

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A. I
“GRAL. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”

PRUEBAS DE EFICACIA *in vitro* Y 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

previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA

Sangolquí, Junio de 2007

I.A.S.A.

**PRUEBAS DE EFICIENCIA *in vitro* Y 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**

2007

CERTIFICACIÓN

Certificado que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Srt. ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA. Como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO AGROPECUARIO.

Junio, 2007

Ing. Cesar Falconí M.Sc MBA
DIRECTOR

Lic. Viviana Yáñez M.Sc
CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís M.Sc
BIOMETRISTA

PRUEBAS DE EFICIENCIA *in vitro* Y 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

ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA

REVISADO Y APROVADO:

Ing. Normar Soria

Coordinador de la Carrera de Ciencias Agropecuarias – IASA I

Ing. Cesar Falconí M.Sc MBA

DIRECTOR

Lic. Viviana Yáñez M.Sc

CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís M.Sc

BIOMETRISTA

Abg. Carlos Orozco

Delegado de la Unidad de Admisiones y Registros – IASA I

PRUEBAS DE EFICIENCIA *in vitro* Y 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

ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA

Aprobado por los señores miembros del tribunal de calificación del informe técnico.

	CALIFICACIÓN	FECHA
DIRECTOR		
Ing. Cesar Falconí M.Sc MBA.
CODIRECTOR		
Lic. Viviana Yáñez M.Sc

Certifico que estas calificaciones fueron presentadas en esta secretaría.

Abg. Carlos Orozco

Delegado de la Unidad de Admisiones y Registros – IASA I

El Prado, 12 de Junio de 2007

CERTIFICADO

Los infraescritos Director y Codirector de la tesis de la alumna Alba Adriana López Pereira, titulada “Pruebas de eficiencia *in vitro* y 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” certificamos que fueron presentados los discos compactos que contienen el documento completo de la defensa del proyecto de investigación.

Ing. Cesar Falconí M.Sc MBA

DIRECTOR

Lic. Viviana Yáñez M.Sc

CODIRECTOR

El Prado, 12 de Junio de 2007

AUTORIZACIÓN

Por medio de la presente autorizo publicar mi proyecto de tesis titulado “Pruebas de eficiencia *in vitro* y 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” en la página web de la ESPE.

ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme y ser mi luz en este camino de la vida, por permitirme vivir y disfrutar cada día en compañía de las personas que más amo.

A mi angelito, Camila, por darme el mayor ejemplo de lucha y sacrificio, por darme valor, por cuidarme desde el cielo y acompañarme en cada paso de mi vida.

A mis padres, Pedro y Alba, por brindarme su amor, ternura y apoyo, por haberme alentado para culminar esta etapa de mi vida.

A mis hermanas, Anita y Andreita, por sus risas, su cariño y su apoyo incondicional

A mi Pinito, con mucho amor y gratitud, por su inmenso amor y dulzura, porque ha sido mi fuerza y mi motivo para vivir.

A Daniel, el hombre de mi vida, porque éste también es un triunfo suyo, uno de tantos que nos esperan en un futuro juntos.

A mis amigos por compartir conmigo cada paso de este largo camino, por su apoyo, comprensión y por tantos recuerdos.

AGRADECIMIENTO

A mi familia por apoyarme en la culminación de esta etapa de mi vida.

A Daniel por su cariño, por sus consejos y enseñanzas, por confiar en mi y acompañarme en cada caída, por permitirme estar aquí.

Al Ingeniero Cesar Falconí, por su apoyo incondicional y enseñanzas durante el desarrollo de esta investigación.

A Vivi por su apoyo y orientación constante e incondicional en las metas trazadas durante el desarrollo de esta investigación, por su amistad y cariño desinteresados. Millón Gracias.

A los Ingenieros Jaime Villacís, Pablo Landazuri y Abraham Oleas por brindarme sus conocimientos que han sido de mucha importancia y ayuda en el desarrollo de esta investigación.

Adriana

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

CRNL. ESP. RONALD RUNRUIL

AB. CARLOS OROZCO
SECRETARIO ACADÉMICO

Sangolquí, Junio de 2007

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A.

**PRUEBAS DE EFICACIA *in vitro* Y 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**

ALBA ADRIANA LÓPEZ PEREIRA

2007

**PRUEBAS DE EFICIENCIA *in vitro* Y 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**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.INTRODUCCIÓN	1
II.OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GENERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
III.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. LA PAPA	5
3.1.1. Generalidades	5
3.1.1.1. Origen y distribución geográfica	5
3.1.1.2. Importancia Económica en Ecuador	6
3.1.2. Biología y Taxonomía	7
3.1.2.1. Descripción Botánica	7
3.1.2.2. Clasificación Taxonómica	8
3.1.2.3. Fenología de la Papa	9
3.1.2.4. Manejo del Cultivo de Papa	10
3.1.2.5. Principales Variedades en Ecuador	13
3.2. TIZÓN TARDÍO	14
3.2.1. Generalidades	14
3.2.1.1. Impacto y distribución geográfica	14
3.2.1.2. Taxonomía	15
3.2.1.3. Morfología	16
3.2.1.4. Epidemiología y epifitología de <i>P. infestans</i>	17
3.2.2. Control	21

3.2.2.1.	Convencional – Problemática de productos químicos	21
3.2.2.2.	Mejoramiento	22
3.2.2.3.	Manejo Integrado.....	23
3.3.	CONTROL BIOLÓGICO MICROBIANO	26
3.3.1.	Fundamentos de Control Biológico Microbiano	26
3.3.2.	Evidencias de control biológico microbiano en el cultivo de papa	27
3.3.3.	Mecanismos de acción e interacciones antagonista- patógeno.	28
3.3.4.	<i>Trichoderma</i> spp.....	30
3.3.4.1.	Morfología y taxonomía	30
3.3.4.2.	Ventajas Antagónicas.....	31
3.3.4.3.	Mecanismo de Biocontrol.....	32
3.3.4.4.	Tecnología de biocontrol.....	32
3.4.	TECNOLOGÍA DE MANEJO Y CONSERVACIÓN DE AMCB	34
3.4.1.	Importancia de la conservación.....	34
3.4.2.	Generalidades.....	35
3.4.3.	Colecciones de cultivos microbianos	36
3.4.4.	Conservación de AMCB	37
3.4.4.1.	Subcultivos	37
3.4.4.2.	Desecación	38
3.4.4.3.	Congelación	38
3.4.4.4.	Liofilización.....	40
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
4.1.	FASE DE LABORATORIO.....	42
4.1.1.	Localización Geográfica	42
4.1.2.	Materiales.....	42

4.1.3.	Métodos	43
4.1.3.1.	Aislamiento y purificación de <i>P. infestans</i> del follaje de papa.....	43
4.1.3.2.	Aislamiento y purificación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	43
4.1.3.3.	Mantenimiento de cepas de <i>Trichoderma</i>	44
4.1.3.4.	Identificación de microorganismos aislados.....	44
4.1.3.5.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	45
4.2.	FASE DE CAMPO	50
4.2.1.	Localización Geográfica	50
4.2.2.	Materiales.....	50
4.2.3.	Métodos.....	50
4.2.3.1.	Desinfección y Germinación de la semilla de papa	51
4.2.3.2.	Siembra de las semillas de papa	51
4.2.3.3.	Pruebas de antagonismo <i>in vivo</i>	51
4.3.	CONSERVACIÓN DE CEPAS	56
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
5.1.	FASE DE LABORATORIO.....	58
5.1.1.	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	58
5.1.2.	Caracterización de los aislamientos	59
5.1.3.	Pruebas de Antagonismo	60
5.1.3.1.	Relación entre la capacidad antagónica y la capacidad patogénica	65
5.2.	FASE DE CAMPO	67
5.2.1.	Ensayo 1	67
5.2.2.	Ensayo 2	69
VI.	CONCLUSIONES	73

VII.RECOMENDACIONES	75
VIII.RESUMEN	76
IX.SUMMARY.....	77
X.BIBLIOGRAFÍA.....	78
XI.ANEXOS	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1.2.5.1. Principales características de las variedades mejoradas de papa Superchola y Fripapa.	14
Cuadro 3.3.4.4.1. Productos comerciales en base a <i>Trichodermas</i> spp.	33
Cuadro 5.1.1.1. Procedencia de las posibles cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas y purificados. IASA, Ecuador, 2007.	58
Cuadro 5.1.3.1. Análisis de varianza para capacidad de crecimiento del patógeno, Capacidad antagónica, borde <i>Trichoderma</i> y borde <i>Phytophthora infestans</i>. IASA, Ecuador, 2007.	60
Cuadro 5.1.3.2. Promedio (+ error estandar) de capacidad de crecimiento del patógeno, capacidad antagónica, borde <i>Trichoderma</i> y borde <i>Phytophthora infestans</i>. IASA, Ecuador, 2007.	61
Cuadro 5.1.3.3. Promedio (+ error estandar) de capacidad de crecimiento del patógeno, capacidad antagónica, borde <i>Trichoderma</i> y borde <i>Phytophthora infestans</i> en relación al tiempo. IASA, Ecuador, 2007.	62
Cuadro 5.2.1.1. Análisis de varianza para incidencia y severidad de <i>P. infestans</i> frente a 3 cepas de <i>Trichoderma</i> y un tratamiento químico en dos variedades. Ambato, Ecuador, 2007.	67
Cuadro 5.2.1.2. Promedio (+ error estandar) de incidencia y severidad de <i>P. infestans</i> frente a 3 cepas de <i>Trichoderma</i> y un tratamiento químico en dos variedades. Ambato, Ecuador, 2007.	68
Cuadro 5.2.1.3. Promedio (+ error estandar) de incidencia en relación al tiempo de <i>P. infestans</i> frente a 3 cepas de <i>Trichoderma</i> y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007.	68
Cuadro 5.2.2.1. Análisis de varianza para incidencia y severidad de <i>P. infestans</i> frente a 3 cepas de <i>Trichoderma</i> y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007.	69
Cuadro 5.2.2.2. Promedio (+ error estandar) de incidencia y severidad <i>P. infestans</i> frente a 3 cepas de <i>Trichoderma</i> y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007.	70
Cuadro 5.2.2.3. Promedio (+ error estandar) de incidencia en relación al tiempo de <i>P. infestans</i> frente a 3 cepas de <i>Trichoderma</i> y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.2.1.1. Anatomía de la planta de papa.	8
Figura 3.2.1.4.1. Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i>.	19
Figura 4.1.3.5.1. Inoculación de <i>P. infestans</i> en cajas para pruebas de antagonismo.	47
Figura 4.1.3.5.2. Inoculación de <i>Trichoderma</i> en cajas para pruebas de antagonismo.	47
Figura 4.1.3.5.3. Método de evaluación de antagonismo entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>P. infestans</i>.	48
Figura 4.2.3.3.1. Plano de Campo para la evaluación de la capacidad antagónica de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. para control de <i>Phytophthora infestans</i> bajo invernadero. Ambato, Ecuador, 2007.	52
Figura 5.1.2.1. Caracterización de <i>Trichoderma</i>. IASA, Ecuador, 2007.	59
Figura 5.1.3.1. Pruebas de antagonismo in vitro. IASA, Ecuador, 2007.	63
Figura 5.1.3.2. Regresión polinómica de tercer grado de la capacidad de crecimiento del patógeno en comparación con la capacidad antagónica. IASA, Ecuador, 2007.	65

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de Cultivo utilizados.	86
Anexo 2. Toma de muestras de suelo para el aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	87
Anexo 3. Escala de severidad propuesta por Cruickshank.	88
Anexo 4. Cepas de <i>Trichoderma</i> liofilizadas.	89
Anexo 5. Identificación de cepas aisladas pertenecientes al genero <i>Trichoderma</i>.	90

ABREVIATURAS

AMCB	Agente Microbiano de Control Biológico
cm	centímetro.
°C	Centígrados.
g	gramo
GPS	Geographical Positional System.
INIAP	Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
ha	hectárea.
Kg	kilogramo.
Km	kilómetro.
l	litro.
m	metro.
ml	mililitro
mm	milímetro.
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería.
msnm.	metros sobre el nivel del mar.
No.	número.
PDA	Agar Papa Dextrosa
ppm	partes por millón.
tm	tonelada métrica.
ufc	unidades formadoras de colonias.
μl	microlitro.
μm	micra

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo muy afectado por plagas y enfermedades. Entre las enfermedades de mayor impacto, el tizón tardío o lancha causado por el hongo *Phytophthora infestans*, se considera como el principal limitante en la producción de este cultivo ya que reduce los rendimientos significativamente (Solórzano, 2002).

El tizón tardío esta presente en casi todas las regiones paperas, especialmente en zonas de clima húmedo y frío. Las condiciones ideales para su reproducción y patogenicidad son 80% de humedad relativa y una temperatura entre 15 y 22 °C, pudiendo destruir totalmente la plantación en poco tiempo (Escalante, 2004).

Según Román (2002), el principal método de control de *P. infestans* es mediante el empleo de fungicidas sistémicos como Dimetomorf, Metalaxil + Mancozeb, en dosis de 1.5 a 2 kg ha⁻¹. Por tal razón la agresividad de este hongo afecta negativamente la rentabilidad del cultivo al depender en gran parte de la aplicación de fungicidas y del uso de variedades con resistencia de campo. En este sentido, los productores de papa deben buscar alternativas de producción que permitan producir competitiva y sosteniblemente.

El control biológico de enfermedades con agentes microbianos como hongos y bacterias es una de estas alternativas sostenibles ya que no solo disminuye el uso de agroquímicos (reduciendo los costos), sino que se puede manejar el cultivo con buena producción, reducir la incidencia de la enfermedad y a la vez asegurar la salud de aquellos que trabajan en las plantaciones.

De los agentes microbianos más estudiados por su impacto positivo en el control de enfermedades el género *Trichoderma* tienen efectos significativos en la reducción de enfermedades fúngicas y una importante acción cuando se realiza su aplicación de forma preventiva al suelo (Gomero, 2004). *Trichoderma* es un hongo que habita naturalmente en el suelo por lo tanto es un antagonista muy eficiente que parasita a hongos fitopatógenos del suelo y controla diversas enfermedades causadas por ellos (Rodríguez, 2002).

En los últimos años, con el avance en la tecnología de manejo y conservación de microorganismos benéficos como *Trichoderma*, se han diseñado estrategias de producción masiva, crioconservación y liofilización dirigidas a explotar el potencial de biocontrol a largo plazo y en forma de biopesticidas agrícolas.

Considerando estudios previos en el uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol, en esta investigación se realizaron pruebas de eficiencia *in vitro* y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. para determinar su control sobre *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum*, para establecer un banco de microorganismos benéficos. Esta información resulta muy importante y fundamental para fijar establecer nuevas estrategias de control y manejo de la enfermedad.

La primera fase de esta investigación se realizó en el Centro de Investigaciones de la Escuela Politécnica del Ejército – Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA I, se usaron cepas aisladas del suelo de importantes zonas paperas del país como: Carchi, Pichincha y Tungurahua. Estos aislamientos fueron purificados y caracterizados, para cuantificar

su antagonismo *in vitro* contra *Phytophthora infestans*. En una segunda fase se determinó el antagonismo de estos aislamientos en plantas de papa crecidas en macetas en un invernadero ubicado en la parroquia de Izamba, provincia de Tungurahua.

Finalmente se procedió a conservar las cepas eficientes en el control de *Phytophthora infestans*, mediante liofilización actividad que se realizó en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigaciones del Departamento de Ciencias de la vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército.

II. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GENERAL

Realizar pruebas de eficiencia *in vitro* y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum*.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas de *Trichoderma* spp. potencialmente eficientes para el control de *Phytophthora infestans*.

- Realizar pruebas *in vitro* y bajo invernadero de cepas eficientes de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora infestans*.

- Determinar métodos de conservación de cepas de *Trichoderma* para el establecimiento de un banco de microorganismos benéficos que controlen el tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.LA PAPA

3.1.1. Generalidades

3.1.1.1.Origen y distribución geográfica

La papa (*Solanum tuberosum*) se originó hace unos 8000 años en las montañas de los Andes. La mayor diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.) silvestre y cultivada se encuentra en las tierras altas de los Andes de América del Sur. Luego de la conquista fue llevada a Europa por los españoles en el siglo XVI. Este tubérculo se adaptó con rapidez a condiciones ambientales diferentes a su centro de origen y pronto se convirtió en alimento básico en una época de acelerado crecimiento demográfico (FAO, 2006).

El centro de domesticación del cultivo se encuentra en los alrededores del lago Titicaca, cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia (Pumisacho y Sherwood, 2002). Desde su domesticación generaciones de campesinos han manejado el recurso, con la creación de 5500 variedades.

A nivel mundial, los países con mayor extensión de este cultivo son China (3.5 millones de ha), la Federación Rusa (3.4 millones de ha), Ucrania (1.6 millones ha), Polonia (1.4 millones ha) y la India (1.1 millones de ha). En la actualidad se producen papas en una superficie estimada de 180000 km², desde la planicie de Yunnan en China y las tierras

bajas subtropicales de la India, hasta las montañas ecuatoriales de Java y las estepas de Ucrania (FAO, 2006). En América Latina, a pesar de ser su centro de origen, solo se cultivan alrededor de 1.1 millones de hectáreas de papa cada año, de las cuales el Ecuador cultiva aproximadamente 50000 ha (Pumisacho y Sherwood, 2002).

En el Ecuador el cultivo de la papa se distribuye en las zonas geográficas norte, centro y sur de los pisos interandinos y subandinos. En general el cultivo de papa en el país se desarrolla en terrenos irregulares, en laderas hasta con mas de 45 % de pendiente y en un rango de altitud de 2400 a 3800 msnm. En la Zona Norte están Carchi e Imbabura, esta zona tiene la mayor producción de papa por área a nivel nacional. Su rendimiento es 21.7 t ha⁻¹ en promedio. En la Zona Centro están Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo y Bolívar; Chimborazo es la provincia con mayor superficie dedicada al cultivo a nivel nacional En la Zona Sur están Cañar, Azuay y Loja; Cañar es la provincia mas papicultora, pero su producción está entre las más bajas del país (8 a 10 t ha⁻¹) (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Durante el año 2006 el volumen de producción fue de 404276 tm, las provincias de Carchi, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo, aportaron con el 83% a esta producción (SICA, 2006).

3.1.1.2.Importancia Económica en Ecuador

La papa es la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país, con un consumo anual per cápita que fluctúa entre las ciudades: 122 Kg en Quito, 80 Kg en Cuenca y 50 Kg en Guayaquil. El 90 % de papa a nivel nacional se consume en

estado fresco. Los usos industriales son variados: papas fritas, congeladas, prefritas y enlatadas (Pumisacho y Sherwood, 2002).

Entre el 2000 y 2006 la gran demanda de la industria de comida rápida, cadenas de restaurantes y hoteles, impulsaron las importaciones de papa precocida y prefrita en una tasa de crecimiento de 533 %; y entre el 2005 y 2006 estas crecieron en 2.62 %. Las importaciones totales en el 2006 alcanzaron un volumen de 5630.53 tm por un valor de USD 5120 millones, lo cual frente a la producción nacional representa el 1.39 %. Mientras, las exportaciones de papa sumaron 42 tm por un valor FOB de 37 mil USD, a EEUU, Cuba y España (SICA, 2006).

3.1.2. Biología y Taxonomía

3.1.2.1. Descripción Botánica

La papa pertenece a la familia *SOLANACEAE*. Las especies cultivadas son las tetraploides ($2n=48$) que pertenecen a las especies *Solanum tuberosum* y *Solanum andigenum*. La especie *Solanum tuberosum* es la papa generalmente de forma alargada, piel lisa, ojos superficiales y estolones cortos; y, la especie *Solanum andigenum* es de días largos, ciclo tardío, de forma redonda y ojos profundos (Román, 2002).

Solanum tuberosum es una planta anual, de tallo erecto, que puede medir hasta 1m de altura. Sus hojas son compuestas, con 7 folíolos de forma lanceolada. Las flores tienen forma de estrella y sus pétalos están fusionados, su color puede ser blanco, rosado o violeta. Su fruto es una baya verde, de forma semejante a un tomate pero mucho más

pequeño, contiene en su interior unas 400 semillas. La parte que se consume es el tubérculo, sobre su superficie existen ojos, hundimientos para resguardar las yemas vegetativas que originan los tallos (Wikimedia Foundation, 2007).

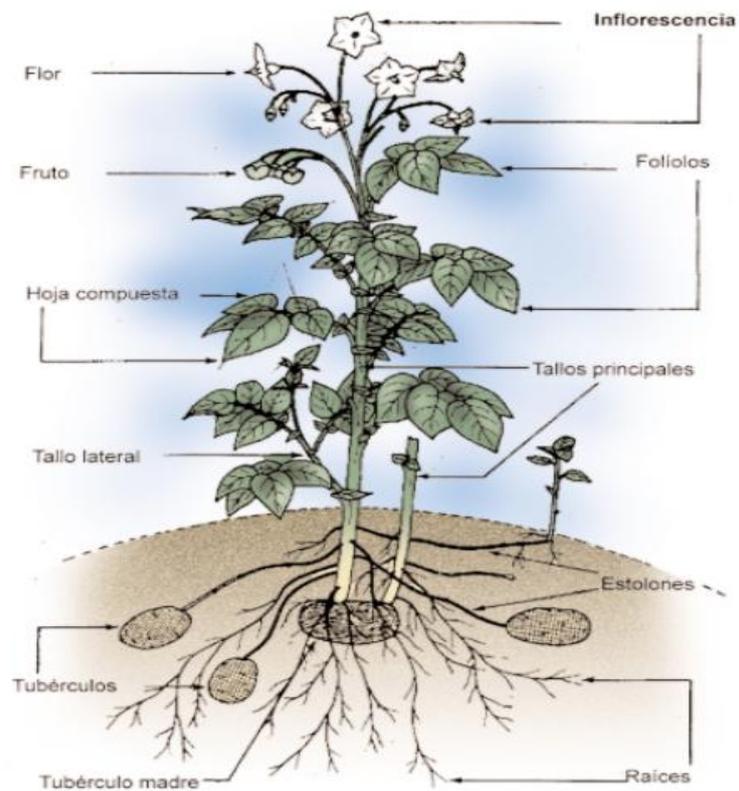


Figura 3.1.2.1.1. Anatomía de la planta de papa (Roman, 2002)

3.1.2.2. Clasificación Taxonómica

Según lo revisado por Pumisacho y Sherwood (2002) la papa posee las siguientes categorías taxonómicas:

Familia: *SOLANACEAE*

Género: *Solanum*

Subgénero: *Potatoe*

Serie: Tuberosa

Especie: *tuberosum*

3.1.2.3.Fenología de la Papa

Según Roman (2002), existen diferentes etapas fenológicas:

Dormancia o reposo: periodo que transcurre entre la cosecha y la brotación. Para el tubérculo semilla esta etapa dura 2-3 meses, y para la semilla sexual 4 a 6 meses. La dormancia puede ser rota o inducida por heridas por alguna enfermedad en el tubérculo o por tratamiento químico utilizando el ácido giberélico en dosis de 1 a 5 ppm.

Brotación: ocurre cuando comienzan a emerger las yemas de los tubérculos, dura 2 a 3 meses, luego la papa está apta para sembrarse, los tubérculos deben presentar por lo menos 3 brotes cortos y fuertes, y tener una longitud de 0.5 a 1 cm.

Emergencia: Los brotes emergen luego de 10 a 12 días en tubérculos, y de 8 a 10 días en semilla sexual.

Tuberización y floración: la floración es señal de que la papa comienza a emitir estolones o que inicia la tuberización. En variedades precoces ocurre a los 30 días después de la siembra, en variedades intermedias entre los 35 a 45 días, y, en las tardías entre 50 a 60 días.

Desarrollo de los tubérculos: los tubérculos alcanzan la madurez fisiológica a los 75 días en variedades precoces, 90 días para intermedias y 120 días para variedades tardías.

3.1.2.4. Manejo del Cultivo de Papa

a) Requerimientos Climáticos y Edáficos

Según Roman (2002) los factores importantes para el cultivo de papa son:

Temperatura: Requiere temperaturas entre 15 a 20 °C para su tuberización (formación de tubérculos) y crecimiento. La papa es considerada una planta termoperiódica, lo que significa que es necesario una variación, entre la temperatura diurna y la nocturna, de por lo menos 10 °C.

Horas luz: Se comporta mejor con períodos de 8 a 12 horas luz. La luminosidad que reciben las plantas ayuda a la formación de los diferentes tipos de azúcares que pasan a formar parte de los tubérculos.

Precipitación: La requerida es de 600 mm, distribuida en todo su ciclo vegetativo; las mayores demandas se dan en las etapas de germinación y crecimiento de los tubérculos.

Altitud: La ideal se encuentra entre los 1500 a 2500 msnm.

Suelos: Los mejores suelos son los francos, franco-arenosos, franco-limosos y franco-arcillosos, de textura liviana, con buen drenaje y con una profundidad efectiva mayor de los 0.50 m.

b) Preparación del Suelo

La preparación del terreno debe hacerse con la mayor anticipación posible a la siembra, con la finalidad de favorecer la descomposición de los residuos de la cosecha anterior e inducir la germinación anticipada de las malezas, para su buen control al momento de la siembra (Roman, 2002).

En el Ecuador, la mayoría de los agricultores practican un sistema de labranza que invierte y remueve los primeros 30 cm de superficie. Por lo general, este trabajo se realiza en forma manual o con la ayuda de un arado (Pumisacho y Sherwood, 2002).

c) Semilla y siembra

La papa es reproducida en forma vegetativa a través de tubérculo-semilla. Después de varios ciclos de uso, la misma semilla pierde su capacidad productiva por lo que se suele renovar periódicamente con semilla certificada o de buena calidad (Pumisacho y Sherwood, 2002).

La densidad de siembra en un cultivo se expresa como el número de plantas por unidad de área. En el caso de la papa, cada planta que proviene de un tubérculo forma un conjunto de tallos. Cada tallo se comporta como una planta individual, por lo que la densidad de tallos por metro cuadrado influye directamente sobre la cantidad de tubérculos que pueden alcanzar un tamaño comercial. Como resultado, la densidad efectiva de una parcela de papa equivale a la densidad de plantas multiplicada por el número de tallos por planta (Roman, 2002).

d) Riego

El cultivo de la papa prospera satisfactoriamente en lugares donde hay abundancia de lluvia o disponibilidad de agua para riego, ya que el sistema radical efectivo de la papa se encuentra entre los 0.20 a 0.60 m de profundidad. Las modalidades de riego utilizadas para este cultivo son: por gravedad y por aspersión. La papa es relativamente sensible a los déficit de agua, por lo que ésta no debe agotarse más de un 30 a 35% del total disponible (Roman, 2002).

e) Labores Culturales

Según Pumisacho y Sherwood (2002) en el país, las principales prácticas culturales son retape usado entre los 15 y 21 días después de la siembra para incorporar el fertilizante complementario y para el control mecánico de malezas; rascadillo se realiza 30 o 35 días después de la siembra y consiste en remover superficialmente el suelo; medio aporque y aporque se debe realizar entre 50 a 60 días y los 70 a 80 días respectivamente y consiste en arrimar tierra a las plantas dejando camellones bien formados.

f) Cosecha

Es recomendable tomar en cuenta el uso eventual de la cosecha. Para el mercado fresco los tres factores importantes son tamaño, forma y apariencia del tubérculo. Si el uso del cultivo no es el mercado fresco, se debe realizar la cosecha cuando los tubérculos alcancen las características necesarias de tamaño y contenido de azúcares. Los tubérculos cosechados deben ser retirados rápidamente del terreno con el objeto de

exponerlos lo menos posible a daños ocasionados por el ambiente, plagas y enfermedades (Pumisacho y Sherwood, 2002).

3.1.2.5.Principales Variedades en Ecuador

Según Pumisacho y Sherwood (2002) cada zona del país produce distintas variedades de papa que pueden ser clasificadas en dos grupos: nativas y mejoradas. Las primeras corresponden a cultivares locales que han sido sometidos a un proceso de selección empírica a través de miles de años por parte de los agricultores y presión de la naturaleza. Las variedades mejoradas son el resultado de una selección metódica realizada por investigadores con materiales nativos y exóticos. Entre las variedades cultivadas en el Ecuador, encontramos representantes de *S. tuberosum* y *S. phureja*. (cuadro 3.1.2.5.1)

Las principales variedades cultivadas preferentemente en el país por zonas son: en la zona Norte Superchola, Gabriela, Esperanza, Roja, Fripapa y María; en la zona Centro Gabriela, Esperanza María, Frypapa Uvilla y Leona Blanca; y en la zona Sur Bolona, Esperanza, Gabriela y Jubaleña (SICA, 2002).

Cuadro 3.1.2.5.1. Principales características de las variedades mejoradas de papa Superchola y Fripapa

CARACTERISTICAS	SUPERCHOLA	FRIPAPA
Subespecie	<i>Andigena</i>	<i>tuberosum x andigena</i>
Zona recomendada y altitud	Norte y Centro, 2800 a 3600 msnm	Norte, 2800 a 3500 msnm
Follaje	Frondoso; desarrollo rápido; tallos robustos y fuertes; hojas medianas que cubren bien el terreno.	Tamaño mediano, color verde llamativo, cuatro tallos, hojas compuestas y numerosas.
Tubérculo	Tubérculos medianos de forma elíptica a ovalada; piel rosada y lisa, con crema alrededor de los ojos, pulpa amarilla pálida sin pigmentación y ojos superficiales.	Relativamente grandes, de forma oblonga; piel de color rosado intenso, sin color secundario; pulpa amarilla y ojos superficiales.
Maduración a 3.000 m de altitud	Semitardía (180 días)	Semitardía (180 días)
Rendimiento Potencial	30 t/ha	47 t/ha
Reacción a enfermedades	Susceptible a la lancha (<i>Phytophthora infestans</i>), medianamente resistente a la roya (<i>Puccinia pittieriana</i>) y tolerante al nematodo del quiste de la papa (<i>Globodera pallida</i>).	Resistente a la lancha (<i>Phytophthora infestans</i>), medianamente susceptible a la roya (<i>Puccinia pittieriana</i>) y medianamente resistente a la cenicilla (<i>Oidium spp.</i>).

3.2. TIZÓN TARDÍO

3.2.1. Generalidades

3.2.1.1. Impacto y distribución geográfica

En Ecuador se cultiva anualmente bajo condiciones de temporal unas 55000 ha de papa. El tizón tardío ataca desde la emergencia, la presencia constante de inóculo, el ingreso de un nuevo genotipo, y la susceptibilidad de los cultivares comerciales al patógeno, obligan al productor pudiente económicamente al uso intensivo de fungicidas (Oyarzun, 2001).

No existen estadísticas generales de los efectos del tizón tardío en términos de daños económicos en el cultivo. De una muestra de 40 parcelas investigadas en el 2000 en las provincias de Chimborazo y Bolívar, en el centro del país, 12 parcelas fueron abandonadas por causa de la enfermedad. En diferentes evaluaciones sobre incidencia y severidad realizadas, la incidencia de tizón tardío en cultivos fue del orden del 30 %, con severidades promedios de 5 %. Cabe notar que, en experimentos, realizados entre 1997 y 1999, el avance de la epidemia no pudo ser controlada, a niveles de acción de un 1 % de infección, a pesar de repetidas aplicaciones de fungicidas (Oyarzun, 2001).

3.2.1.2. Taxonomía

Según lo revisado por Jaramillo (2003) la clasificación taxonómica de *Phytophthora infestans* es la siguiente:

Reino: Cromista (Stramenophyle)

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycete

Subclase: Peronosporomycetidae

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Genero: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora infestans*

3.2.1.3.Morfología

a) Micelio

Son estructuras somáticas (talos) compuestas de filamentos, hialinos (hifas) ramificados y cenocíticos (no septados). El diámetro del micelio (5-8 μm) es variable y depende de la naturaleza física y química del medio y de si el micelio está sobre la superficie aérea, sumergido o dentro de las células hospederas. El micelio raras veces crece simétricamente. Las hifas se ramifican en ángulos aproximados de 90 grados y algunas veces se constriñen en la base. (Jaramillo, 2003)

b) Esporangios y zoosporas

Los esporangios son esporas asexuales que se reproducen sobre pedúnculos llamados esporangioforos, su desarrollo es indeterminado y se ramifican simpodialmente, lo cual es propio de *Phytophthora infestans*. Los esporangios de *P. infestans* son limoniformes y miden entre 29x19 μm a 59x31 μm . Presentan un engrosamiento apical sobre el esporangio, denominado papila, de cuyo extremo emergen las zoosporas. La especie *P. infestans* es semipapilada es decir con una cavidad superficial, cuyo poro es generalmente estrecho (Jaramillo, 2003). Los esporangios germinan casi siempre por medio de zoosporas a temperaturas menores a 12 o 15 °C, en tanto que por arriba de los 15 °C los esporangios germinan directamente produciendo un tubo germinal. Cada uno de los esporangios produce de 3 a 8 zoosporas (Agrios, 1995).

La zoospora esta conformada por el kinetosoma (cuerpo basal de la zoospora), la zona de transición que une el flagelo con el kinetosoma, y el sistema de microtúbulo, que permite anclar el flagelo a la zoospora. Los anclajes (como raicillas) de los flagelos de *P. infestans*, son significativamente diferentes, pues solo tiene cinco raicillas, mientras que otras especies tienen seis. Una de las raicillas de las zoosporas de *P. infestans* contiene seis microtúbulos en comparación con otras especies que solo presentan cuatro (Jaramillo, 2003; Erwin y Ribeiro, 1996).

Los procesos sexuales involucran la producción del oogonio y del anteridio, los cuales surgen de las puntas del micelio que se contactan. En *P. infestans* el anteridio es anfiginio, es decir que el oogonio crece sobre el anteridio (Jaramillo, 2003).

3.2.1.4.Epidemiología y epifitiología de *P. infestans*

a) Desarrollo de la Enfermedad

Los síntomas iniciales de *P. infestans* provienen del inóculo primario, ubicado en el tubérculo. El micelio se propaga hacia el tallo con mayor rapidez a nivel de la región cortical, más tarde se desarrolla entre las células medulares del tallo y llega a la superficie del suelo. Cuando alcanza las partes aéreas de la planta produce esporangióforos que emergen a través de los estomas de las hojas y del tallo y se proyectan al aire (Agrios, 1995). El daño avanza sistemáticamente hasta alcanzar la base de tallos los cuales se tornan de color negro. Los síntomas secundarios se ven en hojas y brotes como manchas de color café a café púrpura normalmente en los bordes o ápices

de las hojas, por el envés de ésta las manchas se cubren de un vello blanquecino (Jaramillo, 2003).

La hojas y tallos de las variedades susceptibles son rápidamente invadidas por el patógeno. En las variedades resistentes, las manchas necróticas crecen lentamente y el hongo esporula poco, por lo que no llegan a morir. En las variedades inmunes, el hongo penetra, pero debido a una reacción de hipersensibilidad, las células infectadas mueren y con ellas también perece el hongo (Jaramillo, 2003).

La segunda fase de la enfermedad o sea la infección de los tubérculos, se produce en el terreno de cultivo durante tiempo húmedo, cuando los esporangios son arrastrados de las hojas y transportados hacia el suelo. Los tubérculos de papa que se localizan cerca de la superficie del suelo son atacados por las zoosporas que han sido liberadas, germinan, y penetran en ellos a través de heridas o lenticelas. (Agrios, 1995).

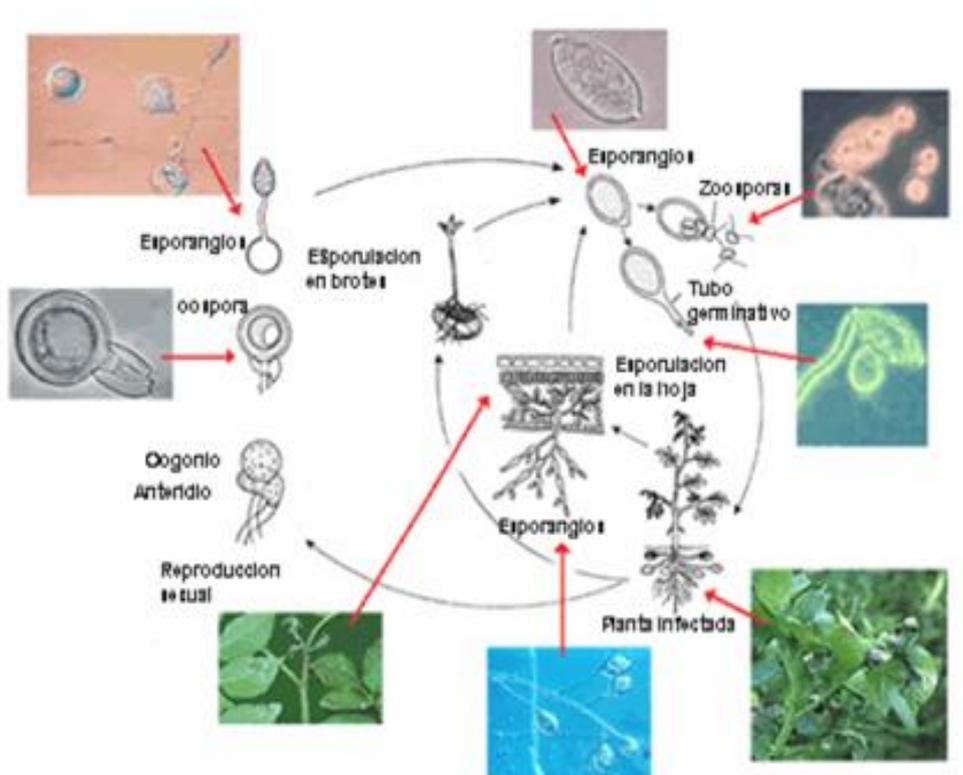


Figura 3.2.1.4.1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans* (Jaramillo, 2003)

b) Epifitología

El desarrollo epidémico del tizón tardío depende en gran parte del efecto que tiene la humedad y la temperatura sobre las distintas etapas del ciclo de vida del hongo. *P. infestans* muestra una mayor esporulación con niveles de humedad relativa del 100 % y de temperatura 16 y 22 °C. Los esporangios pierden su viabilidad al cabo de 3 a 6 horas a humedades relativas por debajo del 80 % (Agrios, 1995).

La germinación de los esporangios sólo se produce cuando hay un cierto volumen de agua sobre las hojas y, con una temperatura entre 10 y 15 °C. Una vez germinados, se requiere un período entre 2 y 2 horas y media a una temperatura de 15 a 25 °C para que se produzca la penetración de los tubos germinales en los tejidos del hospedante. Después de haber penetrado en los tejidos, el micelio del hongo se desarrolla,

aumentando su rapidez a temperaturas entre 17 y 21 °C, también óptimas para que pueda esporular (Agrios, 1995).

Las temperaturas mayores a los 30 °C inhiben el desarrollo del hongo en el campo pero no lo destruyen, de ahí que pueda esporular de nuevo cuando la temperatura sea favorable, pero si la humedad relativa es suficiente (Pumisacho y Sherwood, 2002)

c) Síntomas

Inicialmente la infección por *P. infestans* se manifiesta en pequeñas manchas pálidas o verde oscuras de forma irregular que se expanden rápidamente, formando grandes lesiones necróticas de color café oscuro. Es común observar un halo que va del amarillo al verde claro alrededor de la zona necrótica de la lesión. Cuando hay suficiente humedad en el envés de la hoja ocurre un crecimiento fungoso blanco de esporangios y esporangioforos en los límites de la lesión. Las plantas infectadas despiden un olor característico muy similar al que provoca la quema química o una helada, como resultado de la muerte rápida y descomposición bacteriana del tejido (Pumisacho y Sherwood, 2002).

En los tubérculos las lesiones son café purpúreas, firmes, y relativamente superficiales, si no hay invasión de bacterias u otros órganos saprofitos. En general la cantidad de tubérculos infectados es extremadamente baja en el país (Jaramillo, 2003; Oyarzun, 2001).

3.2.2. Control

3.2.2.1. Convencional – Problemática de productos químicos

El tizón tardío de la papa se controla mediante el empleo de fungicidas químicos. Casi todos los cultivares actuales en el mundo dependen de la aplicación de fungicidas para el control del tizón tardío. Paralelamente, existen factores culturales y de mercado que inciden en la preferencia de los productores para cultivar variedades muy susceptibles, dependientes de repetidas aplicaciones de fungicidas (Mesen, 2001).

En el Ecuador, los fungicidas usados para el control del tizón tardío son muy costosos, por ello su uso es antieconómico. Aparte del costo económico que implica la utilización de fungicidas, esta situación afecta directamente la salud del productor y de su medio ambiente. Paralelo a lo anterior en la mayoría de países se ha estudiado en algún grado la resistencia a fungicidas, encontrándose resistencia a Metalaxyl en Ecuador. Esta situación, plantea un problema serio para el inmediato futuro, debido a que los agricultores continúan utilizando fundamentalmente la estrategia química, como medida de control (Oyarzun, 2001; Ñustez, 1998)

Según Ortiz *et al.*, (2001) el número de aplicaciones de fungicidas varía según el lugar, las condiciones agroecológicas predominantes y la orientación del mercado. De las provincias estudiadas en Ecuador, es en el Carchi donde se aplican fungicidas con mayor frecuencia. La frecuencia en la aplicación de fungicidas para el control de esta enfermedad redonda en altos costos de producción, contaminación ambiental y en baja competitividad. Por lo que se requieren prácticas agrícolas para un manejo integrado de

la enfermedad. Estas prácticas permitirán reducir el uso de agroquímicos, bajar costos de producción, proteger la salud humana y el medio ambiente (Mesen, 2001).

3.2.2.2. Mejoramiento

La resistencia genética de variedades permite la reducción de las aplicaciones de fungicidas, sin que se afecte de manera significativa la producción (Jaramillo, 2003).

En los últimos 30 años han ocurrido varios cambios en la composición de cultivares en el país. Hasta mediados del siglo 20, la gran mayoría de los cultivares sembrados en el país eran nativos del grupo andígena, seleccionados por los agricultores a través de los años. Se trataba de cultivares adaptados a día corto, tardíos a extremadamente tardíos, bastante rústicos y en general muy sensibles a *Phytophthora infestans*. Entre 1995 a 2000 se liberan varios cultivares mejorados: Fri papa, Margarita, Rosita, Sta. Isabela, Soledad Cañari Raymipapa, Suprema y Pan (Oyarzum, 2001).

La importancia relativa de los cultivares ha cambiado muchos desde 1966, cuando los cultivares nativos eran muy importantes, pues los cultivares mejorados han aumentado su importancia desde su liberación y hoy en día representan la mayoría de la superficie sembrada. La mayoría de los cultivares liberados hasta el presente fueron seleccionados por resistencia basada en uno o más genes mayores. A través del mejoramiento con enfoque participativo, se ha logrado establecer una red de productores, técnicos y consumidores para la evaluación de clones. Esto ha catalizado considerablemente la actividad en mejoramiento y se cuenta con una decena de materiales con resistencia general a tizón tardío, precoces y de calidad (Oyarzum, 2001).

Según Mendoza (1998) indica algunas ventajas del uso de variedades resistentes como: la disminución de la tasa de infección en hojas y tallo; permite un amplio rango de fechas de siembra, se puede sembrar todo el año; la frecuencia entre aplicación y aplicación puede extenderse hasta 30 ó 40 días; disminuye los costos de producción por el menor uso de fungicidas, por lo menos un 70% frente a las variedades susceptibles.

3.2.2.3. Manejo Integrado

La falta de estacionalidad del Ecuador, obliga a que el manejo integrado de *Phytophthora infestans* se base en la integración de medidas cuyo objetivo principal debe ser la reducción de la tasa de la epidemia. En términos de recomendación al productor, la estrategia utilizada reconoce resistencia genética y aplicaciones según las condiciones climáticas (Oyarzun, 2001).

Las prácticas culturales pueden servir para reducir la población del patógeno, su sobrevivencia, dispersión y reproducción. La supervivencia de *P. infestans* se puede reducir a través del uso de semilla sana, aporque efectivo y remoción de plantas voluntarias infectadas o descarte de tubérculos infectados. La dispersión de *P. infestans* a un nuevo campo se puede reducir sembrando en una época en que las condiciones sean menos favorables para la enfermedad. La reproducción de *P. infestans* se puede reducir dramáticamente si se usan cultivares resistentes y fungicidas (Garret y Dendy, 2001).

Pumisacho y Sherwood (2002) describen las siguientes alternativas de manejo:

- **Presiembra**

Sanidad: eliminar toda fuente de inóculo para retardar lo más posible el inicio de la enfermedad, además es muy importante la práctica de eliminar plantas voluntarias.

Fertilización: Se recomienda una fertilización balanceada que permita el desarrollo de los mecanismos naturales de defensa de la planta. Un alto uso de nitrógeno contribuye a aumentar la severidad de la enfermedad.

Tratamiento de semilla: usar semilla sana para evitar focos extras de infección.

Ubicación del campo: zonas con temperaturas promedio menores a 8 °C (sobre 3400 m) tienen menos problemas con esta enfermedad.

- **Durante el Cultivo**

No se ha puesto a punto el sistema de alerta para el tizón en el país, pero actualmente se están haciendo avances significativos en esta área. Existe una amplia gama de fungicidas contra la lancha, estos deben ser aplicados en las dosis recomendadas, sin mezclas a menos que lo recomiende la casa química. En el caso de las variedades resistentes, no se debe dejar que la epidemia alcance más del 0,5 % antes de intervenir.

En las variedades susceptibles se procede así: si hay lluvia o neblinas, iniciar con una aplicación cuando se haya alcanzado un 80 % de emergencia. De ser necesario, proteger de cada cinco a ocho días. Usar un sistémico si el protector no ha detenido la enfermedad.

- **Cosecha y Almacenamiento**

Si existe una epidemia en la fase final del cultivo, es importante destruir el follaje para evitar el foco de infección, sobre todo de los tubérculos al momento de la cosecha. Si se guarda papa para semilla, además de hacer una selección rigurosa al momento de la cosecha, desinfectar y guardar en silos verdeadores. Es una buena práctica, antes de desinfectar, exponer los tubérculos al sol durante dos a tres días. Si se ha guardado papa, inspeccionar el lote almacenado por lo menos una vez cada 15 días y descartar los tubérculos afectados.

La implementación de planes de manejo integrado de *Phytophthora infestans* en Ecuador es particularmente difícil por la estructura y el nivel socio-económico de la producción. Gran parte de la producción se efectúa en pequeñas explotaciones con parcelas fraccionadas y dispersas. Además el agricultor no busca manejar la enfermedad sino curar el cultivo de todo factor nocivo, por ello mezcla fungicidas, insecticidas y aun fertilizantes en una sola acción. Otro aspecto relevante es el escaso conocimiento fitopatológico por parte del productor (Oyarzun, 2001).

3.3.CONTROL BIOLÓGICO MICROBIANO

3.3.1. Fundamentos de Control Biológico Microbiano

Según Prieto (2004) se entiende por control biológico microbiano a la utilización de microorganismos antagonistas o sus metabolitos para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas, aquellos organismos que de forma natural interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

En las últimas cuatro décadas el uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente. Los microorganismos son la fuente del material básico para el desarrollo de medicamentos farmacéuticos, agentes bicontroladores en agricultura, cosméticos y productos industriales (González, 2003)

El uso de microorganismos antagonistas de patógenos requiere de estudios previos que se inician con la selección de potenciales controladores de agentes fitopatógenos, para continuar con la identificación de los mecanismos que utilizan para ejercer el control biológico y posteriormente desarrollar una formulación que permita su producción a gran escala. Los procedimientos de aplicación de los bioantagonistas también son fundamentales para lograr los efectos de control deseados (Pérez, 2005).

Según Prieto (2004) se entiende por agente microbiano de control biológico (AMCB) a aquellos agentes biológicos capaces de interferir en el proceso de la vida de los

patógenos vegetales, pueden ser hongos, bacterias, nematodos, etc. Pueden disminuir o impedir la germinación de los propágulos de los patógenos y causar la degradación de los micelios, inhibir el crecimiento y desarrollo de la biomasa del patógeno, por la producción de antibióticos o el entrelazamiento de las hifas, competir por alimento, por espacio u oxígeno.

3.3.2. Evidencias de control biológico microbiano en el cultivo de papa

Varios intentos se han realizado por conseguir microorganismos para el control biológico en el cultivo de papa, principalmente se han venido buscando cepas de bacterias que demuestren actividad de antibiosis a *P. infestans*. (Jaramillo, 2003).

Beltrán y Garcés (2005) indican que aunque no se logró disminuir la incidencia de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa, aislamientos seleccionados de *Trichoderma* permitieron reducir el daño en las plantas observando incluso mayor vigor, tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical. De igual manera Rodríguez (2002) indica que *Bacillus* al ser enfrentado a *R. solani* redujo el crecimiento micelial e inhibió la formación de esclerocios por antibiosis, siendo superado solamente por *Trichoderma*.

Según Loyola *et al.*, (2006) la actividad antagónica de aislamientos de *Pseudomonas* sp. y *Trichoderma* spp fue demostrada, sobre el desarrollo de la enfermedad causada por *P. infestans* en hojas desprendidas y en plantas de papa bajo invernadero. Estos antagonistas tienen potencial para su uso en ambientes controlados o en regiones de

menor presión de la enfermedad, en combinación con otras prácticas de manejo para el control del tizón tardío de la papa.

3.3.3. Mecanismos de acción e interacciones antagonista- patógeno.

Los mecanismos mostrados por microorganismos que tienen capacidad de biocontrol de enfermedades vegetales, dependen de su naturaleza y características bioquímicas y celulares. Los antagonistas bacterianos utilizan principalmente la secreción de moléculas pequeñas (antibióticos) que interfieren con la formación de la pared celular de los patógenos, secreción y expresión de un número importante de sideróforos para ejercer su actividad biocontroladora. Los antagonistas fúngicos pueden controlar el desarrollo de fitopatógenos a través de mecanismos semejantes a los que utilizan las bacterias, y complementar con mecanismos adicionales de control como el micoparasitismo, inducción de resistencia en la planta y tolerancia a estrés, competencia por nutrientes y espacio, secreción de inactivadores de los sistemas de infección del patógeno y de enzimas que hidrolizan a los componentes de las paredes celulares de los patógenos (Perez, 2005).

Según Prieto (2004) no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre antagonistas y patógenos, sobre la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista.

El mismo autor indica que se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, ellos son:

Antibiosis: Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado.

Competencia: Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio.

Interacción directa con el patógeno: Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el *parasitismo* y la *predación*.

- ***Parasitismo*** se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista.

- ***Predación*** se refiere a que el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol.

3.3.4. *Trichoderma* spp.

Trichoderma es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenece a la subdivisión Deuteromycete que se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente aquellos que son atacados por otros hongos (Páez, 2006).

3.3.4.1. Morfología y taxonomía

El género *Trichoderma* comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente. Presentan micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidioforo hialino no verticilado, fialides singulares o en grupos, conidia unicelular coloreada, de rápido desarrollo en medios sintéticos, la colonia se muestra de color verde, básicamente es saprofítica (Rodríguez, 2002).

Según lo revisado por Yandun (1998) *Trichoderma* se clasifica en:

Reino: Myceteae

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Subclase: Hyphomycetidae

Forma: Moniliales

Género: *Trichoderma*

3.3.4.2. Ventajas Antagónicas

Esposito y DaSilva (1998) menciona que han sido demostrados varios mecanismos con los cuales actúa *Trichoderma* como biocontrolador y como colonizador de las raíces: micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, tolerancia al estrés por parte de la planta, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, resistencia inducida y desactivación de las enzimas de los patógenos.

Trichoderma tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, también produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Además su gran variabilidad se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos. *Trichoderma* probablemente sea el hongo beneficioso, más versátil y polifacético que abunda en los suelos. No se conoce que sea patógeno de ninguna planta, sin embargo, es capaz de parasitar, controlar y destruir muchos hongos nemátodos y otros fitopatógenos, que atacan y destruyen muchos cultivos (Páez, 2006).

3.3.4.3.Mecanismo de Biocontrol

Según Esposito y DaSilva (1998) el mecanismo exacto de biocontrol que utiliza el hongo está todavía por elucidar, pero fruto de numerosas investigaciones llevadas a cabo con cepas de este género, se ha identificado que el micoparasitismo se considera como un atributo de todas las especies de *Trichoderma*, y el mejor mecanismo de control biológico de distintas enfermedades fúngicas, que el proceso de destrucción de los patógenos por el hongo *T. harzianum*, intervienen una gran cantidad de enzimas que son capaces de segregar sustancias antibióticas. Además el mecanismo de competencia que poseen algunas cepas de *Trichoderma* se considera esencial para la prevención de enfermedades, pues la zona colonizada no podrá ser ocupada por ningún patógeno. Debido al aumento de crecimiento de las raíces que se genera por la secreción de fitohormonas, existe una mejora en la tolerancia al estrés hídrico. Y en algunos casos se especula la capacidad de solubilización de algunos nutrientes minerales como zinc o fósforo, escasamente solubles o insolubles.

3.3.4.4.Tecnología de biocontrol

Según Rodríguez (2002) existen cuatro técnicas diferentes para la aplicación de *Trichoderma spp.* como agente de biocontrol y cada una puede ser efectiva en el campo, especialmente son económicos aquellos métodos que introducen los antagonistas con el material a plantar. Estas técnicas incluyen:

1. Diseminación, en este caso el preparado de *Trichoderma* se disemina sobre la superficie y se incorpora dentro del suelo infestado.
2. Surcos, la preparación se coloca dentro del surco a plantar.

3. Zona radicular, para esto se mezcla el suelo del campo con *Trichoderma* antes del trasplante.

4. Cubriendo la semilla de esporas de *Trichoderma* usando un adhesivo.

Chet y Baker (1980) citados por Rodríguez (2002) descubrieron que la mínima cantidad efectiva de *Trichoderma* es de 10^6 ufc g^{-1} de suelo. La temperatura óptima para el crecimiento de los aislamientos son alrededor de 20 °C y a temperaturas menores a 18 °C el crecimiento fue muy lento.

En el Cuadro 3.3.4.4.1 se puede observar productos comerciales en base a *Trichoderma* spp., los mismos que controlan diferentes hongos fitopatógenos (Montealegre, 2005).

Cuadro 3.3.4.4.1. Productos comerciales en base a *Trichoderma* spp.

Biocontrolador	Nombre comercial	Fitopatógenos a controlar
<i>Trichoderma</i> spp	3 Tac (WP) y 3 Taex (PA)	Hongos fitopatógenos radicales, medulares, foliares y pudrición ácida.
<i>Trichoderma</i> spp.	Trichonativa	Hongos fitopatógenos radicales y foliares.
<i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. polysporum</i>	Binab T y Polvo Mojable	<i>Chondrostereum purpureum</i> , Enrollamiento clorótico de la vid, <i>Armillaria mellea</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Heterobasidium</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trichodex 25 WP	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> T39	--	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Alternaria solani</i>

Fuente: Montealegre, 2005.

3.4.TECNOLOGÍA DE MANEJO Y CONSERVACIÓN DE AMCB

3.4.1. Importancia de la conservación

La explotación práctica y autosustentable de la conservación de microorganismos *ex situ*, ha mostrado la enorme potencialidad del uso de la micromegadiversidad, contenida en los mas variados micronichos, que contribuye con nuevas orientaciones, estrategias y desarrollo de la agricultura (Falconí, 2001).

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente. El estudio de microorganismos aun en laboratorios con escasos recursos, involucra frecuentemente el uso de cultivos vivos. Estos necesitan ser viables al menos durante el estudio y los experimentos, y si se prueba su importancia deberán ser mantenidos y conservados en una colección de cultivos microbianos para garantizar su disponibilidad (González, 2003).

Considerando que los microorganismos han sido hasta el momento manejados en procesos de conservación *ex situ*, por medio de aislamientos fuera de su ambiente y confinándolos en bancos genéticos, se ha contribuido para preservar indirectamente la diversidad genética. De la misma forma que para el manejo de los recursos vegetales, para los microorganismos, la conservación *ex situ* es un proceso que implica el almacenamiento en bancos de germoplasma, el establecimiento de colecciones de

campo y en campo, incluso el manejo de especies en condiciones silvestres (Falconí, 2001).

3.4.2. Generalidades

La conservación de la biodiversidad posee mecanismos dirigidos para mantener especímenes representativos y latentes, en base a normas de uso práctico, que aseguran la permanencia en buen estado, en relación con las que se encuentran bajo empleo intensivo. Además son procedimientos dirigidos a la reducción de los efectos que las actividades humanas (industrias, aglomeraciones urbanas, etc.) producen sobre los componentes mencionados (Falconí, 2001).

Según García (1999) los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente cepas microbianas son: La pureza del cultivo evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación, La sobrevivencia durante el tiempo de conservación debe ser al menos entre el 70 y 80 % de las células. Y por último las células deben permanecer genéticamente estables.

De igual manera Falconí (2001) indica que uno de los objetivos principales de la conservación *ex situ*, es sustentar la supervivencia de las especies microbianas en sus micronichos naturales. Se debe considerar a esta, como un complemento destinado para la preservación de especies y recursos genéticos *in situ*.

Los mejores métodos de conservación son aquellos que paralizan el crecimiento de las células microbianas, así se garantiza al máximo la estabilidad genética por evitarse la

aparición de generaciones sucesivas; aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en si mismo (García, 1999).

3.4.3. Colecciones de cultivos microbianos

Los microorganismos que son aislados desde su ambiente natural son típicamente conservados en colecciones de cultivos. El número así mantenidos son la base del conocimiento actual de la diversidad microbiana y constituirán el material de trabajo para estudios futuros. Ellos son un inestimable recurso genético, que forman una pequeña parte dentro del inmenso número de microorganismos que aun no están descritos en la actualidad (Gonzáles, 2003).

El mismo autor indica que la ambigüedad asociada al reisolamiento subraya la necesidad de hacer depósitos de microorganismos en una colección de cultivos, que proporcione servicio de conservación experimentada, rápido acceso y la provisión de una cepa de referencia única y conservada. Sin esto, los científicos necesitarían llevar a cabo constantemente el costoso proceso de caracterización e identificación al inicio de cada nuevo estudio.

Las colecciones de cultivos microbianos tienen funciones básicas como son: la conservación *ex situ* de organismos, custodiar recursos nacionales, suministro de recursos viables como base para el desarrollo de la ciencia, recibir depósitos sujetos a publicación y ofrecer servicios de depósito seguros y confiables (Smith, 2000).

3.4.4. Conservación de AMCB

Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos para mantenerlos viables y genéticamente estables. Para lograr estas condiciones se han establecido varios métodos de preservación, la mayoría de estos métodos logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno, por reducción de la temperatura de conservación o por combinación de ambos. Todos los métodos de preservación tienen ventajas y desventajas por tanto es necesario hacer una selección del método a utilizar haciendo un análisis de las características de cada técnica, factibilidad de su uso y las necesidades del usuario. Es recomendable utilizar más de un método de preservación y trabajar con réplicas del microorganismo que se desea preservar como medida de seguridad (González, 2003).

3.4.4.1. Subcultivos

Es el método tradicional para la preservación de microorganismos y consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo. Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión, esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en un refrigerador a 4 °C o en un freezer entre -10 y -20 °C, bajo aceite mineral o agua (Smith y Onions, 1994).

Este método es muy simple, con él se puede mantener la viabilidad de algunos microorganismos por muchos años, y la recuperación de los cultivos activos es

relativamente fácil (González, 2003). Sin embargo tiene algunas desventajas: pérdida de la identificación del microorganismo, riesgo de contaminación y de cambios genéticos que se incrementa a mayor número de transferencias, posible inoculación con el microorganismo equivocado, pérdida del cultivo, deshidratación del medio de cultivo (Smith y Onions, 1994).

3.4.4.2. Desecación

Este método consiste en la separación del agua y la prevención de la rehidratación. Para el desarrollo de los métodos de desecación se han empleado arena, tierra, zeolita, sílica gel, discos y tiras de papel, tapones de algodón, discos de gelatina y cuentas de vidrio y de porcelana. La desecación es un método simple para la preservación de microorganismos, el costo es pequeño, puede utilizarse para el almacenamiento de un gran número de cultivos (González, 2003).

3.4.4.3. Congelación

La preservación por congelación o criopreservación consiste en la congelación y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas, en estas condiciones el agua de las células pasa de fase líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas pueden ser de -20 °C y -70 °C (Sly, 1992).

Según García (1999) los factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

Edad de las células: en la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

Velocidad en la congelación y descongelación: en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación.

Temperatura de almacenamiento: debe ser lo más baja posible, lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido que tiene una temperatura de $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido con una temperatura de $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Empleo de agentes crioprotectores: estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20 %.

Con este método se obtiene la más reducida pérdida de viabilidad, un alto grado de estabilidad y períodos de sobrevivencia de más de 30 años. El costo inicial del equipamiento puede ser alto pero la seguridad de este método justifica su costo, sobretodo en cultivos difíciles de preservar por otros métodos (Sly, 1992).

3.4.4.4.Liofilización

El proceso de liofilización consiste en la sublimación de agua congelada en una cámara a vacío. La liofilización está descrita como el método más adecuado y de mayor éxito para conservar bacterias, hongos y levaduras (Berny y Hennebert, 1991).

Este proceso consta de tres etapas, la pre congelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada (González, 2003).

El mismo autor indica que el medio de preservación es esencial para proteger las células de los daños producto de los procesos de congelación y sobresecado. La elección del medio depende del microorganismo de manera que se logre mantener la viabilidad y permitir un buen recobrado posterior al proceso de liofilización. Usualmente el medio de preservación contiene altos niveles de suero, proteínas, aminoácidos, carbohidratos o leche descremada (Sly, L. 1992).

Según Garcia (1999) los factores que influyen en la eficacia de la liofilización son:

Tipo de microorganismo. Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior.

Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células ml^{-1} en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.

Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, no mayor -50 °C.

Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible.

Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar la rehidratación y la presencia de algún gas dentro del tubo.

Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18 °C y sin bajar de los 0 °C. Los líofilos se deben guardar en la oscuridad.

Este método es uno de los más eficaces para la conservación de muchos tipos de microorganismos, algunos de ellos pueden sobrevivir por períodos de más de 40 años. Es conveniente para la producción y distribución masiva de cultivos; la viabilidad, pureza y estabilidad de los cultivos se mantienen por largos períodos de tiempo, y cientos de éstos pueden guardarse en un pequeño espacio (González, 2003).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.FASE DE LABORATORIO

4.1.1. Localización Geográfica

Esta fase de la investigación fue realizada en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigaciones del Departamento de Ciencias de la vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada a 2748msnm en el cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, Ecuador; con una humedad relativa de 68 % y una temperatura media de 12 °C.

4.1.2. Materiales

Los materiales que se usaron durante la fase de laboratorio fueron: Erlenmeyers, frascos tarados, mechero de alcohol, cubre objetos, porta objetos, tubos de ensayo, cajas de petri de plástico, fundas estériles, reposteros (cámaras húmedas), aza de platino, estilete, bisturí, sacabocados, mascarilla, alcohol potable, alcohol antiséptico, papel toalla, fundas de plástico, gradillas, tijeras, cinta de parafilm, barreno, plantilla, hojas de campo, tabla de caracterización, tabla de evaluación, GPS, balanza de precisión, agitador de tubos, cámara de aislamiento, autoclave, incubadoras, microondas, refrigeradora y esterilizador eléctrico de marmita.

4.1.3. Métodos

4.1.3.1. Aislamiento y purificación de *P. infestans* del follaje de papa

Se procedió a tomar muestras de hojas de papa con signos y síntomas de *Phytophthora infestans* en el campo. Las partes muy necrosadas fueron eliminadas. Se colocaron las hojas en cámaras de humedad durante 24 horas a una temperatura entre 18 y 20 °C. Una vez presente el micelio se tomó con un estilete y se sembró en cajas de petri con medio agar arveja, descrito por Tuite (1969) para aislamiento y mantenimiento de *Phytophthora infestans in vitro* (Anexo 1). Las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas a una temperatura entre 18 y 20 °C, durante 5 días.

Para la purificación de *P. infestans* se tomó micelio y sembró con un estilete en una caja nueva con medio agar arveja. Posteriormente se eliminó con un bisturí partes del medio que se encontraron contaminadas.

4.1.3.2. Aislamiento y purificación de cepas de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento se utilizó el método de disolución y plateo a partir de muestras del suelo, descrito por Girard (1964). Se tomaron muestras de suelo a 20 cm de profundidad con ayuda de un barreno, y se colocaron en fundas plásticas (Anexo 2). Las muestras fueron colocadas en fundas estériles con una solución de cloruro de sodio al 1%, en una relación 1:10. Las suspensiones fueron agitadas manualmente por 15 minutos para lograr el desprendimiento de microorganismos. De cada muestra se tomaron 100 µl y se inocularon en cajas de petri con medio agar de Martín. Las cajas fueron selladas con

parafilm e incubadas a 26 °C durante 7 días o hasta el aparecimiento de colonias de *Trichoderma*.

Cada colonia identificada como *Trichoderma* se purificó mediante transferencia directa a cajas con medio PDA.

4.1.3.3. Mantenimiento de cepas de *Trichoderma*

Para el mantenimiento de las cepas se transfirieron los cultivos puros a tubos con PDA. Los tubos fueron sellados con parafilm e incubados a 26 °C durante 2 a 3 días hasta observar el aparecimiento de micelio y esporas. Se procedió a poner aceite de vaselina en los tubos, se sellaron con parafilm y se colocaron en refrigeración.

4.1.3.4. Identificación de microorganismos aislados

Se identificaron 17 aislados obtenidos en los muestreos en campo y de 9 cepas de *Trichoderma* del banco de microorganismos del Centro de Investigaciones del Departamento de Ciencias de la Vida.

Se obtuvieron cultivos puros, a partir de aislados puros mantenidos en tubos con PDA en refrigeración. Estos se transfirieron a cajas de petri con PDA. Las muestras se incubaron a 26 °C durante 2 a 3 días hasta observar el aparecimiento de micelio y esporas.

La identificación de aislados se realizó mediante reconocimiento de crecimiento en medio de cultivo y de estructuras microscópicas (hifas, esporas y clamidosporas). De cada aislado en PDA se prepararon muestras frescas de micelio sobre placas portaobjetos, con lactofenol. Las características macro y microscópicas fueron cotejadas con las claves de identificación de géneros de Deutomycetes Gams & Bissett, para especies de *Trichoderma* de Gilman (1956) y la clave interactiva de la APS de Samuels *et al* (2006). Adicionalmente se usaron los diagramas descritos por Ainsworth (1971) para reconocimiento de estructuras fungosas. Los resultados se registraron en tablas de caracterización, registros fotográficos mediante un fotomicroscopio Olympus CH30 y sistema microfotográfico PKCH3.

4.1.3.5. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se procedió a evaluar la capacidad antagonica *in vitro* de 17 cepas de *Trichoderma* spp sobre *Phytophthora infestans*. Las cepas seleccionadas fueron aquellas pertenecientes a las especies *Trichoderma viride*, *T. harzianum* y *T. koningii*. Además se incluyeron tres testigos únicamente con *P. infestans*, dando un total de 20 tratamientos.

El ensayo se dispuso en un Diseño de Parcela Dividida con seis repeticiones, siendo cada caja de petri una unidad experimental.

Para la selección de antagonistas se usó como referencia la metodología descrita por Erazo (2001) para pruebas de antagonismo con *Trichoderma*, según el siguiente procedimiento:

a) Obtención de inóculo primario de *Phytophthora infestans*

El inóculo primario de *P. infestans* se obtuvo a partir de cultivos puros de *Phytophthora infestans* mantenidos en cajas de petri con agar arveja, se tomaron rodajas de 1 cm de diámetro con un sacabocados estéril. Se transfirieron de dos a cuatro rodajas con micelio de *P. infestans* a cajas de petri con agar arveja mediante el uso de un bisturí. Las muestras fueron incubadas entre 15 y 20 °C hasta observar el aparecimiento de micelio. Una vez que el hongo colonizó toda la caja de petri se utilizó las muestras para las pruebas de eficiencia *in vitro*. Las cajas de petri con evidencia de contaminación por bacterias u otros hongos fueron descartadas.

b) Obtención de inóculo primario de *Trichoderma*

El inóculo primario de *Trichoderma* se obtuvo a partir de cultivos puros *Trichoderma* mantenidos en tubos con PDA. Estos fueron transferidos a cajas de petri con agar arveja, las muestras se incubaron a 26 °C hasta observar aparecimiento de micelio. Una vez que el hongo colonizó toda la caja de petri se utilizaron en pruebas de eficiencia *in vitro*. Las cajas de petri con evidencia de contaminación por bacterias u otros hongos fueron desechadas.

c) Pruebas de eficiencia *in vitro* de *Trichoderma* spp. versus *P. infestans*

A partir de *Phytophthora infestans* en agar arveja en caja de petri se hicieron rodajas de 1 cm de diámetro con un sacabocados estéril. Las rodajas de *P. infestans* mediante el

uso de un bisturí fueron transferidas a cajas de petri con agar arveja con ayuda de una plantilla (Figura 4.1.3.5.1) y se incubaron de 4 a 5 días a 15 °C.

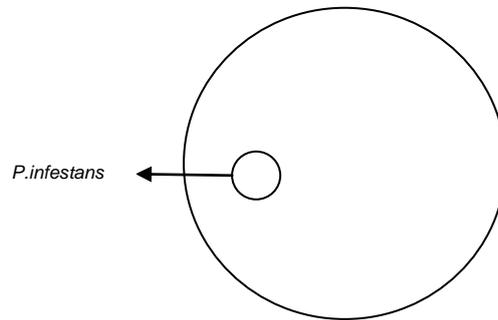


Figura 4.1.3.5.1. Inoculación de *P. infestans* en cajas para pruebas de antagonismo

A partir de cultivos puros de *Trichoderma* spp. en agar arveja se hizo rodajas de 1 cm de diámetro con un sacabocados estéril. Las rodajas se transfirieron a cajas de petri que contenían *P. infestans* con ayuda de una plantilla (Figura 4.1.3.5.2) y se incubaron a 15°C.

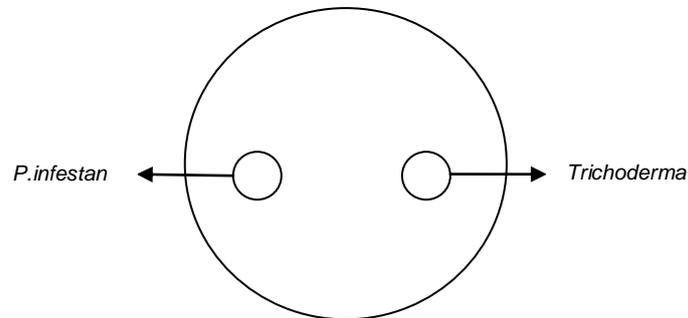


Figura 4.1.3.5.2. Inoculación de *Trichoderma* en cajas para pruebas de antagonismo

Se tomaron datos del crecimiento de *Trichoderma* spp. versus *Phytophthora infestans* y de los dos hongos hacia los bordes de la caja de petri luego de 5-6 días de la inoculación (Figura 4.1.3.5.3). Los controles fueron cajas solo con rodajas de *P. infestans*.

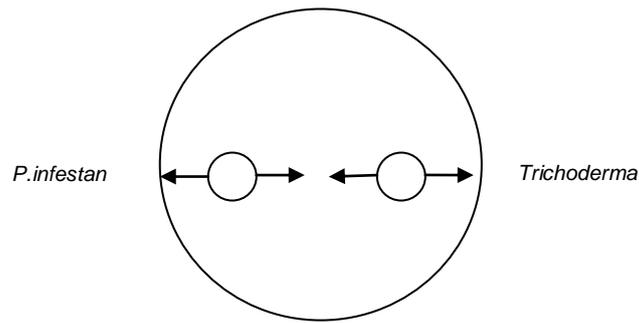


Figura 4.1.3.5.3. Método de evaluación de antagonismo entre *Trichoderma spp.* y *P. infestans*

La distribución de los tratamientos fue la siguiente:

T₁: Cepa C-19

T₂: Cepa IASA-A

T₃: Cepa IQP

T₄: Cepa Agripac

T₅: Cepa C5R1

T₆: Cepa C16R2

T₇: Cepa C10R1,2

T₈: Cepa C9R1

T₉: Cepa C11R1

T₁₀: Cepa C10R1,1

T₁₁: Cepa C13R2

T₁₂: Cepa C-7

T₁₃: Cepa Tu2R3,2

T₁₄: Cepa C9R3

T₁₅: Cepa Tu2R3,1

T₁₆: Cepa DM19

T₁₇: Cepa DM7

T₁₈: Testigo 1

T₁₉: Testigo 2

T₂₀: Testigo 3

Los resultados fueron registrados en tablas de evaluación de antagonistas, así como registros fotográficos mediante una cámara digital.

Para la evaluación de las variables se hizo uso del siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + A_i + \delta_{k(i)} + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Variable de respuesta en la parcela grande i, parcela pequeña j y repetición k

u = La media general

A_i = El efecto principal de la parcela grande i

$\delta_{k(i)}$ = El error para la parcela grande

B_j = El efecto principal de la parcela pequeña j

$(AB)_{ij}$ = La interacción de la parcela grande i con la parcela pequeña j

ε_{ijk} = El error para la parcela pequeña

Además se realizó la Prueba de Tukey al 5% entre variedad, patógeno e interacción; y pruebas de normalidad y homocedasticidad para unificar los supuestos del ADEVA.

Para determinar la relación existente entre la capacidad de crecimiento del patógeno y la capacidad antagónica se realizó un análisis de regresión polinómica de tercer grado entre estas variables.

4.2.FASE DE CAMPO

4.2.1. Localización Geográfica

Esta fase se realizó en la parroquia Izamba, del cantón Ambato en la provincia de Tungurahua, Ecuador ubicada a 2600 msnm, con una humedad relativa de 64 % y una temperatura media de 14 °C.

4.2.2. Materiales

Los materiales que se usaron durante la fase de campo fueron: frascos tarados, mechero de alcohol, tubos de ensayo, balanza de precisión, incubadora-agitador, cámara de aislamiento, autoclave, microondas, refrigeradora, esterilizador eléctrico de marmita, cajas de petri de plástico, jeringas de 5ml, bisturí, sacabocados, alcohol potable, alcohol antiséptico, fundas de plástico, papel toalla, tijeras, cinta de parafilm, macetas de 0.3 m de diámetro, sustrato, semilla de papa, fertilizante 18-46-0, etiquetas, papel contac, hilo de chillo, atomizadores, guantes, mascarilla, regaderas y tabla de evaluación.

4.2.3. Métodos

Para el desarrollo de esta fase se utilizaron dos variedades de papa, una variedad susceptible (Superchola) y una variedad resistente (Fripapa) al ataque de *Phytophthora infestans*.

4.2.3.1. Desinfección y Germinación de la semilla de papa

Se desinfectó la semilla de papa con una solución de 1g de vitavax por kg de papa. Se sumergió la semilla en un tanque de 50 litros con el vitavax, por un lapso de 8 a 10 minutos. Se sacó la semilla y se secó al sol. Una vez seca se la colocó en medio de dos capas gruesas de paja para mantener el calor y lograr que germine. Después de 45 días se retiró la semilla de la paja con evidente crecimiento de hijuelos lista para la siembra.

4.2.3.2. Siembra de las semillas de papa en maceta

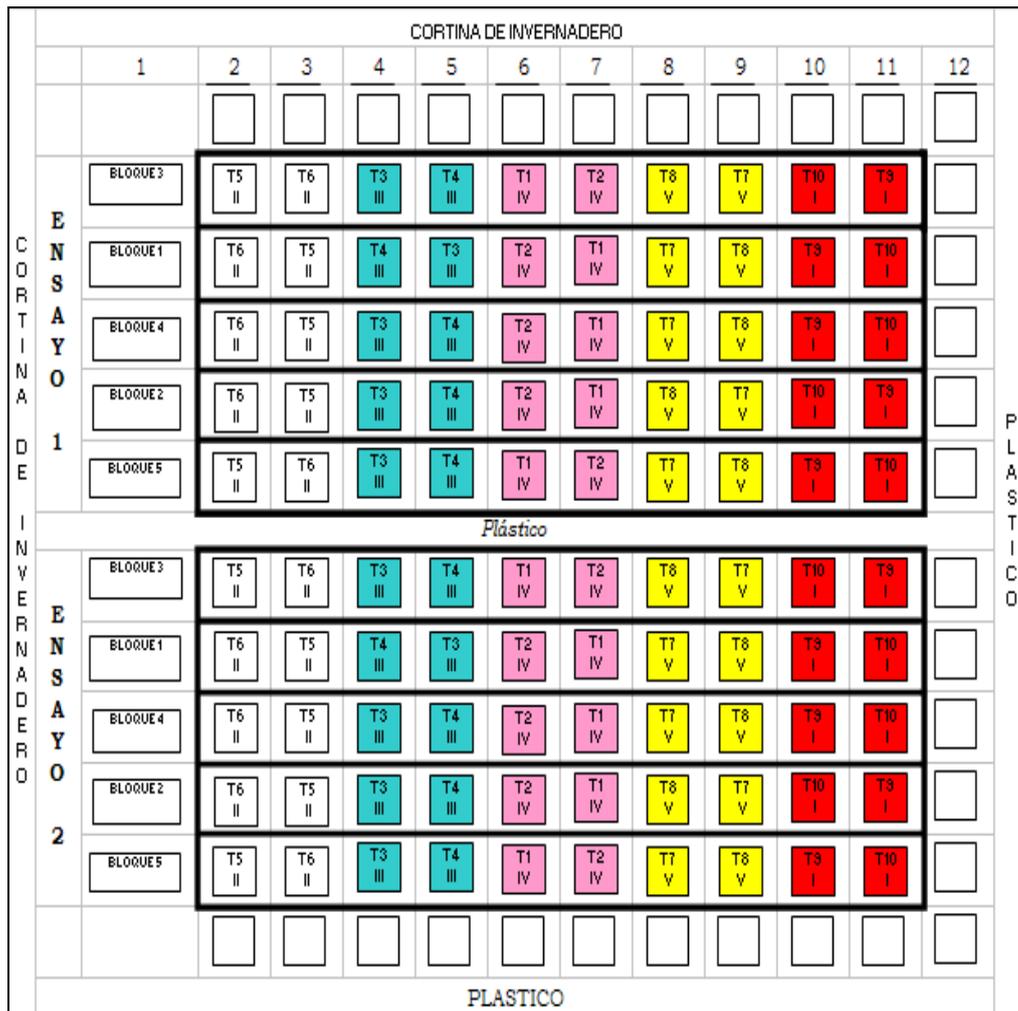
Para la siembra se utilizó un sustrato anteriormente desinfectado y semilla certificada. Se colocó el sustrato hasta la mitad de las macetas, este sustrato contenía tierra de zanja, pómida y humus en una relación 3:1:1, luego se colocó el fertilizante (18-46-0) para dar a la planta los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo inicial, finalmente se puso sustrato hasta llenar la maceta. La siembra se realizó aproximadamente a 8 cm de profundidad, dos tubérculos por maceta.

4.2.3.3. Pruebas de antagonismo *in vivo*

Se evaluó la capacidad antagonica *in vivo* de 3 cepas de *Trichoderma* spp sobre *Phytophthora infestans* en 2 variedades de papa. Las cepas fueron seleccionadas por su capacidad antagónica *in vitro* en la fase de laboratorio. Además, se incluyeron dos testigos para cada variedad, un testigo absoluto y un testigo químico, dando un total de 10 tratamientos. Se realizó dos repeticiones del ensayo en tiempos diferentes para establecer comparaciones entre ellas. El ensayo se dispuso en un Diseño de Parcela

Dividida, donde la parcela grande fueron las cepas de *Trichoderma* y la subparcela fueron las variedades de papa. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones y cada maceta fue una unidad experimental (Figura 4.2.3.3.1).

Figura 4.2.3.3.1. Plano de Campo para evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. para control de *Phytophthora infestans* bajo invernadero.



a) Preparación de biopesticidas de *Trichoderma*

Se activaron las cepas seleccionadas de *Trichoderma*. Se usaron aislados puros mantenidos en tubos con PDA y aceite de vaselina en refrigeración, de los cuales con la ayuda de un estilete se transfirió biomasa a cajas de petri con PDA. Las muestras se

incubaron a 26 °C durante 2 a 3 días hasta observar el aparecimiento de micelio y esporas.

Para facilitar la concentración requerida se usó 2 cajas por cada 400 ml de caldo papa dextrosa. Para la extracción de la biomasa de las cajas se procedió a colocar cantidad suficiente de una solución de cloruro de sodio al 1% hasta cubrir la superficie de las cajas. Con la ayuda de un aza de platino se raspó toda la superficie de la caja para extraer la biomasa. Usando jeringuillas de 5ml se procedió a transferir el resultante a frascos tarados con 400 ml de Caldo Papa Dextrosa. Los frascos fueron sellados con parafilm y colocados en un incubador-agitador a 26 °C, 60rpm por 5 días.

Durante los 5 días se verificó frecuentemente la concentración de cada cepa en el caldo papa dextrosa, hasta alcanzar la concentración de 10^9 ufc ml⁻¹.

b) Preparación de la suspensión de *Phytophthora infestans*

Se obtuvo inóculo a partir de cultivos puros mantenidos en cajas de petri con agar arveja, en las cuales se hizo rodajas de 1 cm de diámetro con un sacabocados estéril. Se transfirió cuatro rodajas con micelio de *P. infestans* a cajas de petri con agar arveja mediante uso de un bisturí. Las muestras fueron incubadas entre 15 y 20 °C hasta observar el aparecimiento del micelio del hongo.

Una vez que el hongo colonizó la caja se extrajo la biomasa del mismo colocando suficiente cantidad de una solución de cloruro de sodio al 1% para cubrir la superficie de la caja. Con ayuda de un bisturí se raspó superficie de la caja para extraer la biomasa.

Usando jeringuillas de 5 ml se transfirió el resultante a frascos tarados con 400 ml de agua estéril. Los frascos fueron sellados con parafilm y puestos en agitación por 5 minutos. Para alcanzar la concentración de 10^5 ufc ml^{-1} se usó 4 cajas colonizadas de *P. infestans* por cada 400 ml de agua estéril.

c) Pruebas de eficiencia *in vivo* de *Trichoderma* spp. versus *Phytophthora infestans*

Después de 15 días de la emergencia se inocularon las plantas con *Trichoderma* en las primeras horas de la mañana mediante atomizadores con una suspensión de 10^8 ufc ml^{-1} . La aplicación se realizó en la parte aérea de la planta, hasta el punto de escurrimiento.

En las horas de la tarde se procedió a inocular las plantas con *P. infestans* por medio de atomizadores con una suspensión de 10^4 ufc ml^{-1} . La aplicación fue dirigida al envés de las hojas donde se encuentran los estomas.

El testigo químico recibió Mancozeb en una dosis de 1g l^{-1} y el testigo absoluto solo a *P. infestans*. Todos los tratamientos se aplicaron con el adherente Carrier a una concentración de 0.4 ml l^{-1} .

La aplicación de los tratamientos biológicos y del testigo químico se realizó cada 7 días, por 8 ocasiones. La inoculación de *P. infestans* en todos los tratamientos se realizó cada 15 días por 4 ocasiones.

La distribución de los tratamientos fue la siguiente:

- T₁: Variedad Friepapa - Cepa C9R1
 T₂: Variedad Superchola - Cepa C9R1
 T₃: Variedad Friepapa - Cepa C5R1
 T₄: Variedad Superchola - Cepa C5R1
 T₅: Variedad Friepapa - Cepa C10R1,1
 T₆: Variedad Superchola - Cepa C10R1,1
 T₇: Variedad Friepapa - Testigo químico
 T₈: Variedad Superchola - Testigo químico
 T₉: Variedad Friepapa - Testigo absoluto
 T₁₀: Variedad Superchola - Testigo absoluto

Se tomaron datos de la incidencia y severidad de *Phytophthora infestans* en todos los tratamientos, mediante la escala de incidencia propuesta por Kranz (1994) y la escala de severidad propuesta por Cruickshank (1982) (Anexo 4).

Los resultados se registraron en tablas de evaluación de antagonistas en campo registros fotográficos mediante una cámara digital.

Para la evaluación de las variables se hizo uso del siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + A_i + \delta_{k(i)} + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Variable de respuesta en la parcela grande i, parcela pequeña j y repetición k

u = La media general

A_i = El efecto principal de la parcela grande i

$\delta_{k(i)}$ = El error para la parcela grande

B_j = El efecto principal de la parcela pequeña j

$(AB)_{ij}$ = La interacción de la parcela grande i con la parcela pequeña j

ε_{ijk} = El error para la parcela pequeña

Además se realizó discriminación de los tratamientos mediante prueba de Duncan al 5% entre variedad, patógeno e interacción; y pruebas de normalidad y homocedasticidad para unificar los supuestos del ADEVA.

4.3. CONSERVACIÓN DE CEPAS

La etapa de conservación se realizó en base a una técnica ya establecida. Se liofilizó las cepas con el fin de establecer un banco de microorganismos benéficos para el control de *P. infestans*

La conservación de las cepas eficientes de *Trichoderma* spp. fue realizada en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigaciones del Departamento de Ciencias de la vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada en el cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, Ecuador.

Para la liofilización de las cepas eficientes de *Trichoderma* en el control de *Phytophthora infestans* se trabajó en base a la metodología descrita por Costa *et al.*, (2002) para liofilización de microorganismos.

Se activaron las cepas de *Trichoderma* spp. que se encontraban almacenadas en tubos con PDA y aceite de vaselina en refrigeración. Cada aislado se transfirió a cajas de petri

con Medio Agar Almidón mediante una aguja de disección o un estilete. Las cajas inoculadas se incubaron a 26 °C por 24 horas o temperatura ambiente por 7 días, hasta observar esporulación. Para el incremento de biomasa se transfirió el micelio esporulado de las cajas con medio agar almidón a frascos tarados con tapa de 100 ml con Caldo Levadura-Sucrosa estéril. Las muestras se incubaron a 30-31 °C por 24 horas en agitación.

Luego de la fermentación los frascos con suspensión del hongo se colocaron en refrigeración durante toda la noche. Posteriormente se dispuso en tubos estériles de 20 ml y se centrifugó a 6981 g por 10 minutos a 15 °C. Se separó el sobrenadante de la biomasa y se resuspendió en 15 ml de una solución buffer Fosfato de Potasio (0.05 mol l⁻¹, pH 6.5). Se mantuvo en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Se realizó el mismo procedimiento anterior de centrifugación con cambios de tres series sucesivas de sucrosa 1%, 5% y 10% de 15 ml cada uno. Después se dispuso 5 ml de la suspensión de biomasa en sucrosa 10% en viales estériles de 10 ml mediante jeringas estériles, se tapó con tapones de caucho y se almacenó a -20 °C durante toda la noche. Se tomó las muestras en viales y se liofilizó haciendo uso del liofilizador por 24 horas. Se colocó tapones de aluminio y se rotuló (Anexo 5).

Se guardó las muestra en refrigeración por 24 horas y se reactivaron en una suspensión de leche descremada - agua estéril, posteriormente se sembró en PDA para control de calidad.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.FASE DE LABORATORIO

5.1.1. Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron un total de 21 aislados como posibles cepas de la especie *Trichoderma*. De estas 5 fueron aisladas en la provincia de Pichincha, 14 en la provincia de Carchi y 2 en la provincia de Tungurahua. Estos aislados fueron identificados mediante códigos según la localidad para su respectivo manejo (Cuadro 5.1.1.1).

Cuadro 5.1.1.1. Procedencia de las posibles cepas de *Trichoderma* aisladas y purificadas. IASA, Ecuador, 2007.

Código	Provincia
T1R3,1	Pichincha
T1R3,2	Pichincha
T4R3,1	Pichincha
T4R3,2	Pichincha
T5R3	Pichincha
C4R1	Carchi
C5R1	Carchi
C9R1	Carchi
C9R2	Carchi
C9R3	Carchi
C10R1,1	Carchi
C10R1,2	Carchi
C10R3	Carchi
C11R1	Carchi
C15R2	Carchi
C12R1,1	Carchi
C12R1,2	Carchi
C13R2	Carchi
C16R2	Carchi
Cristian	Carchi
Tu2R3,1	Tungurahua
Tu2R3,2	Tungurahua

5.1.2. Caracterización de los aislamientos

Por características morfológicas de las 21 cepas aisladas del suelo, 17 pertenecieron al género *Trichoderma* (Figura 5.1.1 de A-C) y a las especies *T. album*, *T. lignorum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. glaucum*, *T. harzianum* y *T. koningii* (**Anexo 6**); lo cual indica que *Trichoderma* se encuentra presente y manifiesta una gran diversidad de especies en suelos de las diferentes zonas en las que se muestreó. Páez (2006) manifiesta que *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios.

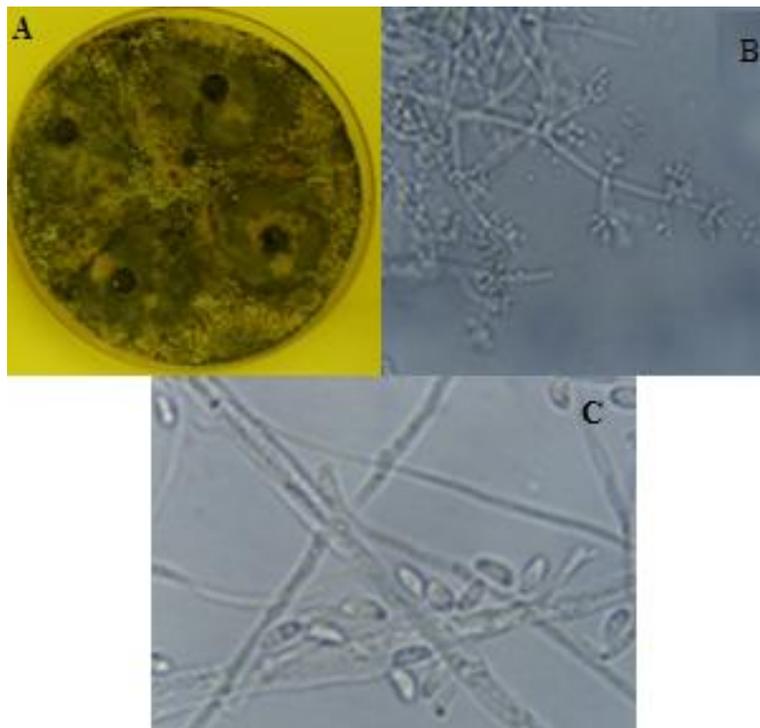


Figura 5.1.2.1. Caracterización de *Trichoderma* Cepa C9R1. (A) Crecimiento de micelio en PDA. (B) Esporangioforo de *Trichoderma* 400 aumentos. (C) Conidias maduras de *Trichoderma* 400 aumentos. IASA, Ecuador, 2007

5.1.3. Pruebas de Antagonismo

Al analizar la capacidad de crecimiento del patógeno *in vitro* se determinó una interacción significativa tratamiento x días ($F_{95, 494} = 12.44$; $p < 0.0001$; Cuadro 5.1.3.1).

Cuadro 5.1.3.1. Análisis de varianza para capacidad de crecimiento del patógeno, capacidad antagónica, borde *Trichoderma* y borde *P. infestans*.

IASA, Ecuador, 2007.

Fuente de Variación	Capacidad Patogénica	Capacidad Antagónica	Borde <i>P. infestans</i>	Borde <i>Trichoderma</i>
Tratamientos	<0.0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Error A	<0,0001	<0,0001	0,0056	<0,0001
Tiempo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tratamientos * tiempo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Probabilidad asociada a cada fuente de variación

De igual forma se encontró un efecto significativo para las fuentes tratamientos ($F_{19, 494} = 22.79$; $p < 0.0001$) y tiempo ($F_{5, 494} = 390.09$; $p < 0.0001$), lo que evidenció diferencias entre los tratamientos aplicados demostrando así que la capacidad de crecimiento del patógeno sufre alteración al estar en contacto con el antagonista *Trichoderma*, por tanto los tratamientos controles no se vieron afectados y en estos el patógeno *Phytophthora infestans* creció de manera constante sin ninguna alteración.

Al comparar la capacidad de crecimiento del patógeno se pueden destacar los tratamientos T₈ (C9R1), T₅ (C5R1), T₁₀ (C10R1,1) y T₆ (C16R2) que presentaron el menor grado de crecimiento de *Phytophthora infestans* y no muestran una diferencia significativa entre ellos. También se puede mencionar que la mayoría de los tratamientos tuvieron algún efecto sobre la capacidad de crecimiento del patógeno, sin embargo los tratamientos T₃ (IQP), T₂ (IASA-A) y T₁ (C-19) no mostraron diferencia

respecto a los testigos (T₁₈, T₁₉ y T₂₀), y presentaron mayor desarrollo del patógeno (Cuadro 5.1.2).

Cuadro 5.1.3.2. Promedio (\pm error estándar) de capacidad de crecimiento del patógeno, capacidad antagonica, borde *Trichoderma* y borde *P. infestans*. IASA, Ecuador, 2007.

Tratamiento	Cap de Creciento	Capacidad Antagónica	Borde <i>P. infestans</i>	Borde <i>Trichoderma</i>
T ₁₀ : C10R1,1 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	0,72 \pm 0,11 ab	3,56 \pm 0,28 d	0,88 \pm 0,05 a	0,98 \pm 0,01 bc
T ₅ : C5R1 (<i>Trichoderma koningii</i>)	0,67 \pm 0,12 ab	3,40 \pm 0,30 d	0,92 \pm 0,04 ab	0,89 \pm 0,04 bc
T ₈ : C9R1 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	0,57 \pm 0,12 a	3,32 \pm 0,35 cd	0,90 \pm 0,05 ab	0,74 \pm 0,06 a
T ₇ : C10R1,2 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,11 \pm 0,15 abc	3,36 \pm 0,31 cd	0,85 \pm 0,06 a	0,94 \pm 0,02 bc
T ₁₃ : Tu2R3,2 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,23 \pm 0,14 bcd	3,26 \pm 0,30 bcd	0,90 \pm 0,05 ab	0,89 \pm 0,04 bc
T ₁₇ : DM7 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,19 \pm 0,13 bcd	3,23 \pm 0,29 bcd	0,90 \pm 0,05 ab	0,91 \pm 0,03 bc
T ₉ : C11R1 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,11 \pm 0,12 abc	3,11 \pm 0,22 abcd	1,00 \pm 0,00 b	0,91 \pm 0,04 bc
T ₁₁ : C13R2 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,16 \pm 0,09 bcd	2,98 \pm 0,20 abcd	1,00 \pm 0,00 b	0,92 \pm 0,03 bc
T ₁₆ : DM19 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,11 \pm 0,09 abc	2,89 \pm 0,25 abcd	0,97 \pm 0,03 ab	0,91 \pm 0,03 bc
T ₄ : Agripac (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,69 \pm 0,19 def	2,88 \pm 0,28 abcd	0,92 \pm 0,04 ab	1,00 \pm 0,00 c
T ₆ : C16R2 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	0,87 \pm 0,10 ab	2,84 \pm 0,22 abcd	0,93 \pm 0,03 ab	0,89 \pm 0,04 bc
T ₁₄ : C9R3 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	1,18 \pm 0,09 bcd	2,76 \pm 0,22 abcd	0,94 \pm 0,04 ab	0,91 \pm 0,04 bc
T ₁₂ : C-7 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	1,19 \pm 0,09 bcd	2,73 \pm 0,20 abcd	0,96 \pm 0,03 ab	0,92 \pm 0,03 bc
T ₃ : IQP (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,92 \pm 0,17 ef	2,56 \pm 0,18 abcd	1,00 \pm 0,00 b	1,00 \pm 0,00 c
T ₂ : IASA-A (<i>Trichoderma harzianum</i>)	2,19 \pm 0,14 f	2,27 \pm 0,16 abc	1,00 \pm 0,00 b	1,00 \pm 0,00 c
T ₁ : C-19 (<i>Trichoderma atroviride</i>)	2,24 \pm 0,12 f	2,19 \pm 0,14 ab	1,00 \pm 0,00 b	1,00 \pm 0,00 c
T ₁₅ : Tu2R3,1 (<i>Trichoderma koningii</i>)	1,53 \pm 0,08 cde	1,98 \pm 0,20 a	1,00 \pm 0,00 b	0,86 \pm 0,05 ab
T ₁₈ : Testigo 1	1,84 \pm 0,06 ef	0	1,00 \pm 0,00 b	0
T ₁₉ : Testigo 2	2,18 \pm 0,02 f	0	1,00 \pm 0,00 b	0
T ₂₀ : Testigo 3	1,89 \pm 0,06 ef	0	1,00 \pm 0,00 b	0

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, p <0,05

Stefanova *et al* (1999) usando *Trichoderma* spp para controlar hongos fitopatógenos del suelo determinaron que los metabolitos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* provocaron un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia de *Phytophthora nicotianae* y otros hongos fitopatógenos en comparación con el testigo.

También al comparar la capacidad de crecimiento del patógeno de los tratamientos en relación al tiempo se encontró diferentes rangos, lo cual evidencia el efecto antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *P. infestans*, impidiendo el crecimiento del patógeno y, por lo tanto, reduciendo la capacidad de crecimiento del patógeno en forma paulatina y significativa (Cuadro 5.1.3).

Cuadro 5.1.3.3. Promedio (\pm error estándar) de capacidad de crecimiento del patógeno, capacidad antagónica, borde *Trichoderma* y borde *Phytophthora infestans* en relación al tiempo. IASA, Ecuador, 2007.

Días	Cap. de crecimiento del patógeno	Capacidad Antagónica	Borde <i>P. infestans</i>	Borde <i>Trichoderma</i>
1	1,89 \pm 0,05 e	0,62 \pm 0,03 a	1,00 \pm 1,7E-3 b	0,61 \pm 0,03 a
2	1,94 \pm 0,05 e	2,19 \pm 0,07 b	1,00 \pm 4,2E-3 b	0,99 \pm 0,01 c
3	1,56 \pm 0,07 d	2,97 \pm 0,09 c	1,00 \pm 2,5E-3 b	1,00 \pm 4,9E-3 c
4	1,27 \pm 0,07 c	3,35 \pm 0,08 d	1,00 \pm 4,2E-3 b	0,99 \pm 0,01 c
5	0,90 \pm 0,07 b	3,72 \pm 0,08 e	0,98 \pm 0,01 b	0,95 \pm 0,02 b
6	0,66 \pm 0,07 a	4,55 \pm 0,14 f	0,74 \pm 0,04 a	1,00 \pm 0,00 c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0,05$

Al analizar la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora infestans* se determinó una interacción significativa tratamiento x tiempo ($F_{80, 425} = 7.27$; $p < 0.0001$). Esto se presentó debido a que las cepas de *Trichoderma* mantienen un crecimiento constante que no se ve afectado por ningún factor y aumenta conforme pasan los días.

Se encontró también un efecto significativo para las fuentes tratamientos ($F_{16, 425} = 4.13$; $p < 0.0001$) y tiempo ($F_{5, 425} = 949.87$; $p < 0.0001$), esto representa la diferencia existente entre los tratamientos y a medida que avanza el tiempo, de esta forma se puede afirmar que existió una respuesta positiva para el control del patógeno por parte del antagonista.

Al comparar la capacidad antagonista de los tratamientos sometidos a pruebas duales en caja de petri, se puede destacar los tratamientos T₅ (C5R1) y T₁₀ (C10R1,1) (Figura 5.1.3.1 A y B) que presentaron el mayor grado de antagonismo frente al patógeno, lo que se evidenció tanto en la medición numérica como en la observación visual, dado que estas cepas cubrían al patógeno impidiendo su crecimiento e invadiendo los sitios antes colonizados por *P. infestans*. Cabe mencionar que estos tratamientos a pesar de ser los que mayor antagonismo ejercieron sobre el patógeno no presentaron diferencias significativas con los tratamientos T₈ (C9R1; Figura 5.1.3.1 C), T₇ (C10R1,2), T₁₃ (Tu2R3,2), T₁₇ (DM7), T₉ (C11R1), T₁₁ (C13R2), T₁₆ (DM19), T₄ (Agripac), T₆ (C16R2), T₁₄ (C9R3), T₃ (IQP) y T₁₂ (C-7); y si presentaron diferencias significativas con los tratamientos T₁ (C-19) y T₁₅ (Tu2R3,1) que fueron los que menor capacidad antagonista presentaron.

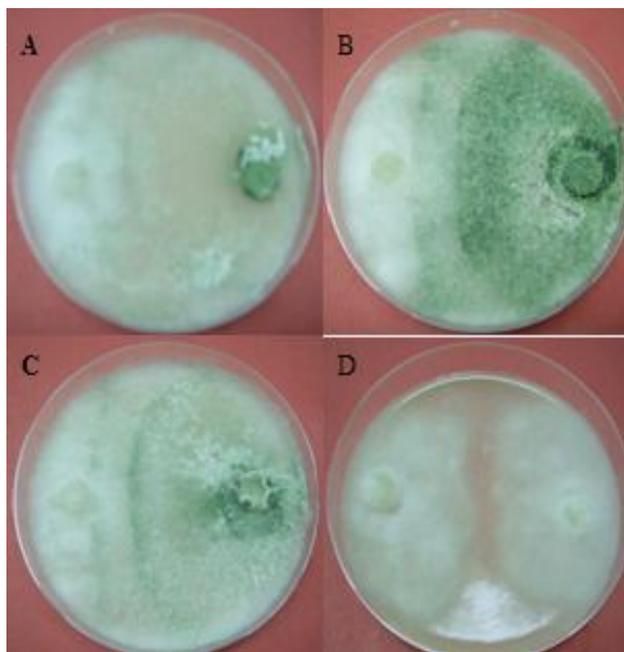


Figura 5.1.3.1. Pruebas de antagonismo *in vitro*. (A) Cepa C5R1 vs *P. infestans*. (B) Cepa C10R1,1 vs *P. Infestans*. (C) Cepa C9R1 vs *P. Infestans*. (D) Testigo.

IASA, Ecuador, 2007

Ezziyyani *et al* (2004) demostraron que *Trichoderma* spp. tiene un efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* en cultivos duales *in vitro*, sobre todo en medio PDA enriquecido con laminarina-glucosa, donde aumentó su actividad antifúngica mediante la secreción de la enzima hidrolítico (β -1,3-glucanasa), Mencionan que la intensidad de inhibición *in vitro* también varió según medio de cultivo, temperatura y pH.

Otros estudios realizados por Ochoa (2002) demostraron que las especies de *Trichoderma* spp. atacan a las hifas del hospedero por enrollamiento, engancho o aprisionando las estructuras y penetrando en la pared celular del hospedero, por secreción de enzimas líticas como proteinazas básicas, β -1,3-glucanasas y quitinasas. La actividad antifúngica de las enzimas quitinolíticas tienen un papel importante en la lisis de la pared celular de los hongos fitopatógenos.

Al analizar el crecimiento al borde de *Phytophthora infestans* bajo el efecto de los tratamientos con antagonistas se determinó que existe una interacción significativa para tratamientos x tiempo ($F_{95, 494} = 5.42$; $p < 0.0001$), lo que demuestra que el crecimiento del patógeno hacia el borde de la caja disminuyó por acción del antagonista.

De igual forma se encontró un efecto significativo para tratamientos ($F_{19, 494} = 3.86$; $p < 0.0001$) y tiempo ($F_{5, 494} = 73.22$; $p < 0.0001$). Esta diferencia entre tratamientos viene dada porque el hongo patógeno fue creciendo hacia el borde paulatinamente, sin embargo al ser invadido por el antagonista existió un decremento, dándose una variación en los tratamientos.

Al comparar el crecimiento al borde de *P. infestans* de los tratamientos se puede indicar que los tratamientos con menor desarrollo (T₁₀, T₅, T₈, T₇, T₁₃, T₁₇, T₁₆, T₄, T₆, T₁₄, T₁₂) resultan ser los mismos que demostraron una alta capacidad antagonista.

Del mismo modo al comparar el crecimiento al borde de *P. infestans* de los tratamientos en relación al tiempo se puede diferenciar dos rangos y observar que en el día 6 (a), el crecimiento hacia el borde se vuelve significativamente diferente por su reducción ante la inhibición por *Trichoderma* spp.

5.1.3.1. Relación entre la capacidad antagonista y la capacidad de crecimiento del patógeno

Para establecer la relación que existe entre las variables capacidad antagonista y capacidad de crecimiento del patógeno, se realizó una regresión polinómica de tercer grado (Figura 5.1.3), esta muestra una interacción directa entre estas dos variables.

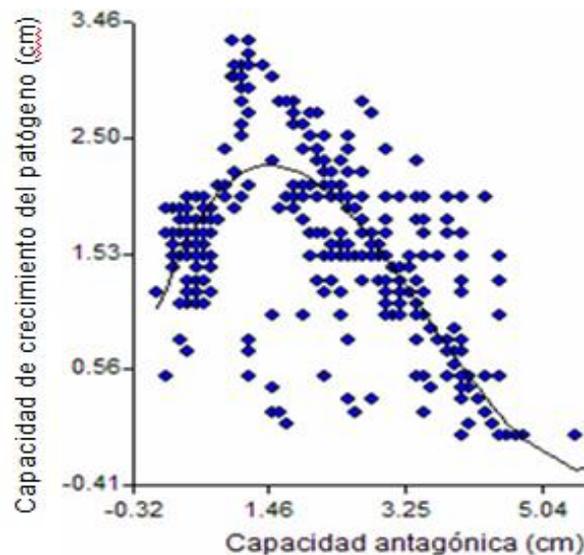


Figura 5.1.3.2. Regresión polinómica de tercer grado de la capacidad de crecimiento del patógeno en comparación con la capacidad antagonista. IASA, Ecuador, 2007.

Al realizar el análisis de regresión entre la capacidad patogénica de *P. infestans* y capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. y bajo el modelo de un polinomio de tercer grado ($CP = 1.06 + 1.78A - 0.76A^2 + 0.07A^3$; $R^2=0.73$; $p<0.0001$) se encontró que la capacidad de crecimiento del patógeno *P. infestans* esta en función de la acción antagónica que ejercieron las cepas de *Trichoderma*.

Al realizar la primera derivada de la ecuación de la regresión se encontró que el valor óptimo para la acción antagónica de las cepas de *Trichoderma*, fue cuando *P. infestans* tuvo un radio de 2.26 cm. Esto se debe a que el antagonista fue sembrado de 4 a 5 días después del patógeno, y su acción empezó 2 a 3 días después de la siembra.

$$CP = 1.06 + 1.78A - 0.76A^2 + 0.07A^3$$

$$\Delta = 1.78 - 2(0.76)A + 3(0.07)A^2$$

$$0.21A^2 - 1.52A + 1.78 = 0$$

$$A = 1.4692$$

$$CP = 1.06 + 1.78 (1.4692) - 0.76 (1.4692)^2 + 0.07 (1.4692)^3$$

$$CP = 2.26 \text{ cm.}$$

Ezziyyani *et al* (2004) demostraron que la zona de inhibición producida por *Trichoderma* spp. frente al patógeno, aumenta a medida que transcurre el tiempo. Este aumento que va acompañado de la destrucción del micelio fúngico desarrollado hasta ese momento.

5.2.FASE DE CAMPO

5.2.1. Ensayo 1

Al analizar la incidencia de *P. infestans* en las plantas de papa bajo invernadero se estableció una interacción significativa tratamiento x tiempo ($F_{126, 560} = 2.66$; $p < 0.0001$; cuadro 5.2.1.1).

Se encontró un efecto significativo para tratamientos ($F_{9, 560} = 5.17$; $p < 0.0001$) y tiempo ($F_{14, 560} = 265.1$; $p < 0.0001$). La incidencia de la enfermedad se presentó tardíamente en los tratamientos biológicos y químicos, no así en los tratamientos testigo.

Cuadro 5.2.1.1. Análisis de varianza para incidencia y severidad de *P. infestans* frente a 3 cepas de *Trichoderma* y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007

Fuente de variación	Incidencia	Severidad
Tratamiento	0.0001	<0.0001
Error A	0.1512	<0.0001
Tiempo	<0.0001	<0.0001
Tratamientos * tiempo	<0.0001	<0.0001

Probabilidad asociada a cada fuente de variación

Al comparar la incidencia de *P. infestans* en los diferentes tratamientos, se encontró que los tratamientos T₁ (C9R1+Fripapa), T₃ (C5R1+Fripapa), T₇ (T. Químico+Fripapa) y T₅ (C10R1,1+Fripapa), presentaron menor incidencia del patógeno, sin que exista diferencias significativas entre ellos. El tratamiento T₁₀ (T. absoluto+Superchola) presentó la mayor incidencia de la enfermedad significativamente diferente a los tratamientos antes mencionados (Cuadro 5.2.1.2).

Cuadro 5.2.1.2. Promedio (\pm error estándar) de incidencia y severidad de *P. infestans* frente a 3 cepas de *Trichoderma* y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007

Tratamientos	Incidencia	Severidad
T ₅ : C10R1,1+Fripapa	0.79±0.05 abc	7.92± 0.04 f
T ₃ : C5R1+Fripapa	0.77±0.05 ab	7.90± 0.04 f
T ₄ : C5R1+Superchola	0.84±0.04 c	7.78±0.05 ef
T ₁ : C9R1+Fripapa	0.76±0.05 a	7.77±0.06 ef
T ₇ : T. Químico+Fripapa	0.77±0.05 ab	7.66±0.06 de
T ₆ : C10R1,1+Superchola	0.84±0.04 c	7.56±0.07 cd
T ₉ : T. Absoluto+Fripapa	0.84±0.04 c	7.54±0.06 cd
T ₂ : C9R1+Superchola	0.83±0.04 bc	7.39±0.08 bc
T ₈ : T. Químico+Superchola	0.84±0.04 c	7.22±0.09 b
T ₁₀ : T. Absoluto+Superchola	0.91±0.03 d	6.57±0.11 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0,05$

La incidencia de la enfermedad evidenció una variación en función del tiempo, esto indicó la capacidad de los tratamientos a base de *Trichoderma* para proteger inicialmente al cultivo de la enfermedad. (Cuadro 5.2.1.3).

Cuadro 5.2.1.3. Promedio (\pm error estándar) de incidencia en relación al tiempo de *P. infestans* frente a 3 cepas de *Trichoderma* y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007

Evaluaciones	Incidencia
1	0.00±0.00 a
2	0.08±0.04 b
3	0.40±0.07 c
4	0.80±0.06 d
5	1.0±0.00 e
6	1.0±0.00 e
7	1.0±0.00 e
8	1.0±0.00 e
9	1.0±0.00 e
10	1.0±0.00 e
11	1.0±0.00 e
12	1.0±0.00 e
13	1.0±0.00 e
14	1.0±0.00 e
15	1.0±0.00 e

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0,05$

Al analizar la severidad de *P. infestans* por efecto de los tratamientos se identificó una interacción significativa para la tratamiento x tiempo ($F_{108, 442} = 2.59$; $p < 0.0001$), y se encontró un efecto significativo para tratamientos ($F_{9, 5442} = 14.48$; $p < 0.0001$). Se puede indicar que existe diferencia en la forma de actuar de cada tratamiento frente a *Phytophthora infestans*.

Al discriminar la severidad de los diferentes tratamientos mediante Duncan al 5% se destacaron con la menor severidad los tratamientos T₅ (C10R1,1+Fripapa), T₃ (C5R1+Fripapa), T₄ (C5R1+Superchola) y T₁ (C9R1+Fripapa), sin mostrar diferencia significativa entre ellos. El tratamiento T₁₀ (T. Absoluto+Superchola) presentó la mayor severidad de la enfermedad. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos T₄ (C5R1+Superchola), T₁ (C9R1+Fripapa) y T₇ (T. químico+Fripapa), demostrando la eficiencia de *Trichoderma* y corroborando la posibilidad de usar tratamientos biológicos para el control de esta enfermedad.

5.2.2. Ensayo 2

Al analizar la incidencia de *P. infestans* se estableció una interacción significativa en tratamiento x tiempo ($F_{126, 560} = 2.46$; $p < 0.0001$; Cuadro 5.2.2.1)

Cuadro 5.2.2.1. Análisis de varianza para incidencia y severidad de *P. infestans* frente a 3 cepas de *Trichoderma* y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007

Fuente de variación	Incidencia	Severidad
Tratamiento	0.0018	<0.0001
Error A	0.2182	<0.0001
Tiempo	<0.0001	<0.0001
Tratamientos * tiempo	<0.0001	<0.0001

Probabilidad asociada a cada fuente de variación

También se identificó un efecto significativo para tratamientos ($F_{9, 560} = 3.73$; $p = 0.0018$) y para tiempo ($F_{14, 560} = 221.77$; $p < 0.0001$), esto corrobora los resultados encontrados en el ensayo 1, al existir variabilidad entre tratamientos, en lo relacionado al apareamiento de la enfermedad.

Al comparar la incidencia de *P. infestans* en los diferentes tratamientos mediante la prueba de Duncan al 5%, se puede destacar que hubo un resultado similar al encontrado en el ensayo 1. Los tratamientos T₅ (C10R1,1+Fripapa), T₃ (C5R1+Fripapa), T₁ (C9R1+Fripapa) y T₄ (C5R1+Superchola) fueron los más eficientes, y no se encontró diferencias significativas entre ellos. El tratamiento T₁₀ (T. Absoluto+Superchola) presentó la mayor incidencia del patógeno, al igual que en el ensayo 1 (Cuadro 5.2.2.2).

Cuadro 5.2.2.2. Promedio (\pm error estandar) de incidencia y severidad de *P. infestans* frente a 3 cepas de *Trichoderma* y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007

Tratamientos	Incidencia	Severidad
T ₇ : T. Químico+Fripapa	0.89 \pm 0.04 bcd	7.82 \pm 0.05 e
T ₅ : C10R1,1+Fripapa	0.83 \pm 0.04 a	7.81 \pm 0.05 e
T ₁ : C9R1+Fripapa	0.84 \pm 0.04 ab	7.79 \pm 0.05 e
T ₄ : C5R1+Superchola	0.88 \pm 0.04 abcd	7.68 \pm 0.06 de
T ₃ : C5R1+Fripapa	0.83 \pm 0.04 a	7.68 \pm 0.06 de
T ₆ : C10R1,1+Superchola	0.91 \pm 0.03 cd	7.51 \pm 0.06 d
T ₉ : T. Absoluto+Fripapa	0.91 \pm 0.03 cd	7.12 \pm 0.06 c
T ₂ : C9R1+Superchola	0.85 \pm 0.04 abc	7.11 \pm 0.08 c
T ₈ : T. Químico+Superchola	0.88 \pm 0.04 abcd	6.88 \pm 0.10 b
T ₁₀ : T. Absoluto+Superchola	0.92 \pm 0.03 d	6.03 \pm 0.13 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0,05$

Al comparar la incidencia de *P. Infestans* en relación al tiempo dentro de los tratamientos se evidenció, al igual que en el ensayo 1, que la incidencia de la enfermedad aumentó en función del tiempo (Cuadro 5.2.2.3).

Cuadro 5.2.2.3. Promedio (\pm error estándar) de incidencia en relación al tiempo de *P. infestans* frente a 3 cepas de *Trichoderma* y un tratamiento químico en dos variedades de papa. Ambato, Ecuador, 2007

Evaluaciones	Incidencia
1	0.04 \pm 0.03 a
2	0.26 \pm 0.06 b
3	0.80 \pm 0.06 c
4	0.80 \pm 0.06 d
5	1.0 \pm 0.00 d
6	1.0 \pm 0.00 d
7	1.0 \pm 0.00 d
8	1.0 \pm 0.00 d
9	1.0 \pm 0.00 d
10	1.0 \pm 0.00 d
11	1.0 \pm 0.00 d
12	1.0 \pm 0.00 d
13	1.0 \pm 0.00 d
14	1.0 \pm 0.00 d
15	1.0 \pm 0.00 d

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0,05$

Al analizar la severidad de *P. infestans* en el ensayo 2 se encontró una interacción significativa para tratamientos x tiempo ($F_{115, 476} = 4.36$; $p < 0.0001$), y un efecto significativo para tratamientos ($F_{9, 476} = 12.52$; $p < 0.0001$), lo cual establece al igual que en el ensayo 1 una diferencia entre los tratamientos aplicados.

Al comparar la severidad mediante la prueba de Duncan al 5% se encontraron que los tratamientos T₇ (T. Químico+Fripapa), T₅ (C10R1,1+Fripapa), T₁ (C9R1+Fripapa), T₄ (C5R1+Superchola) y T₃ (C5R1+Fripapa) fueron los más eficientes, sin que exista diferencia significativa entre ellos.

En el ensayo 1 el tratamiento T₇ (T. Químico+Fripapa) mostró diferencias significativas con los tratamientos biológicos T₅ (C10R1,1+Fripapa) y T₃ (C5R1+Fripapa), siendo los tratamientos biológicos más eficientes que el químico. Esto no sucedió en el ensayo 2,

donde los tratamientos antes mencionados no presentaron diferencias significativas entre ellos.

La cepa C5R1 resultó ser más eficiente, presentando baja severidad en ambos ensayos al ser combinada con variedades susceptibles y resistentes de papa, lo cual demuestra la eficacia que tiene *Trichoderma* para controlar enfermedades fúngicas.

En ambos ensayos el tratamiento T₁₀ (T. Absoluto+Superchola) fue el que presentó la mayor severidad de la enfermedad.

Los resultados encontrados en ambos ensayos concuerdan con los estudios realizados por Krauss *et al.*, (2003) quienes probaron durante dos años consecutivos cepas de *Trichoderma* spp. en dos formulaciones (en agua y en 3% v/v de melaza), donde las cepas mezcladas con melaza aumentaron en un 20% las mazorcas sanas de cacao, debido a un mayor control de *Phytophthora* spp. en campo.

Ochoa (2002) que cita a Elad *et al.*, (1980) quienes utilizaron *Trichoderma harzianum* para proteger diversas plantas de hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii* y *R. solani* bajo condiciones de invernadero y en campo, logrando un 97% de reducción de la incidencia de las enfermedades en semillas de frijón y un 57% de reducción de estos patógenos en suelo infestado natural y artificialmente.

VI. CONCLUSIONES

Trichoderma spp está en la rizosfera de los cultivos de papa de las zonas muestreadas con una alta variabilidad de especies aptas para el control de *Phytophthora infestans*.

De los resultados arrojados en las pruebas de eficiencia *in vitro* las 17 cepas de *Trichoderma* demostraron, en diferente grado, capacidad de biocontrol para *P. infestans*. De estas, las cepas C5R1, C9R1 y C10R1,1 demostraron mejor capacidad antagónica.

Los mejores resultados en las pruebas de invernadero se obtuvieron al aplicar los diferentes tratamientos en plantas de papa resistentes a *P. infestans* de la variedad Friepapa, mostrando que la combinación del control biológico con la resistencia da mejores resultados para controlar este patógeno.

La aplicación de tratamientos con *Trichoderma* fueron significativamente iguales al tratamiento químico, con la variedad resiste.

De las tres cepas evaluadas, la cepa C5R1 mostró mayor eficiencia para el control de *Phytophthora infestans* en las pruebas de invernadero, al reducir la severidad de la enfermedad en variedades resistentes y susceptibles de papa.

Las cepas de *Trichoderma* se mostraron eficientes para prevención de la enfermedad, pero no para controlar el desarrollo una vez iniciado.

Todas las cepas aisladas de *Trichoderma* fueron almacenadas en refrigeración por duplicado en tubos de ensayo con PDA y aceite de vaselina con el fin de establecer un banco de microorganismos con potencial antagonista a *P. infestans*.

Después de probar diferentes técnicas de conservación, las cepas de *Trichoderma* eficientes en pruebas de campo se conservaron mediante la técnica de liofilización, ya que demostró ser la más eficiente para la conservación de *Trichoderma* por su sencillez y facilidad para reactivar los microorganismos benéficos, además esta técnica mantiene los microorganismos viables por varios años.

VII. RECOMENDACIONES

Definir la eficiencia en campo de las cepas de *Trichoderma* usadas en esta investigación para control de *Phytophthora infestans* y con respecto a las condiciones ambientales.

Las cepas C5R1, C9R1 y C10R1,1 pueden ser usadas en campo como un tratamiento preventivo dentro del manejo integrado de papa.

Las cepas de *Trichoderma* usadas en esta investigación podrían ser probadas para el control de otras enfermedades en el cultivo de papa.

Establecer el tiempo de supervivencia de las cepas de *Trichoderma* en las plantas de papa y en el campo.

Establecer las dosis efectivas de las cepas de *Trichoderma*.

VIII. RESUMEN

El hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* afecta a tallos, hojas y tubérculos de la papa, pudiendo destruir por completo el cultivo. Con el propósito de ofrecer una alternativa biológica para el manejo de este problema, se evaluaron doce cepas del hongo biocontrolador *Trichoderma* spp. Se aislaron cepas en diferentes localidades paperas de las provincias Pichincha, Carchi y Tungurahua. Se obtuvieron 17 cepas de *Trichoderma*, y en base a características morfológicas se clasificaron en las especies *Trichoderma album*, *T. lignorum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. glaucum*, *T. harzianum* y *T. koningii*. Las cepas pertenecientes a las especies *T. viride*, *T. harzianum* y *T. koningii* fueron sometidas a pruebas de antagonismo *in vitro* para el control de *Phytophthora infestans*. Las cepas C5R1 (*Trichoderma koningii*), C9R1 (*Trichoderma harzianum*) y C10R1,1 (*Trichoderma harzianum*) fueron las mejores por su eficiencia en reducir la capacidad de crecimiento de *P. infestans* en cajas de petri con medio agar arveja. El efecto antagónico de estas cepas se probó bajo condiciones de invernadero en plantas de papa sembradas en maceta, en una variedad resistente (Fripapa) y una susceptible (Superchola), además se incluyó un tratamiento químico (Mancozeb 1g l⁻¹). Los tratamientos más eficientes fueron los biológicos combinados con la variedad resistente al no presentar diferencias significativas con el químico y evidenciar la menor severidad de la enfermedad. La cepa C5R1 fue la más efectiva al presentar baja severidad de la enfermedad en ambas variedades superando incluso al tratamiento químico. Las cepas utilizadas en las pruebas *in vitro* fueron conservadas en refrigeración en tubos con PDA y aceite de vaselina; y las cepas eficientes usadas en las pruebas bajo invernadero fueron conservadas por liofilización. Así se inició un banco de microorganismos antagonistas a *P. infestans*.

IX. SUMMARY

The fitopatogeno fungus *Phytophthora infestans* affects stems, leaves and tubers of the potato. It cause able to destroy the crop completely. To offer a biological alternative for handling of this disease, twelve strain of the antagonist fungus *Trichoderma* spp. were evaluated. Fungal strains were collected from Pichincha, Carchi and Tungurahua Provinces. Seventeen *Trichoderma* strains were characterized based on the morphology and classified in the species *Trichodema album*, *T. lignorum*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. glaucum*, *T. harzianum* and *T. koningii*. The strains of the species *T. viride*, *T. harzianum* and *T. koningii* were proved antagonistic test under *in vitro* conditions, for controlling *Phytophthora infestans*. Strains C5R1 (*Trichoderma koningii*), C9R1 (*Trichoderma harzianum*) and C10R1,1 (*Trichoderma harzianum*) shown consistently reduce the growth of *P. infestans* in Petri plates with agar pea medium. The antagonistic effect was also studied under of greenhouse conditions in pots, in two potatoes varieties, one resistant (Fripapa) and another susceptible (Superchola). It was also included a chemical control (Mancoceb 1g/l). The most efficient treatments were the treatments in combination with resistant variety, because they did not presented significative differences in comparison with the chemical control. It also shown the smaller severity of the disease. Strain C5R1 was the most effective, presenting the smaller severity of the disease in both varieties, surpassing the chemical treatment. The strains used in *in vitro* tests were stored in refrigeration in tubes with APD and vaseline oil. The efficient strains used in greenhouse tests were conserved in dry freezen. This is the beginning of a antagonistic microorganisms collection bank.

X. BIBLIOGRAFÍA

Agrios G., 1995. Fitopatología. Primera edición. Editorial Limusa. Pp. 18-20, 317-323.

Ainsworth G., 1971. Dictionary of the fungi. Commonwealth Mycological Institute. Sixth edition. Pp. 653, 661-663.

Andrade N., Castro I., Carrasco J., 2004. Principales enfermedades del Cultivo de la Papa en la X^a región. Curso – Taller de capacitación para pequeños agricultores de Los Muermos. Chile.

Beltrán C., Garcés E., 2005. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn. en papa bajo condiciones de casa de malla. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Berny J., Hennebert G., 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 83: 805-815.

Chet I., Baker R., 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 70: 994-998.

Costa E., Teixidó N., Usall J., Atarés E., Viñas I., 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. Lleida - España. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 92, 873–878.

Cruickshank G., Stewart H. E., Wastie, R. L., 1982. An Illustrated Assessment Key for Foliage Blight of Potatoes. Potato Res. 25: 213-214.

Erazo S., 2001. Evaluación de la curva de crecimiento, tres portadores inertes para *Trichoderma* sp., y su comportamiento frente a ocho fungicidas y cuatro hongos fitopatógenos en laboratorio. Escuela Politécnica del Ejército. Riobamba – Ecuador.

Erwin D., Ribeiro O., 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. Minnesota. Pp. 562.

Escalante M., Farrera R., 2004. Epidemiología del tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont de Bary) de la papa en zonas productoras del estado Táchira, Venezuela. Bioagro 16(1): 47-54.

Esposito E., Da Silva M., 1998. Systematics and enviromentai application of the genus *Trichoderma*. Critical review in microbiology 24,89-98. Disponible en la Web: <http://www.controlbiologico.com/monog.trichoderma.htm>

Ezziyyani M., Pérez C., Sid A., Requena M., Candela M., 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). En la web: www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf

Falconí C., 2001. Conservación *ex situ* de microorganismos. Disponible en la página Web: http://www.comunidadandina.org/desarrollo/t3_ponencia2.htm

FAO. 2006. Revista agricultura 21. Tesoro enterrado: La papa. En la página Web: <http://www.fao.org/AG/esp/revista/0611sp1.htm>

García M., 1999. Conservación de cepas microbianas. En la página Web: <http://www.cect.org/docs/cons.doc>

Garrett K., Dendy S., 2001. Cultural practices in the potato late blight management. Pages in: Proceedings of the Internacional Workshop on Complementig Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*) in the Andes.

Gams & Bissett, Morphology and identification of Trichoderma in: Trichoderma and Gliocladium Vol 1 pp 3-31

Gilman J., 1957. A Manual of Soil Fungy, Second Edition. Pp 212-215

Girard B., Rougieux R., 1964. Técnicas de Microbiología Agrícola. Editorial Acribia. Zaragoza – España. Pp 263.

Gomero D., 2004. Efecto del hongo antagonista *Trichoderma spp.* En el control de hongos fitopatógenos en sustrato utilizado para la producción de semilla pre-básica de papa. Memorias del I Seminario Internacional y II Nacional de Control Biológico. pp 103 – 108.

Gonzalez R., 2003. Aseguramiento de la Calidad en las Colecciones de Cultivos Microbianos. Disponible en la página Web: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/colecciones-cultivos-microbianos/colecciones-cultivos-microbianos.pdf>

Jaramillo S., 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Colombia – Medellín.

Kranz J., 1994. Cap.6 La Evaluación de Enfermedades. En vigilancia y pronóstico en la protección vegetal. Pp. 61-68.

Krauss U., Hoopen M., Hidalgo E., Martínez A., Arroyo C., García J., Portugués A., Palacios M., 2003. Biocontrol of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora spp.*) in Panama with mycoparasites in two formulations. In: 4th INCOPEP Seminar Proceedings. Pp.53-58.

Loyola H., Coyote M., Ferrera R., Lara M., 2006. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Agrocienza, julio-agosto. Volumen 40. Numero 004. Texcoco-México. Pp. 491 – 499.

Mendoza A., 1998. Manejo Integrado de la ranca en el cultivo de la papa (*Phytophthora infestans* Mont de Bary). Universidad Nacional Hermilio Valdizan. Fundación para el Desarrollo Fudheval. Perú.

Mesen R., 2001. Manejo integrado del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) con extractos naturales y fungicidas químicos en el cultivo de la papa en Tierra Blanca de Cartago, Costa Rica. I Congreso de Agricultura Conservacionista. San José.

Montealegre J., 2005. Perspectivas y situación del uso de biofungicidas en Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago - Chile.
http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/1.html

Ñustez C., 1998. *Phytophthora infestans* situación en Latinoamérica. En la página Web:
<http://www.redepapa.org/patologiared.html>

Ochoa M., 2002. Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp (*Hyphomycetes*: *Hyphales*), sobre fitopatógenos del suelo. Tesis de grado para obtención del título de maestría en Ciencias en el área de biotecnología. Universidad de Colima-México. En la web:
www.digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Maria%20Elena%20Ochoa%20Moreno.pdf

Ortiz O., Thiele, G., Forbes G., 2001 Farmers' Knowledge and Practices Regarding Fungicide Use for Late Blight Control in the Andes. En la página Web:
<http://redepapa.org/hamm.pdf>

Oyarzum R., 2001. *Phytophthora infestans* Characteristics and Activity in Ecuador. En página Web: <http://gilb.cip.cgiar.org/modules.php>

Páez O., 2006. Uso Agrícola del *Trichoderma*. En la página Web: <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>

Pérez L., 2005. Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia chilena. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago-Chile. En la página Web: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/2.html

Prieto V., 2004. Control Biológico. En la página Web: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopatos/practicas/cbiologico.html>

Pumisacho M., Sherwood S., 2002. El cultivo de papa en el Ecuador. Primera Edición. Quito – Ecuador. Pp. 21-31, 42-49, 80-90.

Rodríguez V., 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del damping off en plantas de tomate. Unidad de Postgrados. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Unidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

Román M., Hurtado G., 2002. Guía Técnica del cultivo de papa. En la página Web: <http://www.redepapa.org/roman.pdf>

Samuels G.J., Chavarri P., Farr D.F., McGray E.B., (n.d.) Trichoderma Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved November 26, 2005, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescription/keys/TrichodermaIndex.cfm>

SICA – Banco Mundial. Servicio de Información Agropecuarias del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. En la página Web: www.sica.gov.ec/cadenas/papa.htm

Sly L., 1992. Maintenance and Preservation of Microbial Cultures in a Laboratory Culture Collection. NATA Technical Note #14. pp 1-16.

Smith D., 2000. Legislation Affecting the Collection, Use and Safe Handling of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB international 2000. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. (Navon, A. and Ascher, KRS. Eds). Pp. 295-314.

Smith D., Onions A., 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2nd ed. IMI Technical Handbooks No.2, pp122. Wallingford, UK: CAB international.

Solórzano A., 2002. Uso adecuado de fungicidas protectores en programas para el combate de tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de papa. I Congreso Nacional de Agricultura Conservacionista. San José Costa Rica.

Stefanova M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado M., 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. En la web: http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_5/v165z006.html

Tuite J., 1969. Plant pathology methods fungi and bacterial. Burger's publishing company. Minneapolis USA. Pp 24, 66, 193-201

Wikimedia Foundation, Inc. 2007. *Solanum tuberosum*. En la página Web: http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_tuberosum

Yandun V., 1998. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* para el control de *B. cinerea* en mora. Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniero agropecuario. Fac. de Ciencias Agropecuarias – IASA.

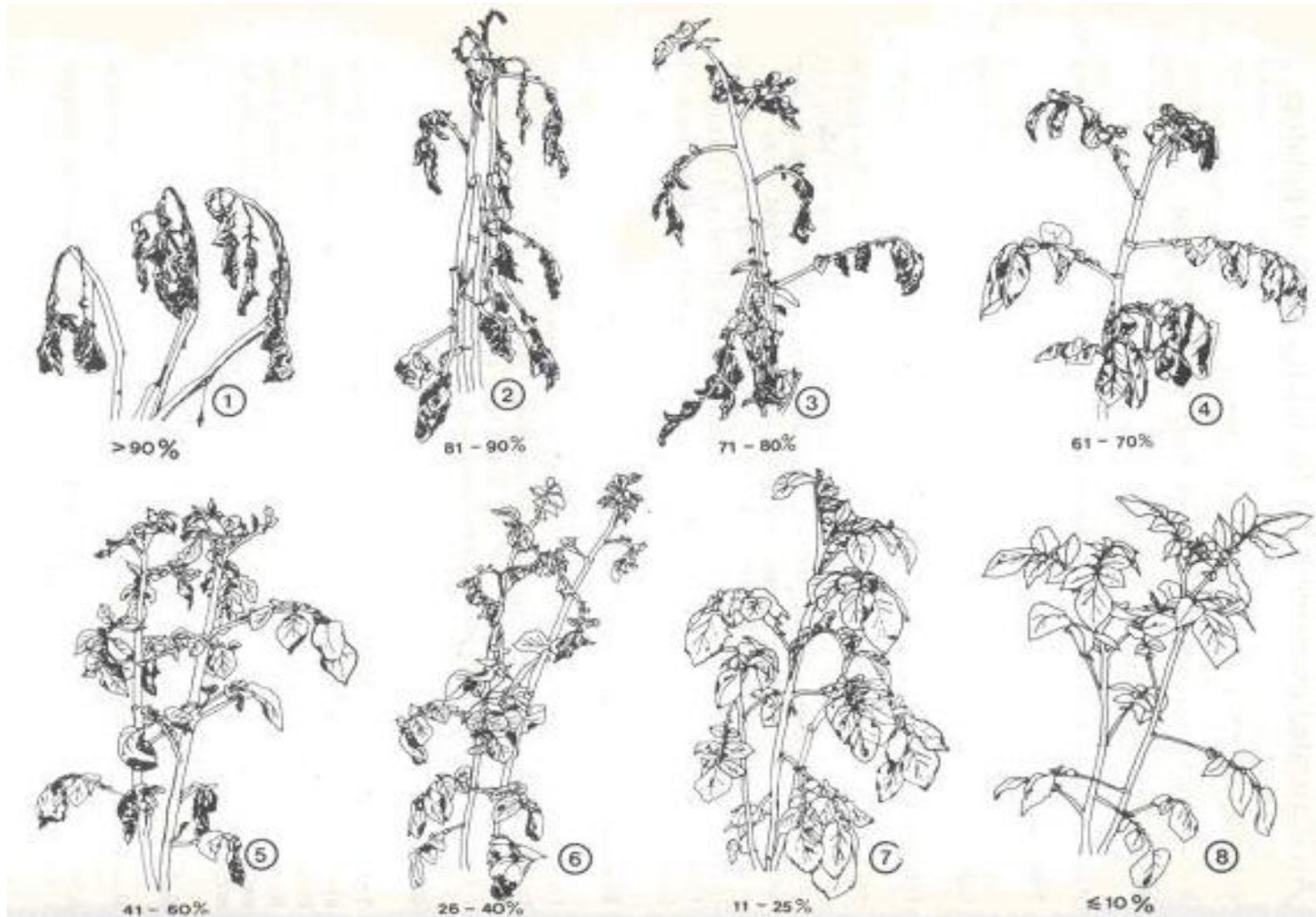
XI. ANEXOS

Anexo 1. Medios de Cultivo utilizados

MEDIO	REACTIVOS	CANTIDAD
Medio Martín	Fosfato de Potasio Sulfato de Magnesio Peptona Dextrosa Extracto de Levadura Rosa de Bengala Sulfato de Estreptomicina Agar	0.5g/l 0.5g/l 5g/l 10g/l 0.5g/l 0.05g/l 0.03g/l 18g/l
Agar Papa Dextrosa	Almidon de papa Dextrosa Agar	200g/l 20g/l 8g/l
Caldo Papa Dextrosa	Infusión de papa Dextrosa	200g/l 20g/l
Medio Agar Almidón	Peptona Extracto de Levadura Almidón Soluble Agar	5g/l 5g/l 3g/l 15g/l
Caldo Levadura – Sucrosa para incremento de biomasa por fermentación	Extracto de Levadura Sucrosa	5g/l 10g/l

Anexo 2. Toma de muestras de suelo para el aislamiento de *Trichoderma* spp.



Anexo 3. Escala de severidad propuesta por Cruickshank

Anexo 4. Cepas de *Trichoderma* liofilizadas



Anexo 5. Identificación de cepas aisladas pertenecientes al genero *Trichoderma*

Codigo de cepa	Especie
AC-7	<i>Trichoderma atroviride</i>
C-7	<i>Trichoderma harzianum</i>
DM 7	<i>Trichoderma koningii</i>
DMM 13	<i>Trichoderma koningii</i>
DMM 19	<i>Trichoderma koningii</i>
C-19	<i>Trichoderma atroviride</i>
IQP	<i>Trichoderma koningii</i>
IASA-A	<i>Trichoderma harzianum</i>
T1R3,2	<i>Trichoderma harzianum</i>
Agripac	<i>Trichoderma koningii</i>
Tu2R3,1	<i>Trichoderma koningii</i>
Tu2R3,2	<i>Trichoderma koningii</i>
C10R3	<i>Trichoderma polysporum</i>
C4R1	<i>Trichoderma atroviride</i>
C12R1,2	<i>Trichoderma atroviride</i>
Cristian	<i>Trichoderma atroviride</i>
C16R2	<i>Trichoderma harzianum</i>
C9R3	<i>Trichoderma harzianum</i>
C5R1	<i>Trichoderma koningii</i>
C11R1	<i>Trichoderma koningii</i>
C13R2	<i>Trichoderma koningii</i>
C9R2	<i>Trichoderma atroviride</i>
C10R1,2	<i>Trichoderma koningii</i>
C10R1,1	<i>Trichoderma harzianum</i>
C12R1,1	<i>Trichoderma atroviride</i>
C9R1	<i>Trichoderma harzianum</i>