pino, R. F., & Ortiz, M. E. (2006). Patrón de dispersión del tizón tardío de la papa y su influencia sobre la producción en el municipio Vargas, estado Táchira, Venezuela. *Bioagro*, 18(3), 145-148. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2222952>
- Pinzón-Junca, A., & Pinzón-Junca, A. (2019). *Pseudomonas*. *Acta Medica Colombiana*, 44(1), 52-52. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-24482019000100052&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Ramírez Muñoz, F., Fournier Leiva, M. L., Ruepert, C., & Hidalgo Ardón, C. (2016). Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. *Mesoamerican Journal of Agronomy; Agronomía Mesoamericana: Vol. 25, N° 2; 337-345*. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15441>
- Romero Larrea, C. A. (2019). *Rendimiento de semilla pre básica de papa (Solanum tuberosum) variedad chaucha roja, proveniente del sistema de producción aerónico*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/30477>
- S, S., Sharma, S., Bairwa, A., Tomar, M., Kumar, R., Bhardwaj, V., Jeevalatha, A., Bakade, R., Salaria, N., Thakur, K., Singh, B. P., & Chakrabarti, S. K. (2022). Spraying of dsRNA molecules derived from *Phytophthora infestans*, along with nanoclay carriers

- as a proof of concept for developing novel protection strategy for potato late blight. *Pest Management Science*, 78(7), 3183-3192. <https://doi.org/10.1002/ps.6949>
- Salazar López, M. J. (2018). *Efecto del Trichoderma harzianum. En el agua de riego y la microbiología del suelo.* <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/27126>
- Solano Gaón, E. A. (2018). *Evaluación de cuatro densidades de siembra de papa (solanum tuberosum l.) variedad superchola, categoría básica, para la producción de semilla registrada, en el cantón Bolívar, Carchi.* <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/8020>
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiw, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). Trichoderma: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, 9(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Subedi, P., Gattoni, K., Liu, W., Lawrence, K. S., & Park, S.-W. (2020). Current Utility of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents towards Plant-Parasitic Nematodes. *Plants*, 9(9), 1167. <https://doi.org/10.3390/plants9091167>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Tenorio-Bautista, S. M., & De La Cruz Marcos, R. N. (2019). Análisis de la diversidad de papas (Solanum spp.) con marcadores moleculares microsatélite de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata (Huancavelica) y Santillana (Ayacucho). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 10(1), 4-15. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2072-92942019000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Torres Granda, E. G. (2017). *Evaluación de la biodegradación de un insecticida piretroide en muestras de suelo de cultivo de papa mediante la adición de Trichoderma harzianum y Pleurotus ostreatus*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13679>
- Torres, H. (2002). *Manual de las enfermedades mas importantes de la papa en el Peru*. International Potato Center.
- Totsky, I. V., Rozanova, I. V., Safonova, A. D., Batov, A. S., Gureeva, Yu. A., Kochetov, A. V., & Khlestkina, E. K. (2020). Genomic regions of *Solanum tuberosum* L. associated with the tuber eye depth. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 24(5), 465-473. <https://doi.org/10.18699/VJ20.638>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Uribe, D., Ortiz, E., Portillo, M., Bautista, G., & Cerón, J. (1999). *Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la region cundiboyacense y su actividad antagonista in vitro sobre rhizoctonia solani*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/40883>
- US EPA, O. (2019, noviembre 19). *FY 2019 Agency Financial Report*. <https://www.epa.gov/planandbudget/fy-2019-agency-financial-report>
- Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XXI(1), 2-5. <https://www.redalyc.org/journal/776/77660294001/html/>

Yanes León, M. L. (2014). *Caracterización de una cepa de Pseudomonas fluorescens promotora del crecimiento vegetal.*

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/8857>

Yépez Bolaños, T. L. (2019). *Evaluación de la efectividad del Trichoderma sp. En el control de Roña (Spongospora subterranea) en el cultivo de papa (Solanum tuberosum L.) variedad Superchola parroquia Tulcán—Sector Guama* [Thesis, Universidad Politécnica Estatal del Carchi].

<http://www.repositorio.upec.edu.ec/handle/123456789/756>

ANEXOS

Anexo 1: Resultado de los análisis del suelo



ESTACION EXPERIMENTAL DEL AUSTRO
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS
 km 12 1/2 via El Descanso - BULLCAY - Gualaquino www@iniap.gob.ec
 Azuay - Ecuador TeleFax: (07) 2171161



INFORME DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO				DATOS DE LA PROPIEDAD				DATOS DE LA MUESTRA			
Nombre :	NICOLE UYAGUARI G.			Nombre :				Fecha Muestreo :	28/03/2022		
Dirección :	CUENCA			Provincia :	AZUAY			Fecha Ingreso :	05/04/2022		
Ciudad :	SIGSIG			Parroquia :	SAN BARTOLOME			Fecha Emisión :	08/04/2022		
Teléfono :	0983916840	Correo-e :	N/E	Ubicación :	N/E			Cultivo Actual :	PAPA		
Técnico :				Latitud :				Longitud :			

Nº Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm				ppm				meq/100ml																	
			N	P	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	Σ Bases	Ca/Mg	Mg/K	(Ca+Mg)/K													
7245		6.3	LAc	27.30	M	17.80	M	1.42	A	17.10	A	3.32	A	1.7	B	3.0	M	30.0	M	12.1	A	21.84	5.15	M	2.34	B	14.38	M

Interpretación:	
N, P, K, Ca, Mg, S	pH
Zn, Cu, Fe, Mn, B, Cl	
B = Bajo	MAC = Muy Acido
M = Medio	Ac = Acido
A = Alto	LAc = Lq. Acido
	PN = Frac. Neutro
	N = Neutro
	LAl = Lq. Alcalino
	MAl = Med. Alcalino
	Al = Alcalino
	RC = Requiere Cal

Determinación	Metodología	Refractante
N, P	Colorimétrica	Clasif.
K, Ca, Mg	Atomica	Modificado
Zn, Cu, Fe, Mn	Atomica	pH 8.5
pH	Practicovisual	Suete: agua (1:2.5)
S	Turbidimétrica	Fosfato de Ca
B	Colorimétrica	Monobásico

Niveles Máximos de Referencia					
N	20 - 40	Mg	1.0 - 3	Fe	20 - 40
P	10 - 20	S	19 - 20	Mn	5 - 10
K	0.2 - 0.4	Zn	4.0 - 8.0	B	0.5 - 1.0
Ca	4 - 8	Cu	1.0 - 10.0	Cl	

N/E : No entrega.
 Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento, los datos deberán ser apropiadamente citados.


ESTACION EXPERIMENTAL CHUQUIPATA
Laboratorio Suelos y Aguas
 Fecha de Impresión: 11/04/2022 Página 1 de 2



ESTACION EXPERIMENTAL DEL AUSTRO
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS
 km 12 1/2 via El Descanso - BULLCAY - Gualaquino www@iniap.gob.ec
 Azuay - Ecuador TeleFax: (07) 2171161



INFORME DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO				DATOS DE LA PROPIEDAD				DATOS DE LA MUESTRA			
Nombre :	NICOLE UYAGUARI G.			Nombre :				Fecha Muestreo :	28/03/2022		
Dirección :	CUENCA			Provincia :	AZUAY			Fecha Ingreso :	05/04/2022		
Ciudad :	SIGSIG			Parroquia :	SAN BARTOLOME			Fecha Emisión :	08/04/2022		
Teléfono :	0983916840	Correo-e :	N/E	Ubicación :	N/E			Cultivo Actual :	PAPA		
Técnico :				Latitud :				Longitud :			

Nº Laborat.	Identificación	Textura (%)			Clase Textural	cm ³ /cm ³				cm ³ /gr/cm ³		meq/100mL		dS/m		%		(%)			
		Arena	Limo	Arcilla		C.C.	Sat.	P.M.	A.D.	C.H.	D.A.	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	M.S.	H.	H.		
7245		50	16	34	Franco-Arcillo-Arenoso	0.29	0.49	0.19	0.10	0.22	1.30					0.29	NS	5.05	A		

Interpretación:		
Al+H, Al, Na	C.E.	M.O.
Ad = Adecuado	NS = No Salino	B = Bajo
LT = Ligero Toxic	LS = Lq. Salino	M = Medio
T = Toxic	S = Salino	A = Alto
	MS = Muy Salino	

Abreviaturas	
C.C.	Capacidad de Campo
Sat.	Saturación
P.M.	Punto de Marchitez
A.D.	Agua Disponible
C.H.	Conductividad Hidráulica

Abreviaturas	
C.E.	Conductividad Eléctrica
M.O.	Materia Orgánica
D.A.	Densidad Aparente
Ni	Nitrogeno Total
C/N	Relación Carbono: Nitrogeno
M.S.	Matena Seca
H.	Humedad

Determinación	Metodología	Extracción
L.O.	Activa elemental (LO)	No Aplica
No	Extracto de pasta saturada	Agua
C.E.	Extracto de pasta saturada	Agua
Ni	Semimicro Kjeldahl	No Aplica

Niveles de Referencia					
Al+H	0.51 - 1.50	C.E.	2.00 - 4.00		
Al	0.31 - 1.00		Medio		
	0.50 - 1.00	M.O.	3.10 - 5.00		

N/E: No Entrega.
 Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento, los datos deberán ser apropiadamente citados.


ESTACION EXPERIMENTAL CHUQUIPATA
Laboratorio Suelos y Aguas
 Fecha de Impresión: 11/04/2022 Página 2 de 2



ESTACION EXPERIMENTAL DEL AUSTRO
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS
 km 12 1/2 via El Descanso - BULLCAY - Gualaceo www@iniap.gob.ec
 Azuay - Ecuador TeleFax: (07) 2171161



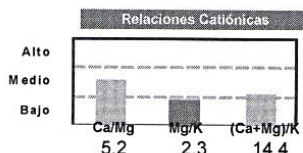
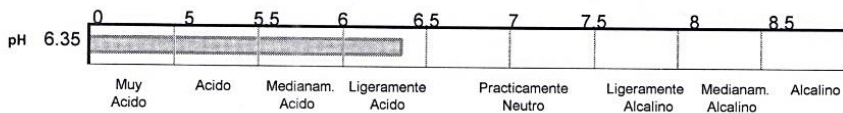
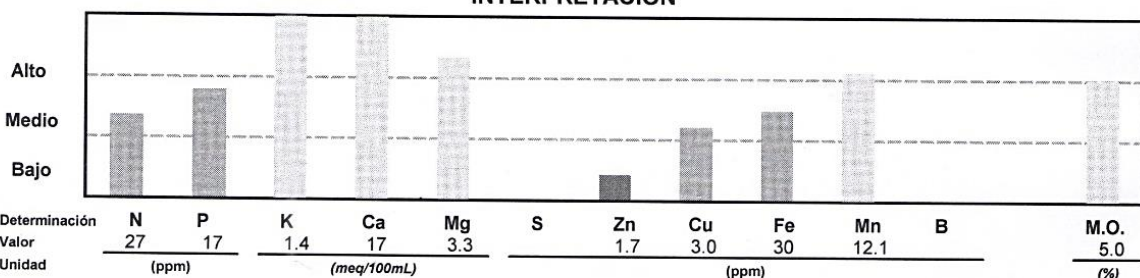
REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS

DATOS DEL PROPIETARIO			
Nombre : NICOLE UYAGUARI G.	Teléfono : 0983916840		
Dirección : CUENCA	e-mail : nuyaguari9601@gmail.com		
Ciudad : Sigsig			

DATOS DE LA PROPIEDAD			
Nombre :	Parroquia : Sigsig		
Provincia : Azuay	Ubicación : N/E		
Cantón : Sigsig	Latitud : Longitud :		

DATOS DE LA MUESTRA			
No. Laboratorio : 7245	Responsable Muestreo : Cliente	Factura No. : 0	
Identificación :	Fecha Muestreo : 28/03/2022	Fecha Análisis : 05/04/2022	
Cultivo Actual : PAPA	Fecha Ingreso : 05/04/2022	Fecha Emisión : 08/04/2022	

INTERPRETACION



Σ Bases
21,84
meq/100mL

% Materia Seca:
% Humedad:

Determinación	Metodología	Extractante
N, P	Colorimetría	Olsen
K, Ca, Mg	Absorción Atómica	Modificado pH 8.5
Zn, Cu, Fe, Mn		
S	Turbidimetría	Fosfato de Ca Monobásico
B	Colorimetría	Pasta Saturada
Cl	Volumetría	No aplica
M.O.	Oxidación Via Humeda	

Determinación	Metodología	Extractante
pH	Potenciométrica	Suelo: Agua (1:2.5)
CE	Conductometría	Pasta Saturada
Textura	Bouyoucos	No Aplica
Al	Volumetría	K, Cl, 1 N
Al + H		
Na	Absorción Atómica	Pasta Saturada
E Bases		Olsen Modificado pH 8.5

Niveles de Referencia Óptimos					
N	20 - 40	S	10 - 20	B	0,5 - 1,0
P	10 - 20	Zn	4 - 8	CJ	0 - 0
K	0,2 - 0,4	Cu	1 - 10	M.O.	3 - 5
Ca	4 - 8	Fe	20 - 40	Al+H	0,5 - 1,5
Mg	1 - 3	Mn	5 - 10	Al	0,3 - 1,0
				Ca/Mg	2 - 8
				Mg/K	2,5 - 10,0
				(Ca+Mg)/K	12,5 - 50,0

Responsable laboratorio

ESTACION EXPERIMENTAL CHUQUIPATA
Laboratorio de Suelos y Aguas

N/E: No Entrega
 Los resultados emitidos en este informe, corresponden únicamente a la(s) muestra(s) sometida(s) al ensayo.
 Se prohíbe la reproducción parcial, si se va a fotocopiar que sea de todo el documento original.

Fecha Impresión : 11/04/2022

Anexo 2: Capas enviadas por los laboratorios de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.

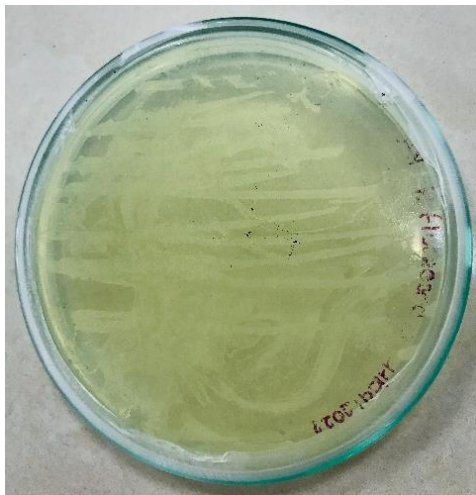


Figura 35: Identificación de Cepa *Pseudomonas fluorescens*

Fuente: Autor

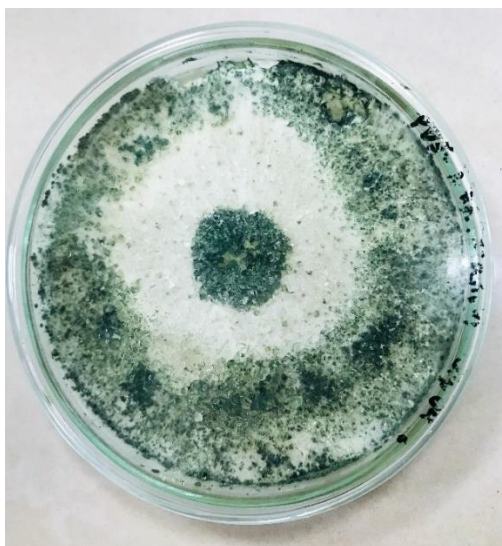


Figura 36: Identificación de Cepa *Trichoderma harzianum*

Fuente: Autor

Anexo 3: Bioaplicaciones semanales de los tratamientos desde la brotación de hojas hasta el inicio de floración.



Figura 37: Primera fumigación de cultivos en la semana 3 después de la siembra.

Fuente: Autor



Figura 38: Segunda fumigación de cultivos.

Fuente: Autor



Figura 39: Tercera fumigacion de cultivos.

Fuente: Autor



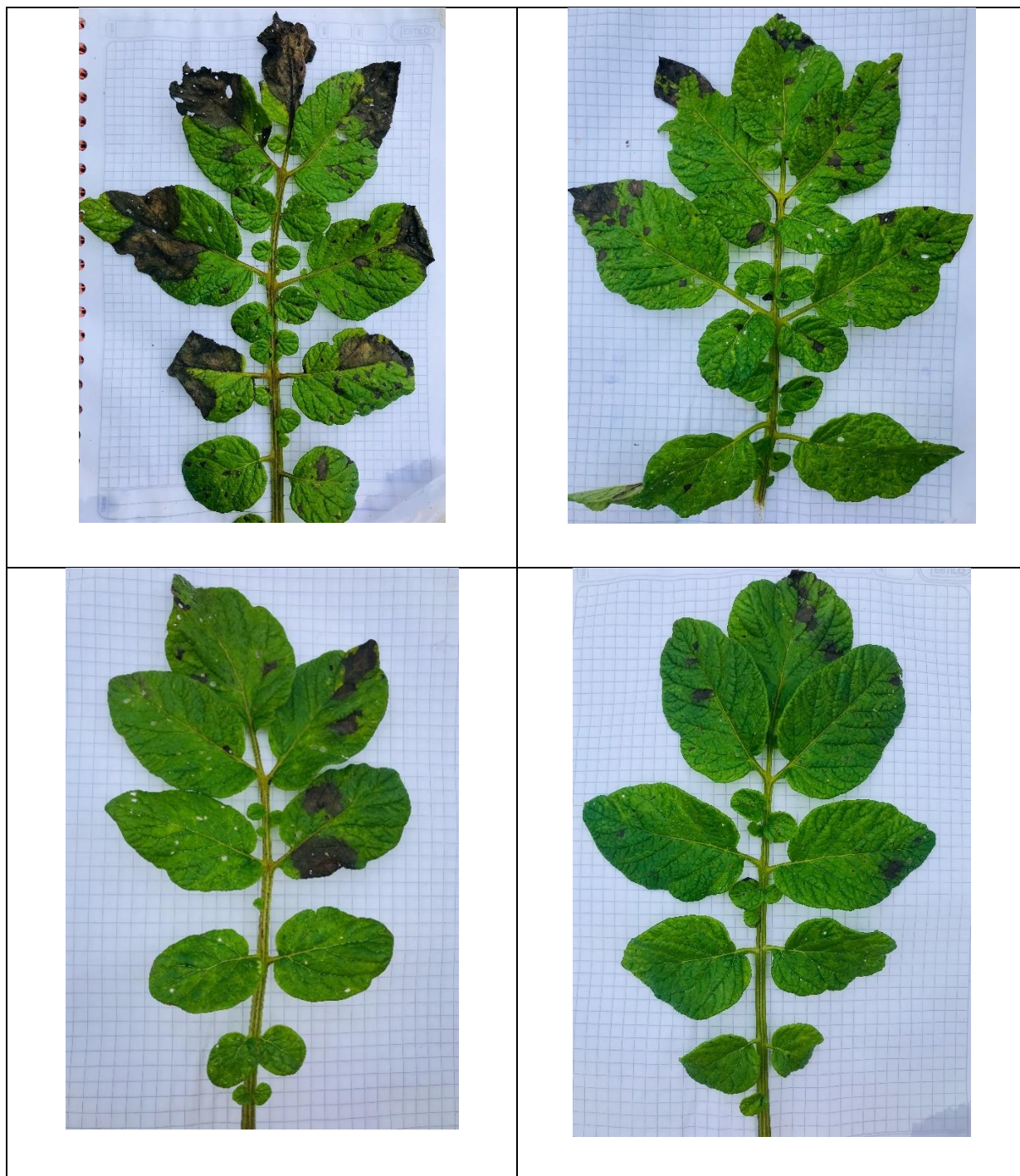
Figura 40: Primeras visualizaciones de incidencia y severidad cultivos.

Fuente: Autor



Figura 41: Floración del cultivo *Solanum tuberosum* L.

Fuente: Autor

Anexo 4: Evaluación de la severidad por tratamiento

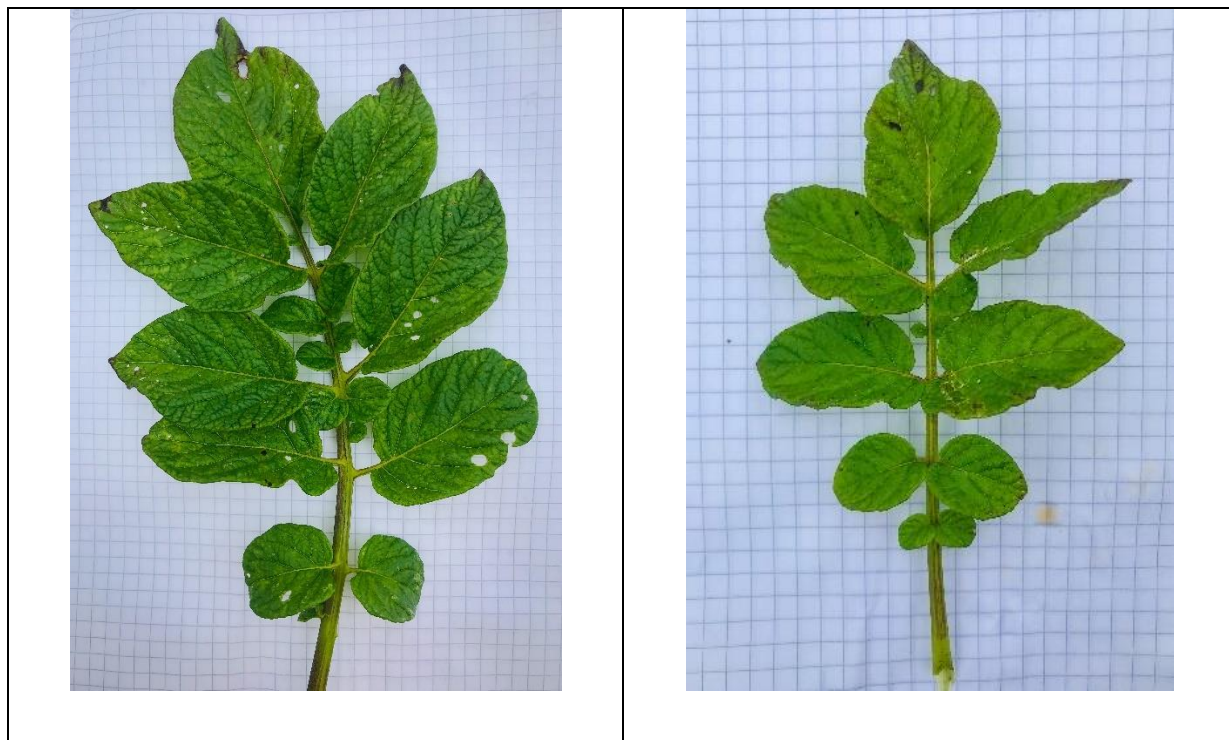


Figura 42: Severidad en hojas de planta de *Solanum tuberosum L.* escogidas al azar de cada tratamiento.

Fuente: Autor