UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

UNIDAD DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN AGROECOLOGÍA TROPICAL ANDINA

Tesis previa a la obtención del grado de Magister en Agroecología Tropical Andina.

"CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TARDÍO *Phytophthora infestans* EN PAPA *Solanum tuberosum* A TRAVÉS DE CONSORCIOS MICROBIANOS FORMADOS POR HONGOS NATIVOS DEL GÉNERO *Trichoderma sp.*"

Autor:
Adriana Elizabeth Bustamante Gavilanes.

Dirigido por:
Manuel Ernesto Delgado Fernández Ph.D.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
UNIDAD DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN AGROECOLOGÍA TROPICAL ANDINA

Autor:
Adriana Bustamante Gavilanes.

Dirigido por:
Manuel Delgado Fernández Ph. D.

"CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TARDÍO Phytophthora infestans EN PAPA Solanum tuberosum A TRAVÉS DE CONSORCIOS MICROBIANOS FORMADOS POR HONGOS NATIVOS DEL GÉNERO Trichoderma sp."

Esta investigación se fundamenta en el uso de microorganismos nativos en el control de enfermedades fitopatógenas, en este caso el control biológico del tizón tardío Phytophthora infestans en papa Solanum tuberosum a través de consorcios microbianos formados por hongos nativos del género Trichoderma sp.

Se evaluaron los consorcios microbianos formados por hongos nativos del género Trichoderma, de muestras de suelo del lugar de ensayo, se aislaron cinco cepas que fueron evaluadas in vitro para evidenciar su actividad antagónica frente a Phytophthora infestans.

El ensayo de campo se cumplió en la finca agroecológica situada en la zona de Cochapamba Chico de la parroquia Quingeo, cantón Cuenca consistió en el control biológico de Phytophthora infestans en plantas de papa variedad superchola que se trataron con aplicaciones foliares cada ocho días de consorcios de Trichoderma que determino la respuesta de las plantas en la altura de planta, grosor de tallo, número de hojas y biomasa de tubérculos.

En las pruebas de antagonismos las cepas inhibieron en promedio entre 83% y 87% al patógeno. En el ensayo de campo los tratamientos T2, T3, T4, T5 que emplean consorcios microbianos, en el análisis estadístico de las variables grosor de tallo, número de hojas y biomasa de tubérculos difieren significativamente con el testigo T6.

T3 Trichoderma harzianum+ Trichoderma sp. + Trichoderma atroviride resulto el tratamiento más efectivo como biocontrolador en base a los resultados obtenidos.

CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TARDÍO *Phytophthora infestans* EN PAPA *Solanum tuberosum* A TRAVÉS DE CONSORCIOS MICROBIANOS FORMADOS POR HONGOS NATIVOS DEL GÉNERO *Trichoderma* sp.

CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TARDÍO *Phytophthora infestans* EN PAPA *Solanum tuberosum* A TRAVÉS DE CONSORCIOS MICROBIANOS FORMADOS POR HONGOS NATIVOS DEL GÉNERO *Trichoderma* sp.

AUTORA:

ADRIANA BUSTAMANTE GAVILANES
Ingeniera Agropecuaria
Egresada de la Maestría en Agroecología Tropical y Andina

DIRIGIDO POR:

MANUEL ERNESTO DELGADO FERNÁNDEZ
Licenciado En Ciencias Químico Biológicas - Universidad de Cuenca
Master Biennale Di II Livello In Scienza E Tecnologie Per Un Utilizzo Sostenibile Delle Risorce Biologiche Non Tradizionali - Universidad de Pavía-Italia
Magister en Tecnologías para El Aprovechamiento De Recursos Naturales No Tradicionales - Universidad Politécnica salesiana
Doctor En Investigación PhD en Ecología Experimental y Geobotánica - Universidad de Pavía Italia
Docente de la Universidad Politécnica Salesiana

CUENCA – ECUADOR

2015

Datos de catalogación bibliográfica

ADRIANA ELIZABETH BUSTAMANTE GAVILANES

"CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TARDÍO *Phytophthora infestans* EN PAPA *Solanum tuberosum* A TRAVÉS DE CONSORCIOS MICROBIANOS FORMADOS POR HONGOS NATIVOS DEL GÉNERO *Trichoderma* sp."

Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca – Ecuador, 2015
MAESTRIA EN MAESTRÍA EN AGROECOLOGÍA TROPICAL Y ANDINA

Formato 170 x 240 mm Páginas: 76

Breve reseña del autor e información de contacto

Autora: **Adriana Elizabeth Bustamante Gavilanes**

Ingeniera Agropecuaria
Egresada de la Maestría en Agroecología Tropical y Andina
bustamante_adriana@ymail.com

Dirigido por: **Manuel Ernesto Delgado Fernández**

Licenciado En Ciencias Químico Biológicas por la Universidad de Cuenca
Master Biennale Di II Livello In Scienza E Tecnologie Per Un Utilizzo Sostenibile
Delle Risorce Biologiche Non Tradizionali por la Universidad de Pavía – Italia
Magister en Tecnologías para El Aprovechamiento De Recursos Naturales No Tradicionales por la Universidad Politécnica Salesiana
Doctor En Investigación PhD en Ecología Experimental y Geobotánica por la Universidad de Pavía – Italia
Docente de la Universidad Politécnica Salesiana
mdelgado@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

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

DERECHOS RESERVADOS
©2015 Universidad Politécnica Salesiana.
CUENCA – ECUADOR
ADRIANA ELIZABETH BUSTAMANTE GAVILANES
"CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TARDÍO *Phytophthora infestans* EN PAPA *Solanum tuberosum* A TRAVÉS DE CONSORCIOS MICROBIANOS FORMADOS POR HONGOS NATIVOS DEL GÉNERO *Trichoderma* sp.*"*

IMPRESO EN ECUADOR – PRINTED IN ECUADOR

INDICE GENERAL

DEDICATORIA XIII

PREFACIO XIII

PROLOGO XV

AGRADECIMIENTOS.....XVII

CAPITULO I 1
1.1. INTRODUCCIÓN.....1
1.1.1. ANTECEDENTES 1
1.1.2. JUSTIFICACION.....2
1.2. OBJETIVOS.....5
1.2.1. OBJETIVO GENERAL 5
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 5
1.3. HIPÓTESIS 5

CAPITULO II.....7
MARCO TEÓRICO 7
2.1. LA PAPA.....7
2.1.1. ORIGEN E IMPORTANCIA.....7
2.1.2. GENERALIDADES EDAFOCLIMÁTICAS 7
2.1.3. BOTÁNICA 8
2.1.4. MANEJO AGRONÓMICO 9
2.1.5 PROBLEMAS FITOSANITARIOS.....11
2.1.5.1. TIZÓN TARDÍO 11
2.1.5.1.1. SÍNTOMAS.....11
2.1.5.1.2. CICLO DE LA ENFERMEDAD 12
2.1.5.1.3. MÉTODOS DE CONTROL.....12
2.2. *Trichoderma* 15
2.2.1. Clasificación 15
2.2.1. MECANISMOS DE ACCIÓN.....16
a. Competencia.-.....16
b. Antibiosis.- 17
c. Inducción de resistencia en las plantas.-.....17
2.2.2. Beneficios De *Trichoderma* sp. 17

CAPITULO III 19
MATERIALES Y MÉTODOS.....19

3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO 19
3.2. OBTENCIÓN DE MATERIAL MICROBIOLÓGICO 19
3.2.1. Aislamiento de *Trichoderma* spp. 19
3.2.1.1. Muestreo de suelo 19
3.2.1.2. Análisis físico químico de muestras del suelo 20
3.2.1.3. Análisis microbiológico de muestras del suelo 22
3.2.2. Aislamiento: *Phytophthora infestans* 23
3.2.3. Taxonomía 24
3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA 24
3.4. ENSAYO DE CAMPO 26
3.4.1. Preparación de inóculos funginos de *Trichoderma* y *Phytophthora infestans* 26
3.4.1.1. Concentración de conidios 26
3.4.2. Diseño Experimental 27
3.4.3. Análisis Estadístico 19

CAPÍTULO IV 31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 31
4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO 31
4.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL MICROBIOLÓGICO 312
4.2.1. Aislamiento de *Trichoderma spp.* 32
4.2.1.1. Muestreo del Suelo 32
4.2.1.2. Análisis Físico Químico de muestras de suelo 33
4.2.1.3. Análisis Microbiológico 34
4.2.2. Aislamiento *Phytophthora infestans* 34
4.2.3. Taxonomía 34
4.3. ACTIVIDAD BIOLOGICA: CULTIVO DUAL 35
4.4. ENSAYO EN CAMPO 37
4.4.1. Preparación de inóculos 37
4.4.1.1. Concentración de conidiales 37
4.4.2. Diseño Experimental 38
4.4.2.1. Características de la parcela de investigación 38
4.4.3. Análisis Estadístico 39
4.4.3.1. Análisis de Varianza 41
4.4.3.1.1 Factor Altura de Planta 41
4.4.3.1.2 Grosor de tallo 42
4.4.3.1.3 Número de hojas por tallo 45
4.4.3.1.4 Biomasa de los tubérculos 48

CAPITULO V 53
CONCLUSIONES.....53
RECOMENDACIONES 55
BIBLIOGRAFIA.....57
BIBLIOGRAFIA.....57
LINKOGRAFIA.....57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de Phytophthora infestans 28
Figura 2 Corte en "V" para obtener muestra B. Homogenización de sub muestras de suelo para aislamiento de Trichoderma spp. Nativo.....37
Figura 3 Triángulo de texturas 39
Figura 4 Dilución seriada de muestras de suelo para aislamiento de Trichoderma sp 41
Figura 5 Cultivo monospórico de Trichoderma 41
Figura 6 A. Muestras de hojas con síntomas de Phytophora infestans, B. Disposición de muestras en medio del cultivo para crecimiento.....42
Figura 7 Prueba de Antagonismo. Cultivo dual 44
Figura 8 Preparación de inóculos de Trichoderma ssp. 45
Figura 9 Aislados monospóricos de Trichoderma.....46
Figura 10 Distribución de los tratamientos ensayo de campo 47
Figura 11 Ensayo de campo. A. Solución de Trichoderma aplicado a plantas con ataque de tizón tardío. B. Evaluación de variables.....49
Figura 12 Ubicación geográfica del ensayo 50
Figura 13 A. Muestreo de parcela de manejo orgánico B. Muestreo parcela de manejo convencional.....52
Figura 14 Vista microscopio de esporangios de A. Phytophthora infestans, B. Vista de hifas Trichoderma atroviride C. Vista de hifas Trichoderma citrinoviride.....54
Figura 15 Actividad biológica de cepas Trichoderma A. Antágonismo cepa M1, B. Antagonismo cepa M2, C. Antagonismo cepa F11, D Antagonismo cepa CEF1, E. Antagonismo cepa F8.....57
Figura 16 A. Siembra de papa var. superchola B. Parcela de papa 60 días C. Plantas de papa Solanum tuberosum con síntomas de tizón tardio Phytophthora infestans 58
Figura 17 Gráfica de barras altura media de plantas 61
Figura 18 Gráfica de barras grosor de tallo cm 62
Figura 19 Gráfica de barras valores medios de número de horas.....63
Figura 20 Gráfica de caja factor altura de planta.....65
Figura 21 Gráfica de caja análisis de varianza factor grosor de tallo.....45
Figura 22 Gráfica de cajas números de hojas.....48
Figura 23 Gráfica de cajas Factor Biomasa de Tubérculos 50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cuadro de variedades de papa por zonas de cultivo 9
Tabla 2 Fertilización orgánica del cultivo de papa Fuente: Suquilanda, 2011 10
Tabla 3 Niveles de resistencia a tizón tardio de las principales variedades de papa en Ecuador 13
Tabla 4 Clasificación pH Fuente: Valencia, 2004 21
Tabla 5 Interpretación de contenido de materia orgánica Método de Walkley-Black.22
Tabla 6 Escala de Bell 25
Tabla 7 Codificación de muestras de suelo 32
Tabla 8 Resultados de análisis de suelo.....33
Tabla 9 Porcentaje de partículas para determinar la textura.....33
Tabla 10 Cepas de Trichoderma sp. aisladas de la zona de estudio 34
Tabla 11 Cepas de Phytophthora infestans aisladas de la zona de estudio.....34
Tabla 12 Codificación de cepas de Trichoderma y Phytophthora infestans para evaluación de actividad biológica.....35
Tabla 13 Porcentaje de inhibición de Trichoderma sp. 36
Tabla 14 Número de esporas cepas de Trichoderma 37
Tabla 15 Tratamientos aplicados ensayo de campo Fuente Maestrante, 2014 38
Tabla 16 Valores medidos del grupo de datos de los factores de estudio.....61

DEDICATORIA

A las personas más importantes en mi vida Juan y Luisana.

PREFACIO

El Plan Nacional del Buen Vivir es la directriz para todos los sectores del Ecuador, es el lineamiento que toda entidad guarda con la Constitución.

La soberanía alimentaria es un objetivo estratégico del PNBV. A fin de lograr este objetivo estratégico en el artículo 281 de la Constitución de 2008 se hace un largo listado de responsabilidades del Estado, entre las cuales se mencionan: "Impulsar la producción , transformación agroalimentaria y pesquera de las pequeñas y medianas unidades de producción , comunitarias y de la economía social y solidaria; fortalecer la diversificación y la introducción de tecnologías ecológicas y orgánicas en la producción agropecuaria; generar sistemas justos y solidarios de distribución y comercialización de alimentos; impedir prácticas monopólicas y cualquier tipo de especulación con productos alimenticios".

Con estos antecedentes la Agroecología se convierte en una disciplina, una forma de vida para la producción agropecuaria, diseñada y evaluada como sistemas agro culturales productivos que optimizan los recursos locales y disminuyen el impacto ambiental negativo y socioeconómico de la producción industrial.

Esta investigación pretende aportar a la agricultura conocimientos de alternativa de control para el tizón tardío "*lancha"* en el cultivo de papa, cultivo de importancia económica cultural, en nuestro país, con el empleo de hongos nativos del género *Trichoderma.*

PROLOGO

La papa es una de los principales alimentos consumidos dentro de la canasta básica de los ecuatorianos.

Su mayor su zona de producción se ubica al norte del país. El agricultor de esta zona emplea alrededor de treinta y ocho agroquímicos para garantizar la cosecha del cultivo sin considerar el cuidado medioambiental, su salud, de su familia y de los consumidores de su producto (Crissman, *et al,* 2003).

El tizón tardío es una enfermedad de importancia económica dentro de este cultivo, debido a los costos de control. Principalmente el control de la enfermedad se lo realiza de manera química, pocos son los agricultores que emplean otros métodos.
Las prácticas agroecológicas son aplicables en toda escala productiva pues, tiene por objeto la integralidad y optimización de los recursos. (Oyarzun, 2013)

Trichoderma spp. ha sido objeto de estudio como biocontrolador de varias especies fitopatógenas demostrando efectividad en el control la mayoría de éstas.

Esta investigación demuestra la eficiencia de *Trichoderma* como biocontrolador del tizón tardío en el cultivo de papa.

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento a mis padres por su apoyo incondicional.

Quiero dejar constancia de mi gratitud a la Universidad Politécnica Salesiana por permitirme culminar una etapa de mi preparación profesional.
A Ernesto Delgado Fernández, PhD por el aporte de sus conocimientos a este trabajo investigativo.

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. ANTECEDENTES

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de los rubros más importantes de los sistemas de producción de la sierra ecuatoriana, así como constituye una fuente importante de alimentación e ingresos para las familias campesinas. Se estima que el 7% de la población económicamente activa del país, tiene a la papa como su principal medio de ingreso, alrededor de 375 000 personas dependen directa e indirectamente de este tubérculo para su subsistencia. (Reinoso, 2013)

El Instituto de Estadísticas y Censos (INEC), manifiesta que el cultivo de la papa en el Ecuador, ocupa una superficie de 66.000 hectáreas, con una producción promedio de 480.000 toneladas métricas anuales (Suquilanda, 2011).

En un artículo publicado en la prensa, el Ing. Hernán Lucero, técnico de INIAP, indica que la producción de papa en la región sur, Cañar, Azuay y Loja, disminuyó en un 40% en comparación a los índices de hasta el año 2000, principalmente por factores como la migración, altos costos de producción y el cambio climático relacionado especialmente con altas precipitaciones que inciden en el aumento de plagas y enfermedades como la "lancha"(tizón tardío), lo que produce altas pérdidas del cultivo derivando en el desinterés del productor por continuar con el cultivo . (Diario El Mercurio-Cuenca, 2012)

Según Oyarzun la papa es un cultivo de importancia social, cultural y económica, por su adaptabilidad en alturas comprendidas entre los 2700 a 3400 msnm, a lo largo del callejón interandino; en nuestro país se siembra alrededor de 55000 Ha de papa al año. (Oyarzun, *et. al*., 2013). El Instituto de Estadísticas y Censos (INEC), indica que a este cultivo se dedican en el país alrededor de 42 000 familias, tanto por su importancia nutricional, como por el aporte económico que representa a sus economías. (Suquilanda, 2011)

La papa se produce en las diez provincias de la Sierra, donde se ha identificado el manejo del cultivo bajo dos sistemas de producción: Tradicional o cultivo asociado, y un Monocultivo Semi tecnificado y Altamente Tecnificado. (Suquilanda, 2011).

En Azuay y Loja, debido a las bajas precipitaciones, la producción de papa es baja y el cultivo es de poca importancia. Entre los años 2000 a 2011, en la provincia de Azuay,

se han cultivado en promedio 2523 Ha de papa con un rendimiento de 3 Tm/Ha. (SIGAGRO, 2013).

El hongo *Phytophthora infestans* es el patógeno más importante de la papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*S. lyco*persicum) en el mundo entero.
En el Ecuador, esta especie ataca a otros cultivos Solanáceos con interés comercial como pepino (*S. muricatum*), tomate de árbol (*S. betaceum*) y naranjilla (*S. quitoense*), además de varias especies silvestres. (Hidalgo, *et. al*, 2006)

1.1.2. JUSTIFICACIÓN

El tizón tardío o lancha causado por *Phytophthora infestans*, puede destruir un cultivo en 10 a 15 días. Su principal método de control es con el uso de productos sistémicos y de contacto, pero el uso excesivo de agroquímicos trae consecuencias negativas para el ambiente y la salud además, en nuestro país su uso y aplicación en los pequeños productores no son eficientes por los altos costos que estos insumos demandan. (Robles, 2004)

El 30% de las parcelas prospectadas en el año 2000 en la zona central fueron abandonas debido al tizón. De una muestra de 40 parcelas investigadas, en las provincias de Chimborazo y Bolívar, 12 parcelas fueron abandonadas por causa de la enfermedad.
No existen estadísticas generales de los efectos del tizón tardío en términos de daños económicos en el cultivo, pero en estudios se ha determinado que el costo para el control de la enfermedad oscilan entre 200 a 600 USD, con un número promedio de aplicaciones entre cinco y quince, según las condiciones de precipitación y capacidad económica, y un valor total por fungicida más aplicación de 40 USD la hectárea, o sea que el control del tizón puede representar un costo entre el 8 y un 20% del valor comercial de la producción de papa si se considera que en 55,000 ha cultivadas X 220 qq/ha X 10 USD/qq = 121 millones USD. (Oyarzun *et al*., 2013)

En estudios en la provincia del Carchi, se ha identificado que los productores emplean grandes cantidades de insumos externos; entre ellos un total de 23 fungicidas y 19 insectidas el 80% de los cuales son altamente tóxicos como el Carbofurán y Metamidofos, los mismos que son aplicados con bomba de mochila y sin ningún tipo de protección. Este uso indiscriminado de agroquímicos deriva en alteraciones en el ambiente y la salud de los productores y sus familias y del consumidor. (Suquilanda, 2011).

Altieri en su artículo, Agroecología: principios y estrategias para diseñar una agricultura que conserva recursos naturales y asegura la soberanía alimentaria, analiza

que la degradación de los recursos naturales dentro del sistema socioeconómico deriva del monocultivo y el uso de tecnologías de alto insumo. Considera que las plantas cultivadas en monocultivos no poseen los mecanismos necesarios ecológicos de defensa para tolerar el impacto de las explosiones de poblaciones de plagas y enfermedades, por lo que si se quiere mantener un equilibrio de nutrientes en el suelo y una disminución del ataque de plagas, se requiere plantear cambios en el manejo de la agricultura. (Altieri, 2013)

La Agroecología surge como una posible respuesta a los elevados costos de producción con agroquímicos y a la contaminación que producen los mismos.
El manejo agroecológico de plagas promueve la administración integral de toda la finca, y las diferentes interacciones que se pueden dar entre sus elementos, la cantidad de insectos benéficos y pájaros que se encuentran en la finca cuando está diversificada y regulan las poblaciones de insectos en forma equilibrada. (Gómez, 2011)

La biodiversidad es una propiedad que condiciona la capacidad de recuperación del sistema edáfico ante una alteración y que le asegura su estabilidad funcional. (García, 2011)

En la rizosfera, la parte superior del suelo, desde la superficie hasta unos 30 cm., es donde existe la mayor biodiversidad, debido a que es una región altamente favorable para la proliferación y actividad metabólica de numerosos microorganismos. (García, et al; 2013)

En esta zona superficial, el componente vivo del suelo está compuesto por un 85-95% de raíces de plantas y un 5-15% de organismos del suelo. Dentro de estos organismos, generalmente un 15-30% pertenecen a lo que se ha dado en llamar macro- y mesofauna, mientras que el restante 70-85% son microorganismos (mayoritariamente, bacterias y hongos), los cuales son responsables del 80-90% de la actividad biológica de los suelos(Vallejo, et al; 2010)

Trichoderma sp. es un organismo biocontrolador con gran potencial antifúngico, se comporta como hiperparásito frente a diversos patógenos atacando directamente y produciendo la ruptura del micelio de los hongos productores de enfermedades de las plantas. (Centro de Educación y Tecnología, 2004)

Las especies de *Trichoderma* producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil y compuestos antifúngicos, por tal motivo han sido los microorganismos más utilizados en la agricultura para el control de enfermedades causadas por hongos. (Nina, *et al*., 2011)

En un estudio de evaluación de control biológico de *Phytophthora infestans* realizado en localidades paperas de nuestro país se determinó que cepas aisladas pertenecientes

a las especies *T. viride, T. harzianum y T. koningii* que fueron sometidas a pruebas de antagonismo in vitro, demostraron que, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* fueron las mejores por su eficiencia en reducir la capacidad de crecimiento de *P. infestans* en cajas de petri. Se probó la eficiencia de estas cepas bajo condiciones de invernadero en plantas de papa de una variedad resistente (Fripapa) y una susceptible (Superchola), comparándola con un tratamiento químico (Mancoceb 1g l^{-1}), *Trichoderma koningii* , mostró ser la más efectiva al presentar baja severidad de la enfermedad en ambas variedades superando incluso al tratamiento químico. (López, 2007)

Robles, en su artículo, uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos, indica que *Trichoderma* es efectivo para controlar a *Phytophthora capsici*, agente causal de la podredumbre de pimiento, pues, al aumentar los niveles de enzimas hidrolíticas β-1,3-glucanasa (lisis enzimática), ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el microorganismo fitopatógeno (micoparasitismo). Además, que los géneros *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* han demostrado efectividad al reducir in vitro hasta un 65 % las enfermedades causadas por *Alternaria solani* Sorauer y *Phytophthora infestans* Mont de Bary en tomate. También otros géneros han demostrado control de: *Fusarium oxysporum, Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Fusarium sp, Paracercospora fijiensis, Rhyzopus stolonifer, Mucor spp., Penicillium digitatum, Aspergillus niger y Pythium sp., Alternaria sp.*, entre otros. (Robles, 2012)

En otras investigaciones se ha demostrado que *Trichoderma* tiene gran potencial antagonista ante hongos patógenos del suelo. Un estudio de control in vitro de *Rizhoctonia solani* demostraron que el 98,31% de los aislados presentaron alta capacidad antagónica. (Martínez, *et. al.*, 2008).

Aplicado en tratamiento para *Botrytis cinerea* durante la floración en cultivos como uva y frutilla se ha demostrado que *Trichoderma* desplaza al patógeno de su sitio habitual de infección. (Centro de Educación y Tecnología, 2004)

En un estudio realizado de pruebas de eficiencia de cepas de *Trichoderma* se evidenció tanto de manera visual como estadística que las cepas aisladas de *Trichoderma koningii, Trichoderma harzianum*un presentaron un alto grado de antagonismo en pruebas de cultivos duales realizado con *P. infestans.* (López, 2007)

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficiencia de cepas nativas de hongos del género *Trichoderma*, como agentes de biocontrol del tizón tardío, enfermedad causada principalmente por el hongo *Phytophthora infestans* en parcelas de producción de papa *Solanum tuberosum*

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas de hongos del género *Trichoderma* en ecosistemas naturales y de agro ecosistemas en la parroquia Quingeo del cantón Cuenca-Ecuador
- Desarrollar pruebas de factibilidad in vitro de insolados funginos del género *Trichoderma* sp. en el control de *Phytophthora infestans* presente en el cultivo de papa, *Solanum tuberosum*
- Establecer la eficacia de consorcios microbianos formados por hongos nativos del género de *Trichoderma* en el control de *Phytophthora infestans* en parcelas de cultivo de papa *Solanum tuberosum* variedad Superchola, en zonas productivas de la parroquia Quingeo.

1.3. HIPÓTESIS

Los inóculos formados por consorcios de hongos nativos del género *Trichoderma* son potenciales biocontroladores del hongo *Phytophthora infestans* agente causal principal de la enfermedad conocida como tizón tardío en papa *Solanum tuberosum*

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. LA PAPA (*Solanum tuberosnum* L.)

2.1.1. ORIGEN E IMPORTANCIA

La mayor diversidad genética de papa cultivada y silvestre se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. El centro de domesticación del cultivo se encuentra en los alrededores del Lago Titicaca, cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. Cieza encontró tubérculos que los indígenas llamaban "papas", primero en la parte alta del valle del Cuzco, Perú y posteriormente en Quito, Ecuador (Pumisacho y Sherwood, 2002).

La papa es un alimento, muy nutritivo que desempeña funciones energéticas debido a su alto contenido en almidón, así como funciones reguladoras del organismo por su elevado contenido en vitaminas, minerales y fibra. Además, tiene un buen contenido de proteínas, presentando éstas un valor biológico relativamente alto dentro de los alimentos de origen vegetal. (Suquilanda, 2013)

2.1.2. GENERALIDADES EDAFOCLIMÁTICAS

En general, el cultivo de la papa en el país se desarrolla en terrenos irregulares, en laderas hasta con más de 45% de pendiente y en un rango de altitud de 2.400 a 3.800 m.s.n.m. en los pisos interandinos y subandinos, especialmente donde predominan el suelo negro andino, de textura franco, arenoso y rico en materia orgánica. Los requerimientos para el desarrollo del cultivo son zonas cuya temperatura media anual está entre los 6 y 14º Celsius, con una precipitación lluviosa de alrededor de 700 a 1200 milímetros de agua por ciclo. (Suquilanda, 2013)

La producción de papa en Ecuador se distribuye en tres zonas geográficas: norte, centro y sur. Las diferencias agroecológicas están determinadas no por la latitud, sino por las relaciones entre clima, fisiografía y altura.

Zona Norte: Carchi e Imbabura

Esta zona tiene la mayor producción de papa, por área al nivel nacional. Su rendimiento es en promedio de 21.7 t/ha. Los agricultores siembran durante todo el año, debido a la homogénea distribución de lluvias. Se utilizan altas cantidades de insumos externos, como insecticidas, fungicidas y fertilizantes.

Zona Centro: Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Bolívar

Chimborazo tiene la mayor superficie dedicada al cultivo al nivel nacional. Sin embargo, los rendimientos son relativamente bajos (11 t/ha). El clima de la provincia es muy heterogéneo.

Zona Sur: Cañar, Azuay y Loja

En Azuay y Loja, debido a las bajas precipitaciones, la producción de papa es baja y el cultivo es de poca importancia. Cañar es la provincia más papicultora, donde se encuentra el cultivo sobre los 2.000 m.s.n.m. La producción de la zona está entre las más bajas del país (8 a 10 t/ha). (Pumisacho y Sherwood, 2002)

2.1.3. BOTÁNICA

Según Pumisacho y Sherwood, 2002, la papa se enmarca en las siguientes categorías taxonómicas:

Familia: *Solanaceae*
Género: *Solanum*
Subgénero: *Potatoe*
Sección: *Petota*
Serie: Tuberosa

Es una dicotiledónea herbácea con hábitos de crecimiento rastrero o erecto, generalmente de tallos gruesos y leñosos, con entrenudos cortos. Los tallos son huecos o medulosos, excepto en los nudos que son sólidos, de forma angular y por lo general verdes o rojo púrpura. El follaje normalmente alcanza una altura entre 0.60 a 1.50 m. Las hojas son compuestas y pinnadas. Las hojas primarias de plántulas pueden ser simples, pero una planta madura contiene hojas compuestas en par y alternadas. Las hojas se ordenan en forma alterna a lo largo del tallo, dando un aspecto frondoso al follaje, especialmente en las variedades mejoradas.

Las flores nacen en racimos y por lo regular son terminales. Cada flor contiene órganos masculino (androceo) y femenino (gineceo). Son pentámeras (poseen cinco pétalos) y sépalos que pueden ser de variados colores, pero comúnmente blanco, amarillo, rojo y púrpura.

El fruto de la papa es una baya pequeña y carnosa que contiene semillas sexuales. La baya es de forma redonda u ovalada, de color verde amarillento o castaño rojizo. Posee dos lóculos con un promedio de 200 a 300 semillas. La semilla sexual se usa

generalmente con propósitos de mejoramiento. La papa posee una serie de ploidías (múltiples pares de cromosomas, con especies cultivadas desde el nivel diploide (2n=24 cromosomas), triploide (2n=36), tetraploide (2n=48), pentaploide (2n=60) y hasta hexaploide (2n=72) en las especies silvestres. Comúnmente las variedades nativas del Ecuador (ej. *Solanum phureja* o Chaucha) son diploides, mientras que las variedades cada vez más dominantes en el mercado son las tetraploides, genéticamente mejoradas, (ej. *Solanum tuberosum* como Superchola).

Los tubérculos son tallos carnosos que se originan en el extremo del estolón y tienen yemas y ojos. La formación de tubérculos es consecuencia de la proliferación del tejido de reserva que estimula el aumento de células hasta un factor de 64 veces. (Pumisacho y Sherwood, 2002)

Variedades de papa

En la siguiente figura se observa las variedades por la zona de cultivo.

Tabla 1 *Cuadro de variedades de papa por zonas de cultivo*

Zona de cultivo	Variedad
Norte: Carchi	Chola, Superchola, Gabriela, Esperanza. María, Fripapa 99, Capiro, Margarita, Yema de huevo (chauchas)
Centro: Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Chimborazo	Chola, Uvilla, Santa Catalina, Esperanza, Gabriela, María, Margarita, Rosita, Santa Isabel, Superchola, Yema de huevo, Fripapa, Cecilia
Sur: Cañar, Azuay, Loja	Uvilla, Bolona, Santa Catalina, Esperanza, Gabriela

Fuente: (Pusmisacho y Sherwood, 2002)

2.1.4. MANEJO AGRONÓMICO

Preparación terreno

La preparación de la parcela depende del tipo de suelo, condiciones climatológicas, humedad y pendiente.

Las labores culturales son actividades que se realizan después de que las plantas han nacido. En el país, las principales prácticas culturales asociadas con el manejo agronómico son: el retape, el rascadillo y los aporques (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Fertilización

En el Manual de Cultivos Andinos, Suquilanda, indica que la extracción de nutrimentos del suelo por el cultivo de papa depende de la variedad, fertilidad del suelo, condiciones climáticas, rendimiento y manejo del cultivo. Que el manejo de fertilización se puede realizar de la siguiente manera:

Abonado de fondo

Al momento de la siembra se aplicará al fondo del surco el abono orgánico disponible en la finca, complementado con los fertilizantes minerales que se indican a continuación:

- Estiércol descompuesto: 1.5 kg (3.3 libras) + 35 gramos de muriato de potasio o de sulpomag + 53 gramos de roca fosfórica por cada metro lineal de surco.
- Compost: 1 kg (2.2. libras) + 35 gramos de muriato de potasio o de sulpomag + 53 gramos de roca fosfórica por cada metro lineal de surco
- Para ayudar a un mejor desarrollo del cultivo y posibilitar una buena cosecha, se puede aplicar al follaje y en rotación cada 15 días los siguientes abonos foliares artesanales, en las dosis indicadas para completar una solución total de 20 litros.

Tabla 2 *Fertilización orgánica del cultivo de papa*

Tipo de abono	Dosis
Abono de frutas	100 cc
Biol	2 litros
Té de estiércol	2 litros

Fuente: Suquilanda, 2011

Siembra

La papa se cultiva en el Ecuador como monocultivo o de manera asociada. Todo tubérculo que se vaya a utilizar como semilla debe encontrase brotado o germinado, para ello se la semilla debe someterse al verdeo, el mismo que se logra sometiendo los tubérculos a la acción de la luz indirecta (difusa). Se recomienda que los tubérculos tengan muchos brotes y que estos sean cortos y vigorosos, para que su emergencia en el campo sea rápida. El tamaño óptimo de la semilla debe ser como el de un huevo de gallina y tener un peso aproximado de 60 gramos (2 onzas). Previo a la siembra, la semilla debe desinfectarse y desinfestarse 2 ó 3 semanas antes de la siembra o el mismo día de la siembra. (Suquilanda, 2011).

La distancia entre surcos depende de la variedad a cultivarse, de la finalidad del cultivo y de la pendiente del terreno. (Suquilanda, 2011)

2.1.5 PROBLEMAS FITOSANITARIOS

2.1.5.1. TIZÓN TARDÍO

El tizón tardío es causado por un oomiceto (organismo similar a los hongos) llamado *Phytophthora infestans*. Sus esporas se denominan esporangios y cuando las condiciones son adecuadas (alta humedad y baja temperatura) liberan esporas móviles llamadas zoosporas. Las esporas sexuales se denominan oosporas. Los esporangios y zoosporas son los que infectan hojas, tallos, frutos y tubérculos de papa. (Cáceres, *et al.*, 2007)

2.1.5.1.1. SÍNTOMAS

Torres, expone que los principales síntomas son:

Hojas: se presentan las manchas son de color marrón claro a oscuro, de apariencia húmeda, de forma irregular, algunas veces rodeadas por un halo amarillento, no están limitadas por las nervaduras de las hojas. Estos síntomas se presentan inicialmente en los bordes y puntas de las hojas. Bajo condiciones de alta humedad, se forman en la cara inferior (envés) de las hojas unas vellosidades blanquecinas que constituyen las estructuras del patógeno (esporangióforos y esporangios). Las lesiones se expanden rápidamente, se tornan marrón oscuro, se necrosan y causan la muerte del tejido. En el campo, las plantas severamente afectadas emiten un olor característico, debido a la rápida descomposición del tejido foliar.

Tallos y pecíolos: Las lesiones son necróticas, alargadas de 5 – 10 cm de longitud, de color marrón a negro, generalmente ubicadas desde el tercio medio a la parte superior de la planta, presentan consistencia vítrea. Cuando la enfermedad alcanza todo el diámetro del tallo, éstas se quiebran fácilmente al paso de las personas, equipos agrícolas o de vientos fuerte. En condiciones de alta humedad también hay esporulación sobre estas lesiones.

Tubérculos: Los tubérculos afectados presentan áreas irregulares, ligeramente hundidas. La piel toma una coloración marrón rojiza. Al corte transversal se pueden observar unas prolongaciones delgadas que van desde la superficie externa hacia la médula a manera de clavijas. En estados avanzados se nota una pudrición de apariencia granular de color castaño oscuro a parduzco, en estas condiciones puede ocurrir una pudrición secundaria causada por otros hongos (*Fusarium spp*.) y bacterias

(*Erwinia* spp.) provocando la desintegración del tubérculo y haciendo difícil el diagnóstico. (Torres, *et al,* 2011)

2.1.5.1.2. CICLO DE LA ENFERMEDAD

El ciclo de la enfermedad incluye dos fases, una sexual y otra asexual. El ciclo se inicia con esporangios que son transportados por el viento o por salpicaduras de lluvia desde solanáceas silvestres o cultivos de papa enfermos. Las esporas infectan a las hojas cuando estas están mojadas, las manchas crecen, alrededor de las manchas se produce una pelusilla que contiene esporangios, los cuales son transportados por el viento o por salpicaduras de lluvia a otras plantas reiniciando el ciclo en periodos que varían entre 4 y 12 días. Al mismo tiempo estos esporangios son transportados por gotas de lluvia a los tubérculos causándoles infección. Al sembrar estos tubérculos se originan plantas enfermas. (Agrios, 1998)
Ciclo de *Phytophthora infestans*

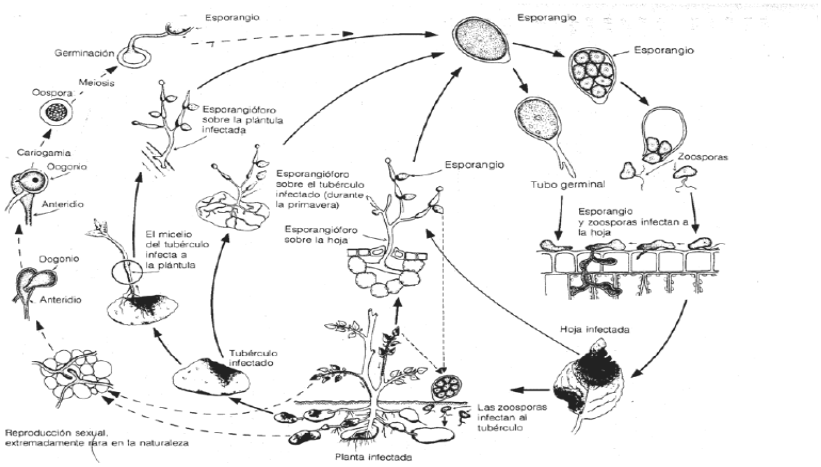


Figura 1 *Ciclo de Phytophthora infestans*
Fuente: Agrios, 1998

2.1.5.1.3. MÉTODOS DE CONTROL

Pérez y Forbes, 2008; mencionan que entre las estrategias de control se puede emplear cómo método el control integrado que consiste en: controles genético, químico, cultural y biológico. Este manejo integrado se realiza con la finalidad de disminuir o evitar las pérdidas que la enfermedad ocasiona, de tal manera que el agricultor logre una mayor rentabilidad, además de evitar daños a la salud humana y al medio ambiente.

Control Genético

Consiste en utilizar la habilidad que tienen algunas variedades o especies vegetales para impedir el desarrollo de la enfermedad debido a sus características intrínsecas.
De acuerdo al comportamiento de las variedades frente a *de Phytophthora infestans* estas pueden ser inmunes, resistentes o susceptibles.

- Variedad inmune es aquella que no se enferma, pues no existen especies del patógeno que la puedan infectar. Sin embargo, cuando la variedad es ampliamente sembrada, ciertas especies del patógeno que previamente estaban en baja frecuencia en la población son seleccionadas y la variedad deja de ser inmune.
- Variedad resistente es aquella que sí se enferma pero la enfermedad no avanza rápido y su rendimiento no es afectado. Así, las manchas no crecen rápido y la producción de esporangios es relativamente baja.
- Variedad susceptible es aquella que se enferma y que si las condiciones ambientales son óptimas para la enfermedad puede morir y por lo tanto su rendimiento se ve seriamente afectado. (Pérez y Forbes, 2008)

Tabla 3 *Niveles de resistencia a tizón tardío de las principales variedades de papa en Ecuador*

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

* Variedades mejoradas

**Variedades nativas

Fuente: Torres; *et. al*, 2011

Control Químico

Involucra la utilización de productos químicos capaces de prevenir la infección o realizar algún tipo de control posterior a la infección. Los productos usados para controlar el tizón tardío son clasificados como de contacto, sistémicos.

Los fungicidas de contacto afectan las estructuras del patógeno en la superficie de la planta actuando en sus fases de germinación y penetración. Un buen control del tizón con este tipo de fungicidas sólo se logra con aplicaciones frecuentes y a intervalos cortos entre las aplicaciones. Entre los fungicidas de contacto se encuentran los productos cúpricos y los ditiocarbamatos.

Los fungicidas sistémicos penetran en la planta y se movilizan translaminarmente del haz al envés o viceversa y luego del punto donde cayeron hacia la parte superior de la planta, es decir tienen un movimiento acropétalo. Las ventajas de los productos sistémicos es el intervalo entre aplicaciones puede ser distanciado y el fungicida no es lavado por las lluvias poco después de su aplicación. Los productos sistémicos para el control de tizón son Cimoxanil, Propamocarb, Dimetomorf, Fenilamidas, Fosetil-aluminio. (Fernández-Northcote, et al.1999)

Control Cultural

El control cultural involucra todas las actividades que se realizan durante el manejo agronómico del cultivo, que alteran las condiciones ambientales para el desarrollo del hospedante y la conducta del patógeno, de tal manera que evitan o reducen la actividad del patógeno.

- Selección de campos de cultivo. Los terrenos deben tener buen drenaje y adecuada ventilación para evitar acumulación de humedad en el follaje y suelo.
- Saneamiento. En parcelas pequeñas puede eliminarse cuidadosamente y en forma mecánica las hojas infectadas.
- Aporques. Realizar aporques para evitar o disminuir el contacto de los tubérculos con los esporangios.
- Riego. Evitar los riegos excesivos por inundación o aspersión, pues estos crean condiciones favorables para el patógeno.
- Nutrición de las plantas. Se reporta que dosis altas de fósforo y potasio reducen la severidad de lancha mientras que las dosis altas de nitrógeno la incrementan.
- Cosecha oportuna. Realizar cosechas oportunas y evitar realizar labores culturales bajo condiciones de humedad ya que favorece la diseminación de la enfermedad.
- Eliminación de tubérculos descartados. Después de la cosecha se recomienda recoger todos los tubérculos descartados, y utilizarlos como fuente de alimento para cerdos, o en su defecto quemarlos. (Torres, *et al,* 2011).

Control biológico
Es la reducción de la enfermedad por interacción de uno o más organismos vivos con el patógeno causante de la enfermedad. Numerosos trabajos han reportado el efecto antagonista de varios microorganismos contra *P. infestans*, entre los que se mencionan *Serratia* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Myrothecium* spp. Entre otros. (Pérez y Forbes, 2008)

2.2. *Trichoderma*

2.2.1. Clasificación

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

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* spp. En su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal.
Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas.

Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. (Infante, *et.al;* 2009)

Cruzat y Ionannidis, 2008; mencionan que el género *Trichoderma* fue identificado en 1871; es un hongo anaerobio facultativo microscópico, que se encuentra de manera natural en suelos agrícolas y otros tipos de medios.

Integran el género más de 30 especies ampliamente distribuidas en el mundo, en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos, principalmente en

aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente.

Trichoderma muestra diversas ventajas como agente de control biológico, debido a su rápido crecimiento y desarrollo; también produce una gran cantidad de enzimas capaces de degradar a otros organismos, cuya secreción se induce con la presencia de hongos fitopatógenos.

2.2.1. MECANISMOS DE ACCIÓN

Micoparasitismo.- este proceso incluiría el crecimiento del antagonista hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o formando estructuras similares a ganchos o apresorios en la superficie del hospedero, que le permitirían, penetrar al interior (del patógeno) y por acción de enzimas líticas (quitinasa y ß-1,3-glucanasa) degradar su pared celular. Este proceso se ha divido en cuatro etapas:

- Crecimiento quimiotrópico: *Trichoderma* detecta al parásito, y sus hifas inician su crecimiento en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.
- Reconocimiento: las investigaciones demuestran que *Trichoderma* es efectivo sólo a hongos fitopatógenos específicos, está selección se realiza por un reconocimiento molecular por las interacciones entre lectinas-carbohidratos, dónde las lectinas están directamente involucradas al microparasitismo.
- Adhesión y enrollamiento: las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios.
- Actividad lítica: En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista.

a. **Competencia.-** Este proceso ocurre cuando dos o más organismos requieren el mismo recurso y el uso de éste por uno, reduce la cantidad disponible para el otro. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, y otros.

b. **Antibiosis.-** La actividad antibiótica de *Trichoderma* se debería a la secreción de sustancia antibióticas o metabolitos que inhiben la actividad parasítica de los patógenos.

c. **Inducción de resistencia en las plantas.-** *Trichoderma* genera tres tipos de compuestos: proteínas con función enzimática, homólogos de proteínas, oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular, que son liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de enzimas de *Trichoderma*, los cuales son los responsables de inducir resistencia en las plantas. (Centro de Educación y Tecnología, 2004)

2.2.2. Beneficios De *Trichoderma* sp.

- Coloniza el suelo alrededor de las raíces, vuelve los nutrientes más disponibles para la planta.
- Provee una protección más duradera ya que crece con las raíces durante el ciclo de vida de la planta, protege las raíces de infecciones secundarias, insectos, bacterias.
- Las plantas producen sistemas radiculares más grandes.
- Ayuda a reducir el estrés de las plantas.(Cruzat y Ionannidis,2008)

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

El estudio se realizó en dos etapas.
La primera el estudio *in vitro:* análisis y determinación de actividad biológica de las cepas de *Trichoderma* sp.*,* frente a *Phytophthora infestans*, esta actividad se desarrolló en el Laboratorio Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.
La segunda es la valoración a campo abierto: evaluación de soluciones conidiales de *Trichoderma* sp.*,* en parcelas de cultivo de papa (*Solanum tuberosum)* con síntomas de la enfermedad.

3.2. OBTENCIÓN DE MATERIAL MICROBIOLÓGICO

3.2.1. Aislamiento de *Trichoderma* spp.

3.2.1.1. Muestreo de suelo

Al tratarse de superficies poco extensas con diferencias marcadas de manejo agronómico se realizó un muestreo selectivo a juicio. (Instituto Nacional de Ecología, 2014) y se empleó el método de la muestra compuesta. Se toman núcleos o submuestras al azar sobre el área, se combinan las submuestras en una muestra compuesta, el número de núcleos varía de 15 a 40. Se toma las muestras de la zona de las raíces o de la capa arable. Se unifican las submuestras y se envía una parte o el total al laboratorio. (McKean, 1993)

Para realizar el muestreo se tomaron submuestras al azar en forma de zigzag, abarcando todo el terreno. En cada zona de muestreo se tomó quince submuestras. Cada sub muestra fue extraída a una profundidad de 20 cm con una pala realizando un corte en "V". Se extrajo una porción de 5 cm de una de las paredes del hoyo.

De Cada grupo de sub muestras se homogenizaron para formar una muestra compuesta de alrededor de 500 g que se colocaron en una bolsa de plástico estéril.
Las muestras de suelo se trasladaron al laboratorio para su análisis físico – químico y microbiológico.

Figure 2 *Corte en "V" para obtener muestra B. Homogenización de sub muestras de suelo para aislamiento de Trichoderma spp. Nativo*
Fuente: Maestrante, 2014

3.2.1.2. Análisis físico químico de muestras de suelo

El análisis físico químico del suelo se lo realizó en el Laboratorio de Suelos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP, Estación Experimental del Austro.

Para esta investigación nos interesa conocer los valores de ciertas características físicas y químicas que influyen en la actividad biológica del suelo: a. pH, b. carbonatos, c. materia orgánica, d. capacidad de intercambio catiónico, e. textura.

Determinación del pH.- para medir el pH del suelo se emplea el método del potenciómetro. Que se basa en determinar la actividad del H^+ mediante un electrodo de vidrio que es sensible a H^+ y un electrodo de referencia. (McKean, 1993)

Tabla 4 *Clasificación pH*

Clasificación	pH	Observaciones
Excesivamente ácido	Menor de 4.0	Demasiado ácido para la mayoría de los cultivos
Fuertemente ácido	4.1 – 5.0	Unicamente cultivos tolerantes a la acidez pueden prosperar
Ácido	5.1 – 6.5	Aceptable para cultivos como: papa, sandía, calabaza, rábano, etc.
Ligeramente ácido	6.6 -7.0	Rango óptimo para la mayoría de cultivos

Ligeramente alcalino	7.1 – 7.3	Rango óptimo para la mayoría de cultivos
Moderamente alcalino	7.4 -7.6	Presentan problemas poco tolerantes a la alcalinidad
Fuertemente alcalino	7.7 – 8.5	Probablemente deficiencia de micronutrimentos
Muy alcalino	Más de 8.5	Indica probablemente exceso de Sodio

Fuente: **Valencia, 2004**

Determinación de Textura.- el objetivo es determinar el tamaño de las partículas elementales que integran a un suelo a través del análisis mecánico por el método de Bouyoucos. El método tiene por objetivo determinar el tamaño de las partículas elementales que integran a un suelo mediante la disgregación por agitación de la muestra para ello se emplea en una probeta Bouyoucos. Transcurridos 2 horas de reposo de la muestra se realiza la lectura del % de arena, limo y arcilla que son comparados en el triángulo de texturas. (Valencia, 2004)

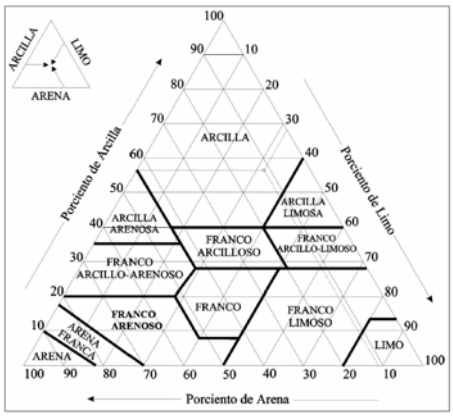


Figura 3 *Triángulo de texturas*
Fuente: Valencia, 2004

Determinación de Carbonatos.- mediante el empleo de ácido clorhídrico que produce efervescencia por el desprendimiento de CO_2 al contacto con los carbonatos libres. (McKean, 1993)

Determinación de la materia orgánica.- con el método Walkey y Black se determina el % de materia orgánica de la muestra de suelo. Se basa en la titulación de las muestras con el empleo de reactivos. Se pesa la muestra para el cálculo de porcentaje. (Valencia, 2004)

Tabla 5 *Interpretación de contenido de materia orgánica Método de Walkley-Black*

INTERPRETACIÓN	% DE MATERIA ORGÁNICA
Extremadamente pobre	Menor a 0,6
Pobre	0,6 - 1,20
Medianamente pobre	1,21 – 1,80
Mediano	1,81 – 2,40
Medianamente rico	2,41 – 3,00
Rico	3,01 – 4,20
Extremadamente rico	Mayor a 4,20

Fuente: **Maestrante, 2014**

Determinación CIC.- estima la cantidad de cationes absorbidos por un suelo en una solución amortiguadora como el acetato de amonio. (McKean, 1993)

3.2.1.3. Análisis microbiológico de muestras de suelo

La metodología empleada para el aislamiento de *Trichoderma* proveniente de muestras de suelo o de crecimiento de colonias en diferentes sustratos, utiliza la técnica de diluciones seriadas.

De las muestras se pesó diez gramos de suelo y se diluyó en 90 ml de agua. Las suspensiones fueron agitadas manualmente por cinco minutos. A partir de las suspensiones se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4}. Para el cultivo de microorganismos a partir de las diluciones se empleó el método de extensión en placa descrito por (Mondino, 2011)

Se tomó tomaron 1 ml de cada dilución y se inocularon por triplicado en medio Trichoderma, en placas Petri con agar selectivo para *Trichoderma* Medio Trichoderma de Plants Herbhere y esparcidas mediante un asa de cristal estéril. Las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 26 ºC durante 7 días hasta el desarrollo miceliar. Se repitió el proceso hasta la obtención de cultivos puros.

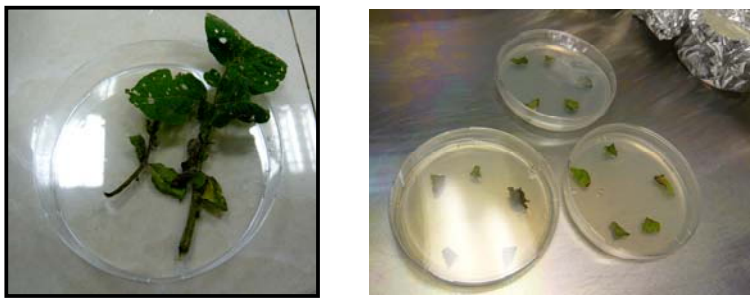
Figura 4 *Dilución seriada de muestras de suelo para aislamiento de Trichoderma sp.*
Fuente: Maestrante, 2014

Al observarse el desarrollo de micelio con características macroscópicas típicas de *Trichoderma*, se realizaron aislamientos sucesivos hasta la obtención de cultivos puros del hongo.

Figura 5 *Cultivo monospórico de Trichoderma*
Fuente: Maestrante, 2014

3.2.2. Aislamiento: *Phytophthora infestans*

De una parcela en producción se recogieron plantas que presentaron síntomas de la enfermedad. En las muestras de hojas y tallos se hicieron cortes de 1cm, se lavaron con agua corriente, y posterior una desinfección suave con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. (Agrios, 1998) estas muestras se colocaron en placas petri con terreno PDA. Las placas se sellaron con parafilm y fueron incubadas a una temperatura de 18°C, durante 5 días hasta el desarrollo del micelio.



A. B.

Figura 6. *A. Muestras de hojas con síntomas de Phytophora infestans, B. Disposición de muestras en medio del cultivo para crecimiento*
Fuente: **Maestrante, 2014**

Se aislaron los hongos que se desarrollaron en las placas en tubos a pico de clarín (cultivos puros).

3.2.3. Taxonomía

Se basa en el análisis macroscópico, microscópico y la utilización de claves taxonómicas específicas.

En el análisis macroscópico, se considera el aspecto de la colonia fungina, el color, el tipo de micelio, y el cambio de color en el terreno de cultivo. El análisis microscópico se basó en el tipo, la forma, la dimensión del conidióforo, del fiálides cuando se presenta, las esporas y del tipo de conidiogénesis.

Las claves taxonómicas utilizadas se reportan en el Dictionary of Fungi (P.M. Kirk. P.F. Cannon) que establece las referencias bibliográficas actuales de los géneros de hongos utilizados en esta investigación.

3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En placas Petri (90 x 15 mm), sobre medio de cultivo PDA, se depositaron discos de micelio DE (5 mm) de las especies de *Trichoderma*. Fruto de este análisis y del fitopatógeno (*Pytophthora infestans*) en posiciones opuestas y equidistantes.

Los testigos referénciales son cajas petri con medio PDA y el desarrollo por separado de los hongos del género *Trichoderma y Phytopthora* desde el borde de las cajas hasta el centro de las mismas, el ensayo se realizó por triplicado.
A los siete días de incubación a 25°C se evaluó el grado de antagonismo mediante la escala de Bell *et al*, 1982. (Centro de Educación y Tecnología, 2004)

Tabla 6 *Escala de Bell*

ESCALA DE ANTAGONISMO *Trichoderma* spp.	
Clase 1	*Trichoderma* spp. Crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio del cultivo.
Clase 2	*Trichoderma* spp. Crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio del cultivo.
Clase 3	*Trichoderma* spp. y el patógeno cubren la mitad de la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece en al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de *Trichoderma* spp., y cubre toda la superficie del medio de cultivo.

Fuente: Centro de Educación y Tecnología, 2004

Los aislamientos de *Trichoderma* que estuvieron en la clase 1 ó 2 se consideran altamente antagonistas.

El análisis se fundamenta en el método de Fokkema, 1973
Fórmula De Van Den Heuvel, en donde la inhibición se expresa en porcentajes:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times (R-r)/R$$

Donde, R y r corresponde a la medida de los radios de crecimiento de los micelios dirigidos hacia el centro de la caja correspondiente a los cultivos de control y cultivo dual. (Ramirez, *et. al*, 2006)

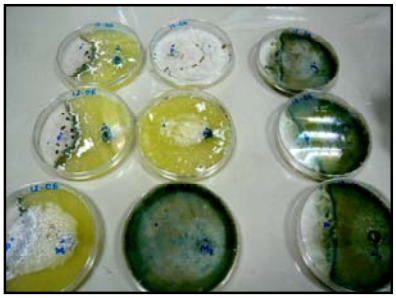


Figura 7 *Prueba de Antagonismo. Cultivo dual*
Fuente: **Maestrante, 2014**

3.4. ENSAYO DE CAMPO

3.4.1. Preparación de inóculos funginos de *Trichoderma* y *Phytophthora infestans*

De las cepas de *Trichoderma* spp., que se ubicaron en un grado de antagonismo 1 y 2 según la escala de Bell, *et al,* 1982 se preparó los inóculos en matraces de 500 ml con terreno PDA esterilizado a 120°C durante un lapso de 15 minutos. Cada cepa fungina fue cultivada durante 10 días a temperatura ambiente.

Se hicieron cinco lavados con 100 cc de agua destilada estéril, a los cultivos puros dispuestos en los matraces hasta completar 500cc, como se observa en la figura 15.

Figura 8 *Preparación de inóculos de Trichoderma ssp.*
Fuente: Maestrante, 2014

Cada inóculo utilizado se completó con 100 ml de solución de sacarosa al 5% hasta obtener un volumen de 600ml.

3.4.1.1. Concentración de conidios

Con la ayuda de la cámara de Neubauer se determinó la concentración de esporas. Para determinar la concentración de conidios (UFC/ml) o unidades formadoras de colonias por ml en la cámara de Neubauer se aplica la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{\text{Número de células}}{\text{Superficie recontada } (mm^2) \text{ X profundidad de la cámara (mm) X distancia}}$$

En la cámara se hace el conteo, con 3 repeticiones y luego se saca una media del grupo de datos.

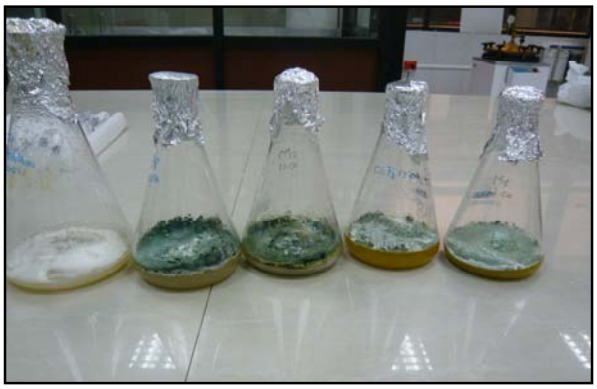


Figura 9 *Aislados monospóricos de Trichoderma*
Fuente: Maestrante, 2014

3.4.2. Diseño Experimental

El ensayo consta de:

- Un tratamiento convencional o tratamiento químico (T1); que se aplicó a plantas de papa *Solanum tuberosum.* El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en las fichas técnicas de producción de papa de variedades susceptibles a tizón tardío recomienda como tratamiento, los productos sistémicos en base de cymoxanil, dimethomorph y propamocarb.
- Un testigo referencial (control) son plantas de papa *Solanum tuberosum* que no recibieron ninguna aplicación o tratamiento (t6).
- Cuatro tratamientos conformados por consorcios de las cepas de hongos del género *Trichoderma* spp., T2, T3, T4, T5

Cada tratamiento se aplica con tres repeticiones y se aplica a cuatro unidades experimentales para su evaluación.

Las unidades experimentales se ubican en la parcela de manera aleatoria. (Ver fig. 16)

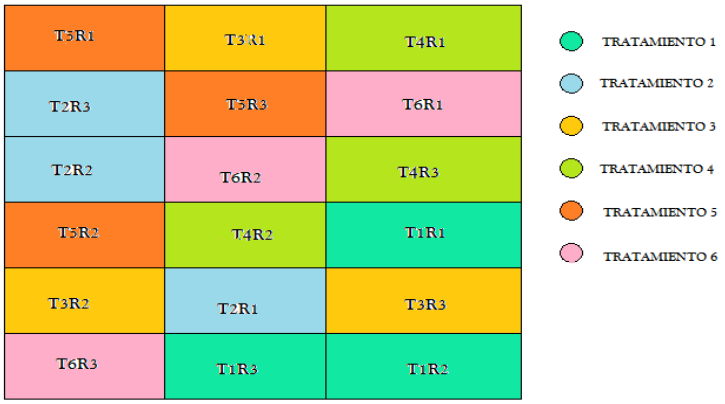


Figura 10 *Distribución de los tratamientos ensayo de campo*
Fuente: Maestrante, 2014

Los tratamientos se aplicaron de manera foliar semanalmente por tres ocasiones, las aplicaciones iniciaron a los 60 días después de la emergencia de los tubérculos, cuando las plantas presentaron síntomas de ataque del patógeno.
Para valorar los efectos de los tratamientos en relación al control se consideró los siguientes factores:

- Altura de planta: se consideró el desarrollo del tallo la base hasta la punta del primer foliolo.
- Grosor de tallo: con ayuda de micrómetro se midió el ancho del tallo. De las cuatro unidades experimentales se obtuvo una media por tratamiento.
- Número de hojas por tallo: se realizó el conteo del número de hojas en cada unidad experimental. De las cuatro unidades experimentales se obtuvo una media por tratamiento.
- Biomasa tubérculos: al final del cultivo de cada tratamiento se obtuvo el peso de los tubérculos cosechados por unidad experimental.

La altura de las plantas es un aspecto muy importante en el cultivo (Vogelezang, 2000). La elongación del tallo y una adecuada altura de planta, (Wilson y Rajapakse, 2001). Nos permitirá obtener mejores resultados y es un factor que nos indicará la eficacia de los tratamientos implantados en este análisis. De cada grupo de datos obtenidos por factor, se calculó los valores medios para realizar el análisis estadístico.

A.

B.

Figura 11 *Ensayo de campo. A. Solución de Trichoderma aplicado a plantas con ataque de tizón tardío. B. Evaluación de variables*
Fuente: Maestrante, 2014

3.4.3. Análisis Estadístico

Los tratamientos se evaluaron a través de un análisis de varianza y Pruebas de Tukey utilizando el programa estadístico MINITAB 15.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

La investigación se cumplió en la finca agroecológica situada en la zona de Cochapamba Chico de la parroquia Quingeo, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay-Ecuador, situada a 2780 msnm. Las coordenadas UTM del lugar son: longitud 0730790, latitud 96634465.

La zona se caracteriza por tener un clima templado, con una temperatura promedio de 14 ºC.

Ilustración 1. Ubicación geográfica del ensayo

Fuente: Google Maps, 2015

4.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL MICROBIOLÓGICO

4.2.1. Aislamiento de *Trichoderma* spp.

4.2.1.1. Muestreo de Suelo

En la tabla 1 se describe la ubicación de los lugares de muestreo de suelo empleados para el aislamiento de *Trichoderma.*

Código	Localidad	Ubicación	Coordenadas
M1	Cochapamba Chico	Ecosistema nativo	X 0730990, Y 9662816, Z 2780
M2		Parcela de cultivo papa	X 0730990, Y 9662816, Z 2780
M3		Huerto manejo orgánico	X 0730790, Y 9663465, Z 2670
M4	Quingeoloma	Huerto convencional	X 0730625 Y 9666247 Z 2654
M5		Huerto convencional	
M6		Parcela de producción convencional	

Tabla 1 *Codificación de muestras de suelo*
Fuente: Maestrante, 2014

Para la selección de las unidades productivas se consideró la recomendación del Manual de Trichoderma elaborado por el Centro de Educación y Tecnología de Chile, 2004 que menciona que para la obtención de un agente de control biológico se debe dar énfasis a los aislamientos nativos pues éstos representan las condiciones agroecológicas de una región, por tanto, para la obtención de muestras se debe seleccionar predios con baja intervención humana, bosques, quebradas, etc., o sistemas productivos manejados sin el uso de agroquímicos y cuya fertilización sea orgánica.

A.

B.

Ilustración 2 A. *Muestreo de parcela de manejo orgánico B. Muestreo parcela de manejo convencional*
Fuente: Maestrante, 2014

4.2.1.2. Análisis Físico Químico de muestras de suelo

	pH	C. org.	P	K	Ca	Mg	Na	Al	CIC
		%	(ppm)		meq *100 gr				
Muestra	6.5	5,49	28,7	0,76	5,74	1,12	0,006	0,22	15,6

Tabla 2 *Resultados de análisis de suelo*
Fuente: INIAP, 2014

Según referencia de la tabla los valores de pH me indican que el suelo de la zona es suelo con pH ácido que es aceptable para el cultivo de papa.

	Arena	Arcilla	Limo
	%	%	%
Muestra	1	43	32.96

Tabla 3 *Porcentaje de partículas para determinar la textura*
Fuente Maestrante, 2014

Según lectura del triángulo de textura la zona de estudio presenta un suelo con textura franco arcillo limoso.

El porcentaje de materia orgánica, 5.49%, nos indica según tabla es una superficie rica en materia orgánica.

4.2.1.3. Análisis Microbiológico

En la tabla 10 se presenta la identificación y procedencia de las diferentes cepas aisladas de *Trichoderma* spp. y *Phytophthora infestans*.

Las dos cepas de *Trichoderma* spp., M1 y M2, que fueron objeto de nuestro estudio se obtuvieron de la finca agroecológica ubicada en el sector de Cochapamba Chico.

Código	Microorganismo	Localidad	Ubicación
M1	*Trichoderma* spp.	Cochapamba Chico	Ecosistema nativo
M2			Parcela de cultivos transitorios

Tabla 4 *Cepas de Trichoderma sp. aisladas de la zona de estudio*
Fuente: Maestrante, 2014

4.2.2. Aislamiento *Phytophthora infestans*

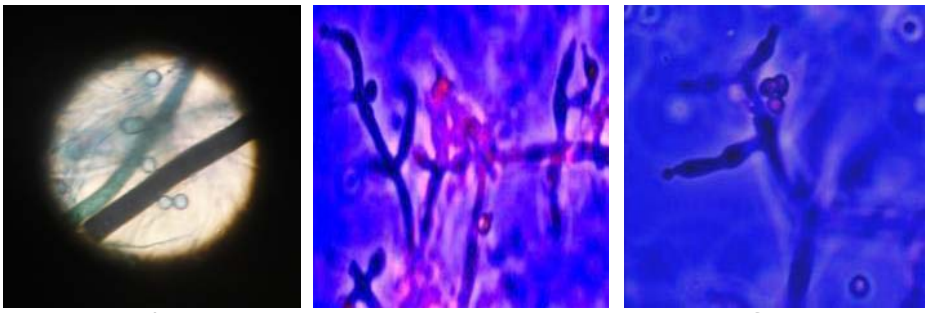
De las muestras de plantas de papa con síntomas de la enfermedad se aislaron cepas de *Phytophthora infestans.*

P	*Phytophthora infestans*	Parcela de papa var. nativa chaucha amarilla

Tabla 5 *Cepas de Phytophthora infestans aisladas de la zona de estudio*
Fuente: Maestrante, 2014

4.3.3. Taxonomía

En la Figura se presenta una vista al microscopio amplificación 100x de:
A. estructuras de conidióforos de *Phytophthora infestans*, B. hifas de *Trichoderma atroviride y C.* hifas *Trichoderma citrinoviride.*



A. B. C.

Ilustración 3 *Vista microscopio de esporangios de A. Phytophthora infestans, B. Vista de hifas Trichoderma atroviride C. Vista de hifas Trichoderma citrinoviride*
Fuente: Maestrante, 2014

4.3. ACTIVIDAD BIOLOGICA: CULTIVO DUAL

En la tabla 4 se presenta los códigos asignados a las cepas objeto de estudio.

CÓDIGO	CEPA
F8	*Trichoderma atroviride*
F11	*Trichoderma citrinoviride*
CEF1	*Trichoderma harzianum*
M1	*Trichoderma* spp.
M2	*Trichoderma* spp.
P	*Phytophthora infestans*

Tabla 6 *Codificación de cepas de Trichoderma y Phytophthora infestans para evaluación de actividad biológica.*
Fuente: Maestrante, 2014

La tabla 13 indica el porcentaje de crecimiento inhibitorio de las cepas de *Trichoderma* spp. a las 48 horas, 72 horas y 96 horas.

	48 h	**72 h**	**96 h**	**% inhibición**
Cepas	**Tasa de crecimiento (% / h)**			
F8	88	79	81	**83**
P	90	73	75	79
CEF1	87	86	86	**86**
P	80	73	75	76
M1	83	83	85	**84**
P	90	77	78	82
M2	90	85	85	**87**
P	90	73	75	79
F11	83	61	65	**70**
P	85	80	75	80

Tabla 7 *Porcentaje de inhibición de Trichoderma sp.*
Fuente: Maestrante, 2014

Como se observa en la tabla porcentaje de inhibición, todas las cepas de *Trichoderma* mostraron eficiencia para aislar al patógeno.

CEF1 y M2 presentaron efecto inhibitorio a las 48 horas de iniciado el ANÁLISIS enfrentamiento.
F8 inhibe el crecimiento del patógeno a las 72 horas.
Dentro de la escala de antagonismo (Bell, *et al*., 1982), las cepas: CEF1, M1, M2 se ubican en la clase 1; Que nos indica que el antagonista se desarrolló sobre el patógeno. F8 en la clase 2; F11 presenta un bajo porcentaje de inhibición, por lo que no se considera en la investigación.
En base a los resultados obtenidos se formaron los consorcios que constituyen los tratamientos. (Ver tabla 15)

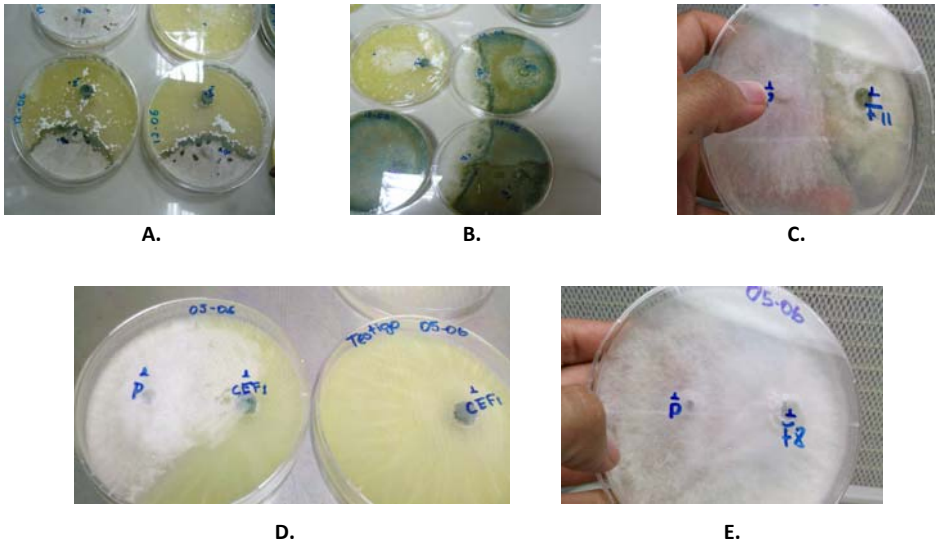


Ilustración 4 *Actividad biológica de cepas Trichoderma A. Antágonismo cepa M1, B. Antagonismo cepa M2, C. Antagonismo cepa F11, D Antagonismo cepa CEF1, E. Antagonismo cepa F8*
Fuente: Maestrante, 2014

4.4. ENSAYO EN CAMPO

4.4.1. Preparación de inóculos

4.4.1.1. Concentraciones conidiales

Como se observa en la tabla 14 el promedio de número de esporas y las unidades formadoras de colonia para las cepas de *Trichoderma*.

	Esporas Recontadas 1	Esporas recontadas 2	Esporas recontadas 3	Promedio total	Neubauer	UFC
F8	29,75	30,25	29,95	29,83	0,4	74,58
CEF1	29,75	30,5	34,75	31,66	0,4	79,16

Tabla 8 *Número de esporas cepas de Trichoderma*
Fuente: Maestrante, 2014

4.4.2. Diseño Experimental

4.4.2.1. Características de la parcela de investigación

Siembra.- distancia de 50cm entre planta y 110cm entre hileras según lo recomienda Suquilanda, 2011 en su Manual de Cultivos Andinos.
Fertilización.- inicial con compost 1 Kg por planta, más muriato de potasio y roca fosfórica y complementaria con biol, 2 litros en 20 litros de agua al mes de emergencia de las plantas.
Labores culturales.- Necesarias para el desarrollo del cultivo, deshierbas y aporques.

A.

B.

C.

Ilustración 5 A. Siembra de papa var. superchola B. Parcela de papa 60 días C. Plantas de papa Solanum tuberosum con síntomas de tizón tardio Phytophthora infestans
Fuente: Maestrante, 2014

CÓDIGO	TRATAMIENTO	COMPOSICIÓN	DOSIS EMPLEADA
T1 Químico	Ridomil Gold MZ	Mancozeb 640 g +Metalaxil-M 40 g	3 Kg/Ha
T2 F8, M2, CEF1	Consorcio *Trichoderma*	*Trichoderma atroviride*+*Trichoderma* sp. + *Trichoderma harzianum*	50 ml / planta
T3 CEF1, M1, F8	Consorcio *Trichoderma*	*Trichoderma harzianum*+ *Trichoderma* sp. + *Trichoderma atroviride*	50 ml / planta
T4 M1, F8, M2	Consorcio *Trichoderma*	*Trichoderma* sp. + *Trichoderma atroviride* + *Trichoderma* sp.	50 ml / planta
T5 M2, CEF1, M1	Consorcio *Trichoderma*	*Trichoderma* sp.+ *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma* sp.	50 ml / planta
T6	Sin tratamiento	Control	

Tabla 9 *Tratamientos aplicados ensayo de campo*
Fuente: Maestrante, 2014

	PRIMERA APLICACIÓN 60 DÍAS			SEGUNDA APLICACIÓN 70 DÍAS			TERCERA APLICACIÓN 80 DÍAS			COSECHA
	ALTURA	ANCHO DE TALLO	Nº HOJAS	ALTURA	ANCHO DE TALLO	Nº HOJAS	ALTURA	ANCHO DE TALLO	Nº HOJAS	BIOMASA TUBÉRCULOS
T1	73.00	1.07	12.67	79.33	1.20	18.00	81.33	1.27	21.00	**2.41**
T2	79.67	1.00	17.00	82.33	1.50	22.33	84.67	1.53	27.33	2.59
T3	84.67	1.33	20.00	85.00	1.77	27.67	87.33	1.77	29.33	2.72
T4	72.00	1.37	16.67	77.00	1.50	17.67	79.67	1.53	23.67	2.72
T5	76.44	1.34	16.65	81.04	1.50	21.35	83.21	1.53	25.07	2.73
T6	67.33	1.13	8.33	73.33	1.23	15.00	73.67	1.27	18.33	2.70

Tabla 10 *Valores medidos del grupo de datos de los factores de estudio*
Fuente: Maestrante, 2014

4.4.3. Análisis Estadístico

En la tabla 16 observamos los resultados de las medias obtenidas en cada variable en cada aplicación.

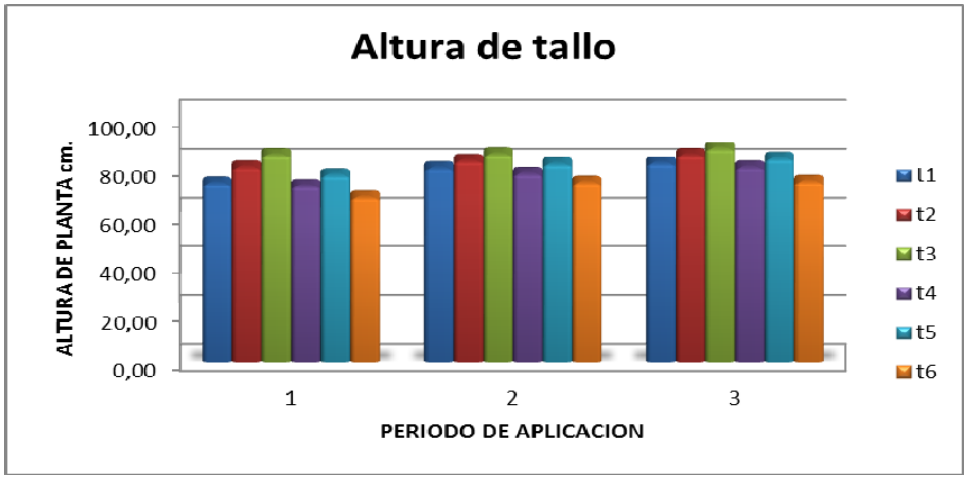


Ilustración 6 *Gráfica de barras altura media de plantas*
Fuente: Maestrante, 2014

Se evidencia en la figura un mayor desarrollo del tallo en las plantas que recibieron el tratamiento 3.

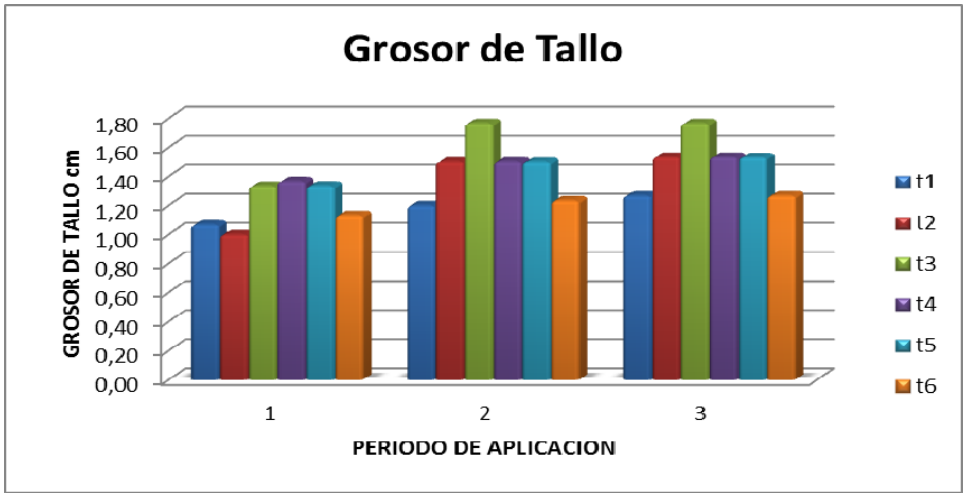


Ilustración 7 ***Gráfica de barras grosor de tallo cm***
Fuente: Maestrante, 2014

Aquí podemos observar, en lo referente al grosor del tallo que existe un mayor desarrollo en el grupo de plantas que recibieron el tratamiento 3 esto a partir de la segunda aplicación de los tratamientos.

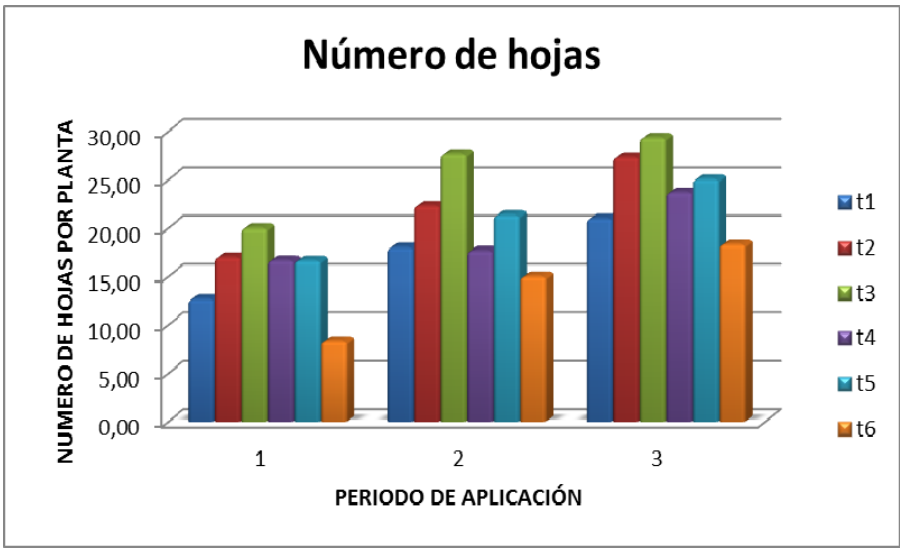


Ilustración 8 *Gráfica de barras valores medios de número de horas*
Fuente: Maestrante, 2014

En la figura podemos observar que las plantas que recibieron el tratamiento 3 y el 2 presentan una mayor densidad en el número de hojas.

4.4.3.1. Análisis de Varianza

Esta prueba busca determinar diferencias entre las medias de los grupos de datos, de los tratamientos en este caso frente al testigo referencial (control) y el tratamiento químico que corresponde al T1. Para este análisis se empleó el programa estadístico MINITAB

4.4.3.1.1. Factor Altura de Planta

H0= Los valores medios de los grupos de datos de la altura de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son iguales
H1= Los valores medios de los grupos de datos de la altura de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

ANOVA Altura de Planta

```
Fuente  GL    SC   MC     F      P
Factor   5  1083  217  1.45  0.222
Error   48  7152  149
Total   53  8235

S = 12.21   R-cuad. = 13.16%   R-cuad.(ajustado) = 4.11%


                            ICs de 95% individuales para la media
                            basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N  Media   Desv.Est.    -+---------+---------+---------+-------
-
T1     9  77.89      14.73           (---------*----------)
T2     9  82.22       9.86                 (---------*---------)
T3     9  85.67       9.49                     (---------*---------)
T4     9  76.22      12.49         (---------*----------)
T5     9  78.78      12.91            (---------*----------)
T6     9  71.44      12.92   (---------*----------)
                             -+---------+---------+---------+--------
                            64.0      72.0      80.0      88.0

Desv.Est. agrupada = 12.21
```

Con los resultados obtenidos, podemos inferir que no existe diferencia estadísticamente significativa en los grupos de datos que se refieren a la altura de planta.

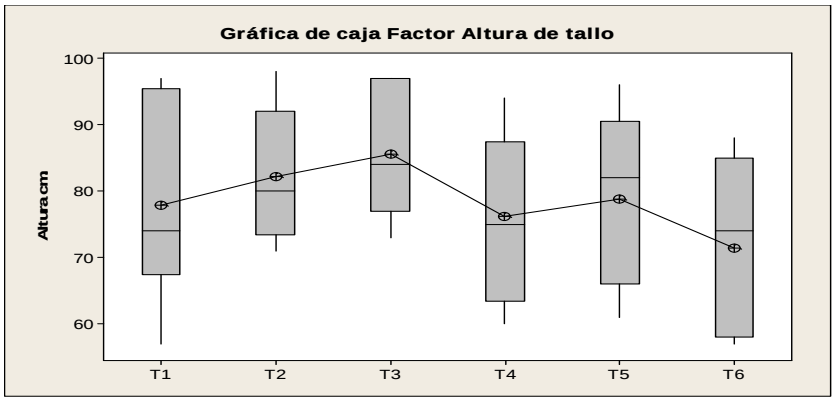


Ilustración 9 *Gráfica de caja factor altura de planta*
Fuente: Maestrante, 2014

Se acepta la H0: Los valores medios de los grupos de datos de la altura de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son iguales. En el boxplot, se ilustra lo expuesto anteriormente, existe una cierta diferencia entre los grupos de datos, aunque esta diferencia no sea significativa estadísticamente.

4.4.3.1.2. Grosor de tallo

Se plantea las siguientes hipótesis.

H0: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren al grosor del tallo de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son iguales

H1: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren al grosor del tallo de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

ANOVA Grosor de Tallo

```
Fuente  GL      SC      MC     F      P

Factor   5  1.5037  0.3007  4.38  0.002
Error   48  3.2978  0.0687
Total   53  4.8015

S = 0.2621   R-cuad. = 31.32%   R-cuad.(ajustado) = 24.16%


                            ICs de 95% individuales para la media
                            basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N   Media  Desv.Est.   +---------+---------+---------+---------

T1     9  1.1778     0.2167    (--------*--------)
T2     9  1.4778     0.2728                    (--------*--------)
T3     9  1.6222     0.2906                        (--------*--------)
T4     9  1.4667     0.2345                    (-------*--------)
T5     9  1.5556     0.3432                       (--------*--------)
T6     9  1.2111     0.1833      (--------*-------)
                               +---------+---------+---------+---------
                            1.00      1.20      1.40      1.60

Desv.Est. agrupada = 0.2621
```

Según los resultados de la tabla 9, en esta variable se presentan diferencias altamente significativas entre los tratamientos, en esta variable se acepta la hipótesis alternativa, H1, los valores del grosor de tallo de los tratamientos T1 y T6 difieren significativamente de los demás tratamientos.

```
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.54%

Se restó T1 a:

    Inferior  Centro  Superior---------+---------+---------+---------+

T2   -0.0670  0.3000    0.6670                   (---------*--------)
T3    0.0775  0.4444    0.8114                     (--------*--------)
T4   -0.0781  0.2889    0.6558                   (--------*--------)
T5    0.0108  0.3778    0.7447                    (--------*---------)
T6   -0.3336  0.0333    0.4003             (--------*--------)
                                 ---------+---------+---------+---------+
                                      -0.40      0.00      0.40      0.80


Se restó T2 a:

    Inferior   Centro  Superior---------+---------+---------+---------
+
T3   -0.2225   0.1444    0.5114               (---------*--------)
T4   -0.3781  -0.0111    0.3558            (--------*--------)
T5   -0.2892   0.0778    0.4447              (--------*--------)
T6   -0.6336  -0.2667    0.1003     (--------*---------)
                                 ---------+---------+---------+---------+
                                      -0.40      0.00      0.40      0.80

Se restó T3 a:

    Inferior   Centro  Superior---------+---------+---------+---------
+
T4   -0.5225  -0.1556    0.2114        (--------*--------)
T5   -0.4336  -0.0667    0.3003          (--------*---------)
T6   -0.7781  -0.4111   -0.0442  (--------*--------)
                                 ---------+---------+---------+---------+
                                      -0.40      0.00      0.40      0.80

Se restó T4 a:

    Inferior   Centro  Superior---------+---------+---------+---------
+
T5   -0.2781   0.0889    0.4558              (--------*--------)
T6   -0.6225  -0.2556    0.1114     (---------*--------)
                                 ---------+---------+---------+---------+
                                      -0.40      0.00      0.40      0.80
```

```
Se restó T5 a:

    Inferior   Centro  Superior--------+---------+---------+---------+
T6   -0.7114  -0.3444    0.0225   (--------*---------)
                                 ---------+---------+---------+---------+
                                      -0.40      0.00      0.40      0.80
```

Mediante la prueba Tukey se establece la diferencia significativa de los grupos de datos analizados pudiendo establecer que el T1 es igual a T6, además, T2, T3, T4, T5 son iguales entre sí.
Los valores medios del tratamiento químico y referencial son diferentes, presentan menor grosor de tallo en comparación a T2, T3, T4, T5.

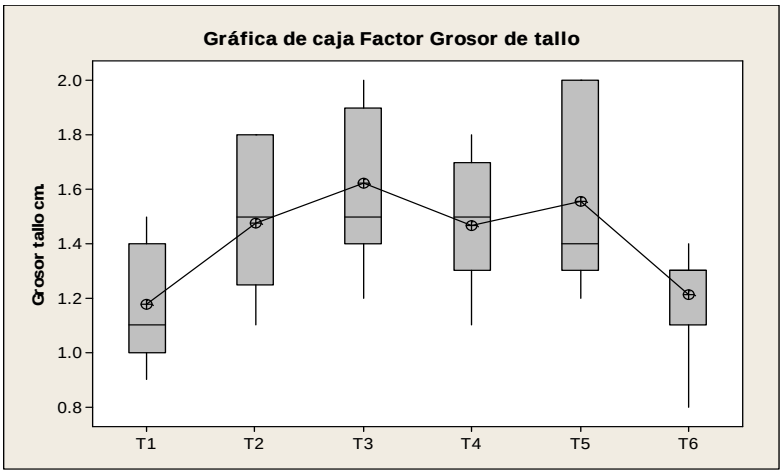


Ilustración 10 *Gráfica de caja análisis de varianza factor grosor de tallo*
Fuente: Maestrante, 2014

El boxplot, ilustra lo antes expuesto referente a la diferencia estadística de T2, T3, T4 y T5 frente al testigo referencial (control) y tratamiento químico T1.

CONCLUSIÓN:

Se acepta la H1.
H1: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren al grosor del tallo de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

4.4.3.1.3. Número de hojas por tallo

Se platea las siguientes hipótesis:

H0: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren al grosor del tallo de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son iguales.

H1: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren al número de hojas por tallo de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

ANOVA Nro. Hojas

```
Fuente  GL      SC     MC     F      P
Factor   5   743.9  148.8  4.59  0.002
Error   48  1556.2   32.4
Total   53  2300.1

S = 5.694   R-cuad. = 32.34%   R-cuad.(ajustado) = 25.29%


                            ICs de 95% individuales para la media
                            basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N   Media  Desv.Est.   +---------+---------+---------+---------
T1     9  17.222      4.177            (------*-------)
T2     9  22.222      5.718                      (------*-------)
T3     9  25.667      6.285                           (------*-------)
T4     9  19.333      6.344                (-------*------)
T5     9  20.556      6.502                  (-------*-------)
T6     9  13.889      4.729     (-------*------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            10.0      15.0      20.0      25.0

Desv.Est. agrupada = 5.694
```

En el análisis estadístico, se establece la diferencia significativa entre los tratamientos frente al testigo referencial T6 (control) entre los tratamientos, incluida el tratamiento químico T1, la diferencia no es significativa.

```
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.54%
```

Se restó T1 a:

```
    Inferior  Centro  Superior+---------+---------+---------+---------
T2    -2.972   5.000    12.972                     (-------*-------)
T3     0.473   8.444    16.416                       (-------*-------)
T4    -5.860   2.111    10.083                    (-------*-------)
T5    -4.638   3.333    11.305                    (-------*-------)
T6   -11.305  -3.333     4.638             (-------*-------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            -20       -10         0        10
```

Se restó T2 a:

```
    Inferior  Centro  Superior+---------+---------+---------+---------
T3    -4.527   3.444    11.416                   (-------*-------)
T4   -10.860  -2.889     5.083               (-------*-------)
T5    -9.638  -1.667     6.305               (-------*-------)
T6   -16.305  -8.333    -0.362        (-------*-------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            -20       -10         0        10
```

Se restó T3 a:

```
    Inferior   Centro  Superior+---------+---------+---------+--------
T4   -14.305   -6.333     1.638           (-------*-------)
T5   -13.083   -5.111     2.860           (-------*-------)
T6   -19.749  -11.778    -3.806    (-------*-------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            -20       -10         0        10
```

Se restó T4 a:

```
    Inferior  Centro  Superior+---------+---------+---------+---------
T5    -6.749   1.222     9.194                 (-------*-------)
T6   -13.416  -5.444     2.527           (-------*-------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            -20       -10         0        10
```

Se restó T5 a:

```
    Inferior  Centro  Superior+---------+---------+---------+---------
T6   -14.638  -6.667     1.305         (-------*-------)
                              +---------+---------+---------+---------
                            -20       -10         0        10
```

Mediante la prueba Tukey se establece la diferencia significativa de los grupos de datos analizados pudiendo establecer que el T1 es igual a T6, además, T2, T3, T4, T5 son iguales entre sí.

Los valores medios del tratamiento químico y referencial son diferentes a T2, T3, T4, T5, los cuales presentan un mayor número de hojas.

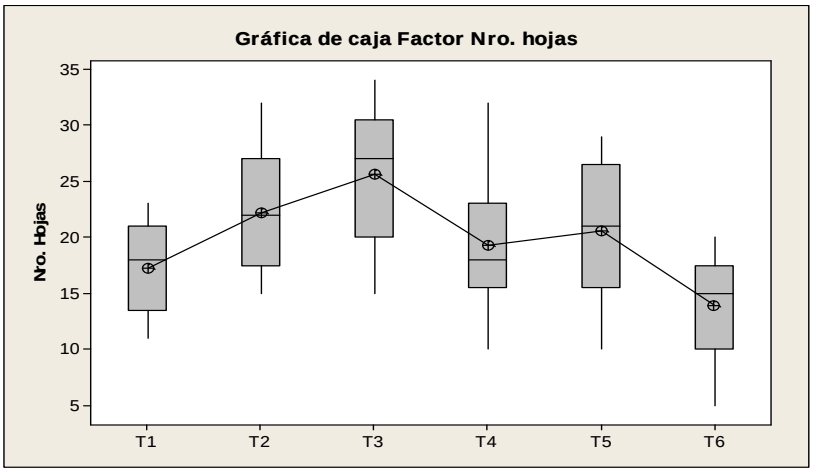


Ilustración 11 *Gráfica de cajas números de hojas*
Fuente: Maestrante, 2014

En el boxplot se evidencia loa antes expuesto en este análisis. La diferencia del testigo y del tratamiento químico frente a los tratamientos con consorcios de *Trichoderma* sp.

CONCLUSIÓN:

Se acepta la H1
H1: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren al número de hojas por tallo de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

4.4.3.1.4. Biomasa de los tubérculos

H0: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren a la biomasa de los tubérculos de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son iguales.

H1: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren a la biomasa de los tubérculos de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

ANOVA Biomasa de los Tubérculos

```
Fuente  GL      SC      MC     F      P
Factor   5  0.8703  0.1741  5.39  0.008
Error   12  0.3876  0.0323
Total   17  1.2579

S = 0.1797   R-cuad. = 69.19%   R-cuad.(ajustado) = 56.35%


                            ICs de 95% individuales para la media
                            basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N   Media  Desv.Est. -------+---------+---------+---------+--
t1     3  2.4100     0.2088 (------*-------)
t2     3  2.8267     0.1159              (------*-------)
t3     3  3.0567     0.1159                     (-------*------)
t4     3  2.7500     0.1039            (-------*------)
t5     3  2.7967     0.1604              (------*-------)
t6     3  2.4700     0.2946   (------*-------)
                            -------+---------+---------+---------+--
                                 2.40      2.70      3.00      3.30

Desv.Est. agrupada = 0.1797
```

De este análisis podemos inferir que existe diferencia significativa entre los las medias de los grupos de datos de los tratamientos frente al testigo referencial (control) T6 y tratamiento químico T1, en el análisis se considera el peso en kilogramos de los tubérculos.

```
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 99.43%


Se restó t1 a:

    Inferior  Centro  Superior--------+---------+---------+---------+-
t2   -0.0762  0.4167    0.9095                  (-------*-------)
t3    0.1538  0.6467    1.1395                      (-------*-------)
t4   -0.1529  0.3400    0.8329                 (--------*-------)
t5   -0.1062  0.3867    0.8795                 (-------*--------)
t6   -0.4329  0.0600    0.5529             (-------*-------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                   -0.60      0.00      0.60      1.20
```

```
Se restó t2 a:

    Inferior   Centro  Superior-------+---------+---------+---------+-
t3   -0.2629   0.2300    0.7229                (-------*-------)
t4   -0.5695  -0.0767    0.4162           (-------*-------)
t5   -0.5229  -0.0300    0.4629           (--------*-------)
t6   -0.8495  -0.3567    0.1362     (-------*-------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                   -0.60      0.00      0.60      1.20

Se restó t3 a:

    Inferior   Centro  Superior-------+---------+---------+---------+-
t4   -0.7995  -0.3067    0.1862       (-------*-------)
t5   -0.7529  -0.2600    0.2329       (--------*-------)
t6   -1.0795  -0.5867   -0.0938  (-------*-------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                   -0.60      0.00      0.60      1.20


Se restó t4 a:

    Inferior   Centro  Superior-------+---------+---------+---------+-
t5   -0.4462   0.0467    0.5395             (-------*-------)
t6   -0.7729  -0.2800    0.2129       (-------*--------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                   -0.60      0.00      0.60      1.20

Se restó t5 a:

    Inferior   Centro  Superior-------+---------+---------+---------+-
t6   -0.8195  -0.3267    0.1662      (--------*-------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                   -0.60      0.00      0.60      1.20
```

Mediante la prueba Tukey se establece la diferencia significativa de los grupos de datos analizados pudiendo establecer que el T1 es igual a T6, además, T2, T3, T4, T5 son iguales entre sí.

El peso (Kg) de los tubérculos del tratamiento químico y referencial son diferentes, presentan menor biomasa en comparación a T2, T3, T4, T5.

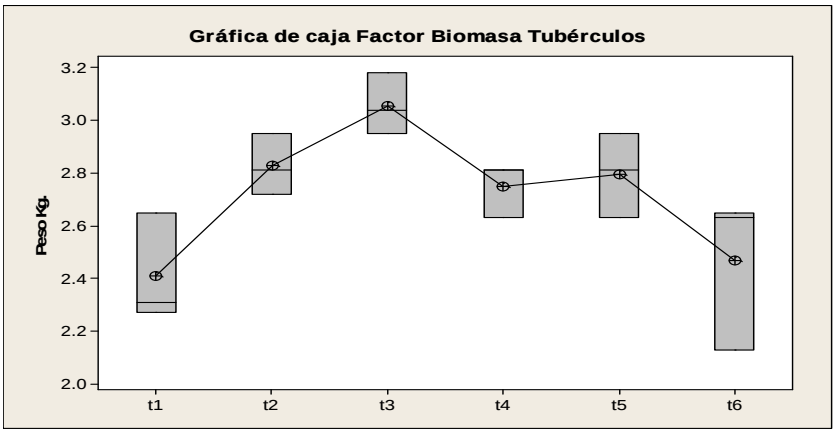


Ilustración 12 *Gráfica de cajas Factor Biomasa de Tubérculos*
Fuente: Maestrante, 2014

En el boxplot se evidencia lo antes expuesto, y poniéndose de manifiesto la diferencia del T2, T3, T4, T5 con respecto al testigo referencial T6 (control) y el tratamiento químico T1.

CONCLUSIÓN:

Se acepta la H1
H1: Los valores medios de los grupos de datos que se refieren a la biomasa de los tubérculos de las plantas que recibieron los tratamientos, frente al tratamiento químico y control son diferentes.

Lo que evidencia y pone de manifiesto la efectividad de los consorcios microbianos formados por hongos del género *Trichoderma* en el control de la enfermedad.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Se aisló *Trichoderma* spp. únicamente de las muestras de suelo que presentaron menor actividad antrópica y donde los cultivos fueron trabajados de manera orgánica.
   Vallejo, *et al.*, 2010 reportan en su artículo que la abundancia y la diversidad de la comunidad microbiana en suelos agrícolas se ven afectadas por la fertilización inorgánica, observándose descensos significativos de diversidad e índice de biomasa tras cinco años de fertilización mineral. Por el contrario, la aplicación durante 5 años consecutivos de purín de vacuno en ausencia de laboreo produjo un incremento significativo de la abundancia microbiana, sin afectar a la diversidad bacteriana.
   Las cepas aisladas se clasificaron taxonómicamente mediante claves taxonómicas, terrenos selectivos, etc. pero estos resultados no se corroboraron mediante análisis biomolecular.

2. Los hongos seleccionados (*Trichoderma* sp) F8-*Trichoderma atroviride,* CEF1-*Trichoderma harzianum* y las cepas nativas M1 y M2 *Trichoderma* spp. resultan en pruebas preliminares in vitro inhibidores de P. *infestans* agente causal principal del tizón tardío en papa *Solanum tuberosum*
   CEF1 y M2 presentaron efecto inhibitorio a las 48 horas de iniciado el análisis de actividad biológica, F8 y M1 inhibió el crecimiento del patógeno a las 72 horas.
   F11- *Trichoderma citrinoviride* presentó un bajo porcentaje de inhibición, por lo que no se consideró en la formación de consorcios, y como un controlador de *Phytophthora infestans*
   Los consorcios microbianos se conformaron de acuerdo a la capacidad inhibitoria del crecimiento de *Phytophthora infestans*, y se conformaron con los hongos: T2 *Trichoderma* sp; F8- *Trichoderma atroviride;* M2- *Trichoderma* sp; y CEF1- *Trichoderma harzianum*

3. En lo referente a altura de planta, existe una cierta diferencia entre los grupos de datos, aunque esta diferencia no es significativa estadísticamente.

4. En el análisis estadístico del factor grosor de tallo los tratamientos T2, T3, T4 y T5 difieren significativamente con el testigo T6 y el tratamiento convencional, T1.

5. El consorcio T5, *Trichoderma* sp.+ *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma* sp., y T3 *Trichoderma harzianum*+ *Trichoderma* sp. + *Trichoderma atroviride*, resultan ser los mejores tratamientos frente al testigo referencial y al tratamiento químico, en lo referente a grosor del tallo.

6. El tratamiento T3: *Trichoderma harzianum*+ *Trichoderma* sp. + *Trichoderma atroviride*, presenta diferencias estadísticamente significativas en el factor número de hojas.

7. En el peso de tubérculos se evidencia como el mejor tratamiento igualmente el T3 siendo la diferencia altamente significativa frente al testigo referencial y tratamiento químico.
   En base a los resultados obtenidos en el análisis estadístico y lo expuesto anteriormente el tratamiento T3: *Trichoderma harzianum*+ *Trichoderma* sp. + *Trichoderma atroviride*, resulta ser el efectivo en el control de la enfermedad.

8. En las evaluaciones *in vitro* los tratamientos de *Trichoderma* demostraron eficiencia en el control de *Phytophthora infestans* entre un 83% y 87%, los resultados obtenidos son semejantes a otros estudios que reporta Chacón en el 2014 en donde reporta resultados y porcentajes de inhibición del 53% y 63% frente *Phytophthora infestans*, confirmando así el efecto antagónico de *Trichoderma sp.* Guigón y González, 2004 en su artículo reportan igualmente que las cepas de hongos del género *Trichoderma sp* lograron sobrecrecer hasta en un 100% sobre el patógeno para este caso *Phytophthora capsici*.

9. El empleo de las cepas de *Trichoderma* spp. como consorcios microbianos se podrían considerar de acuerdo a los resultados obtenidos como promotores de crecimiento, de acuerdo a lo que reporta la literatura.
   En este estudio de acuerdo a los resultados se pone en evidencia la eficacia de los consorcios microbianos, concretamente en los factores grosor de tallo, número de hojas y biomasa de los tubérculos y de alguna manera se relacionan con lo que reporta la literatura especializada.

10. El tratamiento químico: Mancozeb+Metalaxil-M; evidencia una cierta diferencia, aunque esta no sea significativa estadísticamente.

RECOMENDACIONES

- En base a los resultados, se recomienda el uso de estos consorcios microbianos en el control de la enfermedad y su uso dentro la agroecología.
- Al demostrarse en este estudio y otras investigaciones el potencial de *Trichoderma* como promotor del desarrollo vegetal se sugiere evaluar la inoculación de *Trichoderma* spp. nativo en los abonos orgánicos y aplicados al suelo.
- Evaluar a *Trichoderma* spp. como tratamiento preventivo para biocontrol del tizón tardío enfermedad causada principalmente por el hongo *Phytophthora infestans*.
- Hacer estudios de los metabolitos secundarios que producen los hongos de uso en esta investigación como agentes de biocontrol (*Trichoderma*) para entender mejor la interacción de estos microorganismos frente a agentes patógenos. En base a lo precedente se recomienda igualmente continuar con la línea de investigación.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Secretaria Nacional de Planificación, SENPLADES. 2009. Plan Nacional del Buen Vivir. Ecuador, 2009.

- AGRIOS G.N. 1998. Fitopatología, 3era Edición, México, 838 pp.

- PUMISACHO M., SHERWOOD S. (eds.) El Cultivo de la Papa en el Ecuador. Primera Edición. Ecuador, 2002.

- CÁCERES, P.A., PUMISACHO, M., FORBES, G.A., ANDRADE-PIEDRA, J.L. 2007. Guía para facilitar el aprendizaje sobre control de tizón tardío de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología del Ecuador (SENACYT). Quito, Ecuador. 142 páginas.

LINKOGRAFIA

- ALTIERI, M.. 2013. Agroecología: principios y estrategias para diseñar una agricultura que conserva recursos naturales y asegura la soberanía alimentaria. Universidad de Californi, Berkeley. Estados Unidos. 22-02-2013. www.mda.gov.br/portal/saf/.../Agroecologia_-_principios_y_estrategias.pdf

- CANO, A. 2013. Manual de Prácticas de la Materia de Edafología. México, 2013 http://www.utselva.edu.mx/pai/8/7/25.1.pdf

- CENTRO DE EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA. Manual Producción y Utilización de *Trichoderma spp.* . Chile, 2004 http://*educacion.ucv.cl/prontus.../site/.../ASOCFILE120070710123449.PDF*

- CHACÓN, H. 2014. *Trichoderma spp.* (ACOMYCOTA: HYPOCREALES) como antagonista de *Phytophthora infestans* y Promotor de Desarrollo en *Solanum tuberosum*. Universidad Nacional de Táchira. San Cristóbal, Venezuela. Mayo, 2014.

http://biblioteca.unet.edu.ve/db/alexandr/db/bcunet/edocs/TEUNET/2014/Postgrado/PVE/Chacon_Hernando/APV1404M.pdf

- CRUZAT R. y IONANNIDIS D. – AQUAVITA Consultores. 2008. Resultados y Lecciones en Biocontrol de Enfermedades Fungosas con *Trichoderma spp.*, Proyecto de Innovación en las Regiones de O´Higgins y del Maule, Ministerio de Agricultura de Chile. Chile, 2008. 09-01-2013 http://bibliotecadigital.fia.cl/.../62_Libro_Trichoderma.pdf

- CRISSMAN, C., ESPINOSA, P., BARRERA, V. 2003. El Uso de Plaguicidas en la producción de papa en Carchi. CIP – INIAP. Quito-Ecuador. http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/341/1/13T0634%20COLCHA%20ENMA.pdf

- DONAIRE, R; GARCIA W.. 2006. Alternativa Agroecológica Para El Control Del Tizón Tardío, *Phytophthora infestans*, De La Papa En Colomi – Bolivia. PROINPA- Universidad Católica Boliviana. ACTA NOVA; Vol. 3, Nº 3, diciembre 2006. http://www.ucbcba.edu.bo/Publicaciones/revistas/actanova/documentos/v3n3/v3.n3.doinare.pdf.

- EL MERCURIO. El Cultivo de papa en decrecimiento. Artículo, 29 de junio de 2012. http://www.elmercurio.com.ec/338893-cultivo-de-papa-en-decrecimiento/#.Us2QtPti2B4

- FERNÁNDEZ-NORTHCOTE E., NAVIAS O., GANDARILLAS A. 1999. Bases de las Estrategias de Control Químico del Tizón Tardío de la Papa Desarrolladas por PROINPA en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa. Junio 1999. Cochapamba, Bolivia. http://www.papaslatinas.org/v11n1p1.pdf

- GUIGÓN C.,GONZÁLEZ P. 2004. Selección de Cepas Nativas de *Trichoderma spp*. con Actividad Antagónica sobre *Phytophthora capsici*. Leonian y Promotoras de Crecimiento en el Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 22, núm. 1, enero-junio, 2004, pp. 117-124, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222115

- GÓMEZ, W. 2011. Manejo Agroecológico de plagas y enfermedades en los cultivos. CESTA, Amigos de la Tierra. El Salvador. 2011 http://www.cesta-foe.org.sv/areas-de-trabajo/Pubs/Cuadernillo%20CESTAok.pdf

- HIDALGO V., OLIVA R.F., GESSLER C. Y FORBES G. 2006. Agresividad Y Adaptabilidad En La Progenie De *Phytophthora infestans.* Centro Internacional de la Papa (CIP, Quito-Ecuador), Swiss Federal Institute of Technology (ETH, Zurich-Suiza), Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima-Peru). II Congreso Ecuatoriano de la Papa. Ecuador, 2006 http://cipotato.org/region-quito/congresos/ii-congreso-ecuatoriano-de-la-papa

- INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGIA. 2014. Muestreo y caracterización de un sitio. México, 2014 http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/459/cap3.html

- INFANTE, D., MARTINEZ, B., GONZALEZ, N., REYES, Y. 2009. Mecanismos De Acción De *Trichoderma* Frente A Hongos Fitopatógenos. Rev. Protección Vegetal. [online]. 2009, vol.24, n.1, pp. 14-21. ISSN 2224-4697. 2009. http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf

- LOPEZ, A., 2007. Pruebas De Eficiencia In Vitro Bajo Invernadero De Cepas De *Trichoderma spp*. Para Control De *Phytophthora infestans* En El Cultivo De Papa *Solanum tuberosum* Para Establecer Un Banco De Microorganismos. SANGOLQUÍ / ESPE-IASA I / 2007. http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2564

- McKEAN S. 1993. Manual de Análisis de Suelos y Tejido Vegetal. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Agosto, 1993. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/Digital/S593.M2_Manual_de_an%C3%A1lisis_de_suelos_y_tejido_vegetal_Una_gu%C3%ADa_te%C3%B3rica_y_pr%C3%A1ctica_de_metodologia.pdf

- MONDINO, P. 2012. Métodos de Aislamiento de Bacterias y Hongos. Unidad de Fitopatología. Facultad de Agronomía. Universidad de la República de Uruguay. Uruguay. 2012. http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/05-Metodos%20de%20aislamiento.pdf

- NINA R., SMELTEKOP H., ALMANZA J., LOZA M.. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas d*e Trichoderma spp* sobr*e Rhizoctonia sp y Fusarium sp* en caf*é (Coffeaarabica)* en condiciones experimentales. Journal of the Selva Andina ResearchSociety. Bolivia, 2011. 09-01-2013.

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S207292942011000100006&script=sci_arttext

- NAVIA O., GANDARILLAS A., ORTUÑO N., MENESES E. y FRANCO J. Tizón de la papa (P*hytophthora infestans*) y agricultura sostenible: integración de resistencia sistémica inducida y estrategias de manejo integrado. Bolivia. 18-03-2013. http://www.proinpa.org/.../articulos/Papa/Oscar%20Navia_tizon%20papa.pdf

- OYARZUN, P., TAIPE, J., FORBES, G. 2013. *Phytophthora infestans* su Actividad y Particularidades en el Ecuador. Perfil de País. 2013. Estado Actual del Manejo Integrado del Tizón (MIP-TIZON) en Países Andinos. CIP. https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/37192020/1.3_P.i._su_actividad_y_particularidades_en_el_Ecuador_perfil_de_paisOK.pdf?version=1&modificationDate=1273564325000

- PEREZ W. y FORBES G. Manual Técnico. El Tizón Tardío de la Papa. Perú, 2008. 27-05-2013. http:// www.cipotato.org/publications/pdf/004271.pdf

- RAMÍREZ J., DELGADO E., RODOLFI M., SOLVEIG T. 2006. Actividad Antagónica de Hongos Endófitos de Plantas Medicinales del Ecuador sobre Bacterias Patógenas. Boletín Micológico. Vol. 21, 29-53. Ecuador. 2006. http://www-3.unipv.it/det/micologia/endofitos_ecuador.pdf

- REINOSO, I. El Cultivo De Papa Y Su Participación En La Economía Ecuatoriana. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuaria, INIAP. Ecuador. 18-03- 2013. http://www.iniap.gob.ec

- ROBLES, A. 2012. Uso De Microorganismos Antagonistas Y Sustancia Naturales Como Una Alternativa Ecológica En El Control De Enfermedades En Cultivos. Revista CENTRO DE BIOTECNOLOGIA VOL. 1, No. 1. http://hdl.handle.net/123456789/326

- SUQUILANDA, M. 2011. La Producción Orgánica de la papa. Revista Tierra Adentro. 26-07-2011. Ecuador http://revistatierraadentro.com/index.php/agricultura/148-la-produccion-organica-de-la-papa?format=pdf.

- SUQUILANDA, M. 2013. Manual Técnico de Producción Orgánica de Cultivos Andinos. Ecuador. 17-03-2013 http://www.mountainpartnership.org

- TORRES, H. 2002. Manual De Las Enfermedades Más Importantes De La Papa En El Perú. CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Perú. Julio 2002. http://www.cipotato.org/csd/materials/ContentsHTorres.asp

- TORRES, L., TAIPE, A., ANDRADE – PIEDRA, J. 2011. Manejo de la Lancha. Centro Internacional de la Papa. Quito. Abril 2011. http://192.156.137.121:8080/cipotato/region-quito/informacion/inventario-de-tecnologias/manejo-de-tizon-tardio-o-lancha

- VALENCIA, C. 2004. Manual de Prácticas del Laboratorio de Edafología. México, 2004 http://www.agricolaunam.org.mx/edafologia/PAPIME%20MANUAL%20LABORATORIO/MANUAL%20EDAFOLOGIA%20%2008%20septiembre.pdf

- VALLEJO V., MIJANGOS I., GARBISU C. 2010. Biodiversidad edáfica como bioindicador de la salud del suelo mediante métodos moleculares. San Sebastián, 2010, 15 p. (Tesis para obtener el título de Máster en Biodiversidad, Funcionamiento y Gestión de Ecosistemas). Universidad del País Vasco

  http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec//handle/28000/98