

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“COMPORTAMIENTO DE *Trichoderma sp.* BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE LABORATORIO”.

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO

OSCAR ANDRÉS ACOSTA TORO

TUTOR

MG. ING. MARCO PÉREZ

CEVALLOS, 29 DE OCTUBRE DEL 2015

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El suscrito, OSCAR ANDRÉS ACOSTA TORO, portador de cédula identidad número: 180422730-2, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “COMPORTAMIENTO DE *Trichoderma sp.* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LABORATORIO”. Es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

OSCAR ANDRÉS ACOSTA TORO

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “COMPORTAMIENTO DE *Trichoderma sp.* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LABORATORIO” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

OSCAR ANDRÉS ACOSTA TORO

COMPORTAMIENTO DE *Trichoderma sp.* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE LABORATORIO”

AUTOR: OSCAR ANDRÉS ACOSTA TORO

Ing. Mg. Marco Pérez

TUTOR

Ing. Mg. Eduardo Cruz

BIOMETRISTA

Ing. Mg. Manolo Muñoz

REDACCIÓN TÉCNICA

Aprobado y revisado por los miembros del tribunal:

FECHA

Ing. Mg. Hernán Zurita

Ing. Mg. Eduardo Cruz

Ing. Mg. Juan Carlos Aldás

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme y darme su bendición para poder alcanzar y concluir esta meta con gran éxito.

A mi Padre Oscar que desde el cielo me ha dado su bendición, me a guido por el camino correcto y me ayudado a tomar las decisiones acertadas para poder cumplir este sueño.

A mi Madre Olga ejemplo de lucha y valor, que me ha brindado su apoyo, comprensión y amor, en los momentos difíciles, pilar de mi vida que me enseñó valores éticos, morales y espirituales. Me ha enseñado mis principios, mi carácter, a perseverar hasta alcanzar mis objetivos deseados.

Mi hermana María Elisa que me ha brindado su apoyo, sus consejos, y confianza en todas las cosas que eh realizado.

A Vanessa Frutos por ser esa persona incondicional que me ha dado su amor y comprensión, mi acompañante, mi apoyo, confidente, mi mejor amiga en este camino recorrido.

A mi sobrina Amaru que llego a cambiarme la vida y llenarla de felicidad.

A mis compañeros de carrera que con ellos vivimos la universidad de una manera divertida y de los cuales guardo gratos recuerdos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica quien me acogió en sus aulas, en donde adquirí todos mis conocimientos y experiencia para alcanzar mi meta.

A los profesores de la Facultad que me han brindado su conocimiento para crecer profesionalmente y poder completar mi investigación.

De manera especial a los tres Ingenieros Tutores de la tesis: Ing. Agr. Mg. Eduardo Cruz, Ing. Agr. Mg. Marco Pérez y al Ing. Mg. Manolo Muñoz, que con sus conocimientos ayudaron y orientaron y permitieron llevar con éxito esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	7
• Variable Independiente: Medios de cultivo	7
• Variable Dependiente: <i>Trichoderma spp.</i>	8
Unidad formadora de colonias (UFC).....	11
CAPÍTULO III.....	12
3.1. HIPÓTESIS.....	12
3.2. OBJETIVOS	12
3.2.1. Objetivo general.....	12
3.2.2. Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO IV.....	13
4.1. Ubicación del ensayo	13
4.2. Características del lugar	13
4.3. Equipos y Materiales.....	14
4.3.1. Equipos.....	14
4.3.2. Materiales	14
4.4. Factores en estudio.....	14
4.5. Tratamientos	15
4.6. Diseño experimental	15
4.7. Variable respuesta.....	16
4.8. Procesamiento de la información	21
CAPÍTULO V	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CAPÍTULO VI.....	30
6.1. CONCLUSIONES	30
6.2. BIBLIOGRAFÍA	31
6.3. ANEXOS	34
CAPÍTULO VII	49

7.1. DATOS INFORMATIVOS	49
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	49
7.3. JUSTIFICACIÓN	50
7.4. OBJETIVOS	50
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	50
7.6. FUNDAMENTACIÓN	51
7.7. METODOLOGÍA	51
7.8. ADMINISTRACIÓN	52
Se trabajará con los productores bajo el asesoramiento del investigador y la colaboración de la Universidad Técnica de Ambato	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones climáticas durante la investigación	13
Tabla 2. Diseño experimental	15
Tabla 3. Composición medio de cultivo Agar-Papa-Dextrosa	19
Tabla 4. Composición medio de cultivo solución Murashige & Skoog	20
Tabla 5. Composición medio de cultivo Czapek	20
Tabla 6. ÁREA DE DESARROLLO DEL HONGO.....	22

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Coloración de <i>Trichoderma minutisporum</i>	25
Figura 2. Coloración de <i>Trichoderma harzianum</i>	25
Figura 3. Diferencia de desarrollo de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma minutisporum</i> en el transcurso de 5 días	26
Figura 4. Colonias de <i>Trichoderma harzianum</i> en dilución 10 ⁻⁵	27
Figura 5. Colonias de <i>Trichoderma minutisporum</i> en dilución 10 ⁻⁶	27
Figura 6. Velocidad de desarrollo de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma minutisporium</i> con una temperatura de 13.4 °C.....	28
Figura 7. Velocidad de desarrollo en cm ² de <i>Trichoderma harzianium</i> y <i>Trichoderma minutisporium</i> a temperatura de 27°C.....	29

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el propósito de determinar el comportamiento de *Trichoderma sp* a nivel de laboratorio, mediante la recolección, identificación, aislamiento y purificación a diferentes condiciones de temperatura y medios de cultivo utilizados como sustratos para su desarrollo y desarrollo. Este ensayo se realizó en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato.

Se empleó el diseño experimental de bloques al azar con agregado factorial (2x3x2), encontrándose dos tipos de variedad o variedades de *Trichoderma*: *Harzianum* y *Minutisporium*, los cuales fueron expuestos a tres medios de cultivo como agar-papa-dextrosa (APD), Murashige & Skoog y Czapek, y a dos temperaturas de 13,5 °C y 27 °C, esto por tres repeticiones. Se efectuó el análisis de varianza (ADEVA) con las respectivas pruebas de significancia de Tukey al 5 % para determinar el mejor tratamiento de la investigación.

Los mejores resultados se obtuvieron a los 5 días desde la siembra de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporium*, en el medio Czapeck debido a su gran contenido nutricional que facilitó el desarrollo del micelio del hongo y la proliferación de esporas a una temperatura constante de 27 °C. En lo que respecta al desarrollo del área tenemos que tiene un desarrollo de 6.79 cm² por día.

Las especies caracterizadas durante esta investigación traerán grandes beneficios para el agricultor ya que demuestran acción antagonica de hongos fitopatógenos que habitan el suelo y traen graves pérdidas en los cultivos. Es por esto que mediante la presente investigación se establece un manual para la producción artesanal de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporium*, apto para el uso agrícola de una manera sencilla, económica y eficiente.

Palabras claves: *Trichoderma*, cepas nativas, unidades formadoras de colonias, medios de cultivo.

SUMMARY

This research was conducted in order to determine the behavior of *Trichoderma* sp at laboratory level, through the collection, identification, isolation and purification to different conditions of temperature and culture media used as substrates for growth and development. This test was conducted in the laboratory of Plant Protection of the Faculty of Agricultural Sciences, Technical University of Ambato,

the experimental design of randomized blocks with factorial added (2x3x2), being two types of races or strains of *Trichoderma* was used: *harzianum* and *Minutisporium*, which were exposed to three media such as agar-potato-dextrose culture (APD), Murashige & Skoog and Czapek, and two temperatures of 13.5 °C and 27 °C, this three replications. Later analysis of variance (ANOVA) with the respective tests of significance of 5% Tukey was performed to determine the best treatment research.

The best results were obtained at 5 days after sowing of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma minutisporium*, middle Czapeck because of its high nutritional content that facilitated the development of fungus mycelium and proliferation of spores at a constant temperature of 27 °C. Regarding the growth area having a development we 6.82 cm² per day.

Characterized species during this investigation bring great benefits to farmers as they demonstrate antagonistic action of plant pathogenic fungi living in the soil and bring serious crop losses. That is why this research through a manual for the artisan production of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma minutisporium*, suitable for agricultural use of a simple, economical and efficient way estabecer.

Keywords: *Trichoderma*, native strains, colony forming units culture media.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Hoyos, Chaparro, Abramsky & Chet (2008), dan a conocer que el *Trichoderma spp* 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, distribuido ampliamente alrededor del mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confieren a *Trichoderma spp* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos.

Por otra parte el uso de *Trichoderma* representa una alternativa viable que debe ser evaluada dada sus características de biocontrolador eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en varios cultivos. De esta forma se requiere realizar investigaciones de la presencia y diversidad de cepas nativas con el propósito de evaluarles como potenciales agentes de control biológico. Las especies de *Trichoderma* muestran gran capacidad para el control de fitopatógenos ejerciendo un efecto antagónico, debido a su ubicuidad, su facilidad para ser aisladas y cultivadas, su desarrollo rápido en un gran número de sustratos ya que no atacan a plantas superiores. (Cobos, 2010)

El principal beneficio para la agricultura es el antagonismo con microorganismos patógenos de las plantas, por su capacidad de producir secreciones tóxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en los hongos fitopatógenos que habitan en el suelo (micoparasitismo), en la degradación de paredes celulares de las hifas de hongos patógenos (depredación), en la producción de químicos volátiles antibióticos antifungales que inhiben basidiomicetos (amensalismo) en la competencia por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido desarrollo. (Vallejo, 2014)

Es por esto que la necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad del campo ha impulsado la búsqueda de estrategias de control de enfermedades agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico y que además implique bajar el riesgo ambiental y sanitario sin afectar la salud del ser humano. En el suelo existen una gran cantidad de microorganismos benéficos y entre estos están los hongos más utilizados *Trichoderma spp.* Por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, es importante destacar que en el mercado mundial ya se cuenta con formulados comerciales de *Trichoderma spp.* para el control de diferentes hongos fitopatógenos, principalmente de suelo. Sin embargo, estos formulados no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas debido a las diversas condiciones ambientales por lo que su efectividad puede aumentar o disminuir, por lo que es necesario tener investigaciones propias de este microorganismo de cada una de las zonas agroecológicas. (Falconi, 2010)

La presencia de *Trichoderma spp.*, en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales y de su plasticidad ecológica. La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentra, la alta velocidad de desarrollo que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en bloquear el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista. (Vallejo, 2014)

CAPÍTULO II

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Vallejo (2014), menciona en su trabajo de investigación de “caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal” donde recolecta, aísla, selecciona, identifica y caracteriza morfológica y molecularmente las cepas nativas de *Trichoderma sp.* que:

- El mejor sustrato para la captura de colonias de *Trichoderma* nativo fue la trampa nutricional de quinua en las tres localidades evaluadas; debido a su alto contenido de proteína lo que demostró la preferencia nutricional.
- La tasa de desarrollo diario por localidad y por sustrato se obtuvieron en los tratamientos en Guaranda con el sustrato de cebada con un promedio de 25.117 mm de TCD, en San Miguel con el sustrato de arroz con un promedio de 24.828 mm de TCD y en Chillanes con el sustrato de arroz con un promedio de 24.171 mm de TCD.
- En los tres medios de cultivo evaluados se lograron caracterizar la morfología como conidios, fialides, conidiosporas e hifas vistas al microscopio compuesto y por observación directa se logró describir su desarrollo, color y olor presentados en cada medio.

Cobos (2010), en su trabajo de investigación titulado “Evaluación de Cepas Nativas de *Trichoderma sp.* para el control de Sigatoka Negra (*Paracercospora fijiensis m.*) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio” obtiene los siguientes resultados: Mediante técnicas de caracterización molecular se determinó que las cepas recolectadas en las localidades bananeras de Machala y Bonanza pertenecen al grupo de *Trichoderma asperellum* y la cepa recolectada en la localidad bananera de Paisaje corresponden al grupo de *Trichoderma viride*. Este estudio es una fase preliminar de investigación que servirá para finalmente poder formular un biofungicida que permita controlar los agentes fitopatógenos que disminuyen la productividad de varios cultivos de interés económico para el país.

Guigón & González (2004), al aislar la especie de *Trichoderma* obtenidas en México de plantas y árboles como: nogal, menta, chile jalapeño y durazno, se logró controlar

Phytophthora capsici, donde por medios de cultivo in vitro con las especies de durazno, menta y chile jalapeño y su alta actividad parasitaria del *Trichoderma* el desarrollo de la enfermedad no presentó datos significativos, por lo contrario las especies expuestas al cultivo bajo invernadero como: chile jalapeño y durazno redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad debido a que es un biocontrolador y biofertilizante natural que incrementa tamaño del tallo, abundante área foliar, tallos más robustos y biomasa de la raíz.

Mejía, Valero, & Cubillos (2009), en su trabajo de investigación de “*Trichoderma harzianum* como promotor del desarrollo vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener)” Obtuvo los siguientes resultados: Al aplicar cepas de *Trichoderma* nativas como, TCN-014 y TCC-005 para la germinación de semillas de maracuyá, en donde los datos de la aplicación de *Trichoderma* los datos fueron significativos ya que estimularon la germinación y desarrollo de las plántulas de maracuyá, debido a esto el *Trichoderma* se le considera como bioproducto útil para el manejo ecológico.

Por otra parte Vallejo (2014), en la investigación de caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal realizado en la provincia de Bolívar, cantón Guaranda, se evaluó tres sustratos; arroz, cebada y quinua, tres medios de cultivo; Trigo Dextrosa Agar (TDA), Maíz Dextrosa Agar (MDA), Papa Dextrosa Agar (PDA), se obtuvo como resultado la mejor trampa nutricional elaborada a base de sustrato de quinua para *Trichoderma*. En los tres medios se logró caracterizar la morfología de *Trichoderma*: en Chillanes se caracterizó tres especies; *Trichoderma*, *Viride* y *Trichoderma Harzianum* y *Trichoderma* spp esta última aún no está determinada en las claves taxonómicas. Las especies caracterizadas durante este proceso de investigación demuestran su acción de agentes antagónicos de hongos fitopatógenos que habitan el suelo (micoparasitismo).

Lorenzo (2004), en su trabajo de investigación de “Prospección de hongos antagonistas en la provincia de cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas Nativas de *Trichoderma* spp.” Obtuvo los siguientes

resultados: se aislaron diferentes variedades de *Trichoderma spp.* Para el control de las enfermedades de cítricos para el control de *alternaria citri*. Y *Colletotrichum gloeosporioides* Observándose especies de *Trichoderma* como *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* *Trichoderma harzianum* Rifai Sección *Longibrachiatum*. y el género *Aspergillus*. Para el control *C. gloeosporioides* el *Trichoderma viride* presentó un antagonismo significativo en referencia a las demás variedades. Para el control de *alternaria citri* la variedad de *Trichoderma harzianum* fue la que mayor significación presentó.

Sandoval & Noelting (2011), en su trabajo de investigación de “Producción de conidios de *Trichoderma harzianum rifai* en dos medios de multiplicación” obtuvo los siguientes resultados: que el *Trichoderma* fue pre cultivado en APD después se los inocularon en un medio líquido y un medio semisólido, entre estos una diferencia de producción de conidios, ya que en el líquido existió mayor proliferación de conidios con referencia al semilíquido, la producción de *Trichoderma* es muy importante ya que ayuda en control de patógenos de la raíz y órganos adultos de la planta.

Gato & Rodríguez (2010), en su trabajo de investigación de “Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum rifai*” obtuvo los siguientes resultados: la conservación de *Trichoderma* por un año en un medio de cultivo compuesto por sílica gel, agua destilada estéril y una capa de aceite mineral, lo cual después de tres meses el *Trichoderma* perdió su viabilidad y sus propiedades morfológicas.

Por otra parte en la investigación “Inhibición *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22” se obtuvieron los siguientes resultados: se aislaron 14 cepas de *Trichoderma* nativo de la caña de azúcar para comparar con el *Trichoderma* comercial, los *Trichoderma* nativos al momento del cultivo *in vitro* el desarrollo micelial fue mejor con el estrés hídrico ya que su desarrollo radial fue mejor y que se los puede probar a nivel de invernadero (Ortiz, Hernández, Cruz, Figueroa, Figueroa, Hernández, 2013)

Rodriguez, Martínez, Michelena, & Agenor (2015), en su trabajo de investigación “Fermentación en estado sólido de *Trichoderma harzianum* bajo campos magnéticos” obtuvo como resultados: que la aplicación de bagazo de caña y cabecilla de arroz ayuda a la fermentación y aumento de los campos magnéticos estáticos, esto ayuda al aumento del 50% de producción de esporas del hongo, pero el proceso de columnas utilizado provoco una disminución del 51.26% de la producción de esporas del hongo, por este motivo no se recomienda utilizar este método para el aumento de la producción de esporas del hongo.

Sandoval, López, Bonilla, & Oliva, (2003), al investigar *Trichoderma harzianum* y la combinación de la solarización en el clavel (*dianthus barbatus*) como biocontrol de hongos del suelo obtuvieron que antes de realizar la siembra o trasplante de las estacas realizaron solarización y la aplicación del *Trichoderma* para el control de enfermedades como *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en el cultivo de clavel, indicaron que estos hongos provocan el de secamiento y marchitez de la planta, y al aplicar este método después de 15 días, obtuvo una mejora ya que el porcentaje de plantas enfermas disminuyó en un 54,8% obteniendo datos significativos por eso este método se recomienda como un biocontrol para el cultivo de clavel.

Argumedo, Alarcón, Ferrera, & Peña (2009), mencionan que la utilización de *Trichoderma* para la descontaminación de origen orgánico e inorgánico, el *Trichoderma a* ayuda al control de compuesto como pentacloronitrobenceno y pentaclorofenol, pero no degradan al hexaclorociclohexano que son de origen orgánico y con los metales pesados tiene la facilidad de metabolizar cianuro rodanasa y cianuro hidratasa a través de la enzima β -cianoalanina sintetasa, el género *Trichoderma* como biorremediador en la destoxicación de contaminantes orgánicos e inorgánicos tanto en el suelo como en el agua.

Gilchrist, Jaramillo, & Reynaldi (2009), mencionan que la aplicación de *Trichoderma asperellum* para el control de *Spogosporas subterranea f. sp.* en el

cultivo de *Solanum*. la influencia sobre sarna polvosa de cuatro aislamiento de *Trichoderma asperellum* en tres tipos de suelos, Andisoles, Entisoles e Inceptisoles, no existió diferencia significativa entre las plantas tratadas y las plantas no tratadas, en los tipos de suelo las plantas presentaron una reducción en el desarrollo de 41, 32 y 28 % por lo que se necesita la aplicación de otros métodos para el control de la sarna polvosa.

Las variedades de *Trichoderma* aisladas de los sectores de Portuguesa y Yaracuy para el control de *Rhizoctonia solani*, en el desarrollo radicular y desarrollo de las plantas de maíz, en el sustrato se colocaron conidios de *Trichoderma*, después se colocó las semillas de maíz y luego conidios de *Rhizoctonia solani*, luego de 60 se comparó el tratamiento con el testigo, teniendo resultados significativos las plantas no tratadas tuvieron un problema del 80%, en comparación con las que tenían *Trichoderma* presentaron solo un 16,2% de plantas afectadas, las mejores sepas para el control de la enfermedades fueron de la localidad de Portuguesa. (López, Pineda, Alexander Hernández, & Ulacio, 2010)

2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

- **Variable Independiente: Medios de cultivo**

Un microorganismo necesita para su desarrollo y desarrollo nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico.

Brock (2005), indica que la elaboración de medios de cultivo requiere proporcionar los elementos antes citados en una forma asimilable. Así, por ejemplo, el C debe estar en forma de carbono orgánico para los heterótrofos y como CO₂ para los autótrofos, el N en forma de NH₄, de NO₃ - o de NO₂ - o en forma de aminoácidos a

los que se pueda tomar su grupo amino. Además, en ciertos casos, es necesario añadir a los medios de cultivo algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar y son útiles para su desarrollo.

Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*, *Trichoderma* y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprófitos crecen muy bien y esporulan en este medio. (Cadeño & Ames, 2004)

Medio Murashige & Skoog

El medio MS, es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y puede ser suplementado con algún regulador de desarrollo y ocasionalmente con otras sustancias varias. (Cadeño & Ames, 2004)

Medio Czapek

Czapek es un medio semisintético utilizado para el cultivo de hongos, que contiene nitrato de sodio como la única fuente de nitrógeno. Este medio tiene una composición química definida. Es recomendado para el aislamiento de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* y algunos otros hongos con requisitos fisiológicos similares. (Media Laboratories, 2015)

- **Variable Dependiente:** *Trichoderma spp.*

Sivila & Jujuy (2013), mencionan que el género *Trichoderma* fue identificado en 1871 y ha sido ampliamente estudiado, se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas. Lo podemos encontrar en diferentes zonas y hábitats,

por lo que constituye un grupo de microorganismos cosmopolitas, de tipo filamentoso pertenecientes a la siguiente clasificación taxonómica descrita por Rifai (1996):

Reino	: Mycetae (hongos verdaderos)
División	: Eumycota
Subdivisión	: Deuteromycotina
Clase	: Hyphomycetes
Orden	: Hyphales (Moniliales)
Familia	: Moniliaceae.
Género	: <i>Trichoderma</i>

Características:

Uno de los organismos biocontroladores más exitosos para el control de enfermedades producidas por patógenos del suelo ha sido el hongo micoparasito *Trichoderma spp.*, por lo que Sivila & Jujuy (2013), dan a conocer las características más importantes de este hongo:

- Se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas.
- Lo podemos encontrar en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos.
- Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente.
- *Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo.
- La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, después se torna a verde oscuro o amarillento, como consecuencia de una densa esporulación.
- *Trichoderma*, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas “conidias”.
- Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. *Trichoderma*, es el principal producto a obtener en la producción comercial y/o artesanal.

- Es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su desarrollo gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras).
- *Trichoderma* es un hongo con una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, presentando una amplia distribución ecológica.
- Los valores óptimos para su desarrollo y esporulación oscilan alrededor de los 25°C. Un factor importante a tener en cuenta durante la multiplicación es la conveniencia de periodos alternados de luz y oscuridad, que favorecen la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos.

Mecanismos de acción:

Perdomo (1995), señala que los mecanismos de biocontrol que utiliza el hongo está todavía por elucidar, pero fruto de numerosas investigaciones llevadas a cabo con cepas de este género, se obtienen las siguientes aproximaciones:

- El micoparasitismo se considera como un atributo de todas las especies de *Trichoderma* spp., y el mejor mecanismo de control biológico de distintas enfermedades fúngicas.
- En 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.
- 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 desarrollo de las raíces que se genera por la secreción de fitohormonas, existe una mejora en la tolerancia al estrés hídrico.
- En algunos casos se especula la capacidad de solubilización de algunos nutrientes minerales como zinc o fósforo, escasamente solubles o insolubles.

Ventajas en la aplicación de *Trichoderma* para el control de enfermedades:

- *Trichoderma* estimula el desarrollo de los cultivos porque posee metabolitos que promueven los procesos de desarrollo en las plantas.
- Preservación del medio ambiente al disminuir el uso de fungicidas químicos.
- Regula patógenos de la raíz (*Phyitium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*) y del follaje (*Botritis* y *Mildew*) antes que puedan generar daños significativos.
- Se propaga en el suelo, aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos (Sivila & Jujuy, 2013).

Unidad formadora de colonias (UFC)

Velásquez et al., (2009), considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo.

• Unidad de análisis: Condiciones de la laboratorio

Para el desarrollo óptimo de hongos es muy importante controlar diferentes condiciones las más importante son la Temperatura y Humedad en la laboratorio, ya que se puede, aumentar o disminuir la velocidad de reproducción, conservar por mayor tiempos las cepas de los hongos, como menciona Rodríguez & Gato (2010), que en el medio de cultivo agar papa dextrosa a una temperatura de 4°C el *Trichoderma harzianum* Rifai se puede conservar por tres meses, manteniendo viable así sus cepas para la reproducción o proliferación para futuros ensayos.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Los medios de cultivo utilizados a nivel de laboratorio influyen en el desarrollo del *Trichoderma sp.*

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

- Determinar el comportamiento de *Trichoderma sp.* a diferentes condiciones a nivel de laboratorio.

3.2.2. Objetivos específicos

- Aplicar técnica artesanal para la recolección, identificación, aislamiento y purificación de *Trichoderma sp.*
- Aplicar diferentes medios de cultivo y temperaturas para el desarrollo de *Trichoderma sp.* a nivel de laboratorio.
- Caracterizar el desarrollo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporum* en diferentes medios de cultivo y temperatura
- Elaborar un protocolo adecuado para la obtención de cepas de *Trichoderma sp.* a nivel de laboratorio.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del ensayo

El presente trabajo experimental se efectuó en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, Caserío Tambo la Universidad, en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato; a 2868 msnm; en las coordenadas 12° 21' 00" S - 78° 37' 00" W

4.2. Características del lugar

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Vegetal, ubicado en los predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Las características correspondientes al clima durante los meses de Octubre y Noviembre fueron recopilados en la estación meteorológica de Querochaca, los mismos que se presentan a continuación.

Tabla 1. Condiciones climáticas durante la investigación

Meses	AMBIENTE		LABORATORIO	
	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Temperatura (°C)	Humedad (%)
Octubre	13,6	51	12,8	60
Noviembre	14,5	60	13,5	72

4.3. Equipos y Materiales

4.3.1. Equipos

- Incubadora
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Agitador magnético
- Refrigeradora
- Cocineta

4.3.2. Materiales

- Vidriería
- Lámpara de alcohol
- Agar
- Sacarosa
- Papas
- Agua destilada
- Solución Murishage y Skoog
- Nitrato de Sodio (KNO_3)
- Fosfato bipotásico (K_2HPO_4)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Sulfato de magnesio (MgSO_4)
- Sulfato de hierro (FeSO_4)

4.4. Factores en estudio

Mediante la presente investigación los factores en estudio fueron:

- Medios de cultivo (M)
- Temperatura (T)
- Variedad (P)

4.5. Tratamientos

- Variedades capturadas: Predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. (P1 – P2)
- Medios de Cultivos: Agar Papa Dextrosa (M1), Solución Murishage & Skoog (M2) y Medio Czapek. (M3)
- Temperatura: 27⁰C (T2) y temperatura ambiente. (T1)

4.6. Diseño experimental

Se utilizó el diseño de bloques al azar con agregado factorial (2x3x2), utilizando dos muestras de *Trichoderma sp.*, con tres medios de cultivo y expuestos a dos temperaturas, esto por 3 repeticiones.

Tabla 2. Diseño experimental

P1	<i>Trichoderma minutisporium</i>
P2	<i>Trichoderma harzianum</i>
M1	Medio de Cultivo Agar Papa Dextrosa (APD)
M2	Medio de cultivo Murashige & Skoog
M3	Medio de Cultivo Czapek
T1	13,5°C
T2	27°C

4.7. Variable respuesta

Desarrollo del hongo

El área de desarrollo se obtuvo al medir la longitud X y Y de la muestra que se encuentra en la caja petri, el mismo valor se expresó en cm^2 , los datos se tomaron en un lapso de 24 horas por 5 días.

Color de la colonia

La coloración del hongo va a depender del estado de maduración que se encuentre, los datos se tomaron cada 24 horas en donde se pudo observar como el color se modificando dependiendo el estado de maduración utilizando la tabla de colores como menciona Falconi (2010), que el hongo al inicio tiene una coloración blanca la tonalidad varía dependiendo del estado de maduración que se encuentra, *Trichoderma harzianum* al final de su maduración tiene una coloración verde oscura, *Trichoderma minutisporium* cuando se encuentra en su maduración total amarillo gris.

Velocidad de Desarrollo

La velocidad de desarrollo del hongo depende los nutrientes disponibles y a la temperatura que se encuentran expuestos para que este sea mayor o menor como mencionan Infante, Martínez, Gonzales & Reyes (2009), la mayoría de *Trichoderma* son resistentes a condiciones adversas, para tener un 75% de germinación de las clamidiosporas necesita condiciones óptimas una humedad del 80% y temperatura de 27°C para así aumentar su velocidad de desarrollo del área del hongo. Se utilizo el método del plano cartesiano, tomando medidas de X y Y y calculando el área en cuadrantes

UFC

Para el conteo de Unidades Formadoras de Colonias se utilizó el método de diluciones en donde observamos la cantidad de colonias que existe por ml como menciona Camacho, Giles, Ortegón, Palao, Serrano & Velázquez.(2009) para la preparación de diluciones:

- Preparación de la dilución primaria:

- Muestras líquidas no viscosas (como agua, leche, refrescos, etc. en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos como agitación)
- Agitar la muestra manualmente en un arco de 30 cm, con 25 movimientos de arriba abajo, efectuados en un tiempo de 7 segundos.
- En condiciones asépticas, tomar 10.0 ml de la muestra
- Diluir con 90.0 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales consistió en:

- Transferir 1.0 ml de la dilución primaria, a otro recipiente aforado con nueve volúmenes del diluyente estéril a la temperatura de 16°C, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente, obteniéndose una dilución 1:10.
- Mezclar cuidadosamente cada nueva dilución, siempre de la misma manera que se describe en el paso anterior.
- Seleccionar las diluciones a preparar, así como aquellas que se van a inocular, en base al número de microorganismos de la muestra, en ausencia total de información, se trabajó con las diluciones de la primera a la sexta.
- Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas seleccionadas. El volumen transferido fue menor 10% de la capacidad total de la pipeta.
- Prevenir la contaminación, mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta se apoyó en el interior del cuello del frasco y se mantuvo en posición vertical, para lo cual este último se inclinó lo necesario.

Manejo del experimento

Capturas de Microorganismos

Se realizó mediante el procedimiento que se describe a continuación

- Se colocó 4 onzas de arroz cocinado sin sal en una tarrina, luego se mezcló con melaza, en relación 3 a 1
- Se tapó la boca de la tarrina con un pedazo de nylon y se aseguró bien con ligas de plástico.

- Se eligió los sitios donde realizar las capturas, las mismas que fueron en el bosque cercano a los predios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el camino vía a la cascada de Jun-Jun y la parte posterior de la clínica Veterinaria.
- Se enterró las tarrinas en el sitio antes indicado, un total de 4, con el fin de obtener una muestra significativa, a 10 cm de profundidad de la superficie del suelo
- Se recolectó las tarrinas después de 2 semanas y tomar el arroz en el cual estuvo impregnado de microorganismos (EMAs).

Caracterización de las cepas

Para la caracterización de las cepas se procedió a observar en el microscopio optimus las diferentes estructuras de los hongos encontrados en los EMAs, se empleó el Manual de caracterización de cepas de *Trichoderma* propuesto por Falconí (2010), se tomó en cuenta la forma de desarrollo de la colonia, como la formación de la integralidad del sistema de desarrollo, traducido en la biomasa total de la colonia, como resultado del comportamiento que tiene el hongo en los diferentes medios de cultivo empleados, con este propósito se preparó una placa con muestra del hongo, una gota de agua destilada y se colocó el cubreobjetos, se observó con los lentes 4x – 10x -40x.

Técnicas de Aislamiento

En general las especies del genero *Trichoderma* son fáciles de aislar, de los más diversos escenarios ecológicos del planeta. Se procedió como señala Falconí (2010), para el aislamiento se realizaron varias siembras en el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) hasta obtener el *Trichoderma* puro y no exista contaminación con otro microorganismo, se obtuvo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporium*.

Siembra de microorganismos en medios sólidos

Para la siembra de microorganismos en el laboratorio de Sanidad Vegetal, se utilizó la guía de prácticas de Microbiología (2015), en donde se realizaron los siguientes pasos:

- Se desinfectó la cámara de flujo laminar y todos los utensilios a utilizarse en el proceso.
- En el interior de la cámara de aislamiento previamente desinfectada, con ayuda del mechero se flameó la asa.
- Con la misma se tomó una muestra de la tarrina, observando los signos presentes, los mismos que indican la presencia de microorganismos.
- Rápidamente se abrió la caja petri esterilizada y se pinchó el asa con muestra de los microorganismos, en el centro de la caja Petri.
- Se identificaron las muestras (fecha y material).
- Se incubaron las cajas inoculados a temperatura de 25 y 37 grados centígrados, en la incubadora marca

Elaboración de Medios de Cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo sometidos al proceso de investigación se utilizaron diferentes cantidades y materiales, siguiendo los pasos descritos en el manual de Microbiología (2015) del Laboratorio de Sanidad Vegetal, los cuales se señalan en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 3. Composición medio de cultivo Agar-Papa-Dextrosa

Materiales	Componente	Cantidad
Papas Crudas		200 g
Agua destilada		500 ml
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20 g
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	15 g

Procedimiento:

Los pasos seguidos para la elaboración del medio de cultivo agar-papa-dextrosa fueron:

En un matraz Erlenmeyer se colocó 500 ml de agua destilada, se agregó la sacarosa y el agar, 100 ml de solución de papa, se colocó en plato caliente hasta disolver todo, se aforó a 1000 ml y se tapó con algodón y papel aluminio. Por último se colocó el matraz en la autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121 °C para su correcta esterilización.

Tabla 4. Composición medio de cultivo solución Murashige & Skoog

Materiales	Componente	Cantidad
Solución Murashige & Skoog		50 ml
Tiamina	$C_{12}H_{17}N_4OS$	0,5 g
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	20 g
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	10 g

Procedimiento:

Los pasos a seguir para la elaboración del medio de cultivo Murashige & Skoog fueron los siguientes:

En un matraz Erlenmeyer se añadió 50 ml de solución M&S, luego se colocó en el plato caliente y se agregó la sacarosa, agar y tiamina donde se mezcló la solución hasta disolverlo, posteriormente se aforó a 100 ml, se tapó y se colocó el matraz en el autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121 °C.

Procedimiento:

En un matraz Erlenmeyer se colocó 500 ml de agua destilada, luego se agitó en el plato caliente y se agregó nitrato de sodio, fosfato potásico, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sacarosa, agar y carbono, en las cantidades antes mencionadas. Por último se aforó a 1000 ml, se tapó y se colocó en el autoclave por 20 min a una temperatura de 121 °C

Tabla 5. Composición medio de cultivo Czapek

Materiales	Componente	Cantidad
Nitrato de sodio	$NaNO_3$	2 g
Fosfato bipotásico	K_2HPO_4	1 g
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,5 g
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	15 g

Cloruro de potasio	KCl	0,5 g
Sulfato de hierro	FeSO ₄	0,01 g
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	0,05 g
Carbono	C	5 g

4.8. Procesamiento de la información

Con los datos obtenidos en el laboratorio se procedió a realizar los Análisis Estadísticos; elaborando Análisis de Variancia (ADEVA), se realizó la Prueba de significación de Tukey al 5 %, utilizando el programa estadístico INFOSTAT, versión 2015.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DESARROLLO DEL HONGO

Tabla 6. ÁREA DE DESARROLLO DEL HONGO (cm²)

Analisis de varianza ADEVA

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,09206

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
P2M3T2	4.44 A	10.14 A	25.55 A	35.28 A	36.13 A
P1M3T2	2.03 A B	9.82 A	20.10 A B	34.79 A	36.13 A
P1M1T2	1.55 A B	8.16 A	20.02 A B	32.70 A B	35.70 A B
P2M3T1	1.43 A B	5.12 B	17.69 A B	26.86 B C	34.51 A B
P1M2T2	1.08 A B	4.59 B C	17.32 A B	26.42 B C	34.44 A B
P2M2T2	0.90 A B	3.03 B C	16.42 B	21.99 C	33.75 A B
P2M1T1	0.71 A B	3.00 B C	8.02 C	13.26 D	24.01 A B
P1M3T1	0.32 A B	2.58 C	5.66 C	11.01 D	24.01 B
P2M2T1	0.09 B	0.29 D	0.65 D	1.55 E	3.21 C
P2M1T2	0.06 B	0.26 D	0.61 D	1.47 E	3.07 C
P1M2T1	0.05 B	0.23 D	0.57 D	1.28 E	2.68 C
P1M1T1	0.04 B	0.20 D	0.55 D	1.19 E	2.19 C

En la tabla 5, observamos el desarrollo del área de los hongos según transcurren los días y la diferencia estadística que presentó cada tratamiento.

En el día 1 se observa que el desarrollo del hongo del primer tratamiento (P2M3T2) presenta una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, ya que en este tratamiento el hongo se puede desarrollar de mejor manera, a diferencia del tratamiento (P1M1T1) en el cual no se desarrolla de una manera adecuada. Como Martínez et al. (2015) menciona en su trabajo de investigación que se puede aumentar un 50% de la producción de esporas aplicando el medio adecuado para su desarrollo.

El día 2, los tratamientos P2M3T2 – P1M3T2 – P1M1T1 entre ellos no presentaron diferencia estadística en comparación a los demás tratamientos en los cuales en ellos se observa una diferencia significativa, como Ortiz et al. (2013) en su trabajo de

investigación los *Trichoderma* nativos al momento del cultivo in vitro el desarrollo micelial fue mejor con el estrés hídrico ya que su desarrollo radial fue mejor

El día 3, se observa como varia el desarrollo del hongo influenciado por las condiciones aplicadas dando como resultado que el tratamiento P2M3T2 presenta una diferencia significativa en comparación los restantes tratamientos aplicados en el ensayo se identificó que el desarrollo del tratamiento P1M1T1 su desarrollo del área es menor en comparación a los demás, como Sandoval y Noelting (2011), en su trabajo menciona que el *Trichoderma* fue pre cultivado en APD después se los inocularon en un medio líquido y un medio semisólido, entre estos una diferencia de producción de conidios, ya que en el líquido existió mayor proliferación de conidios con referencia al semilíquido.

El día 4, ya se puede observar la diferencia estadística que presenta la diferencia entre medios de cultivo y las temperaturas aplicadas, se identificó que los tratamientos P1M3T2 – P2M3T2 presento una diferencia significativa a relación de los otros tratamientos aplicados en el ensayo, como menciona Infante, et al. (2009) que el *Tricoiderma* presenta un tipo de antagonismo que se ve favorecido por las características del agente control biológico plasticidad ecológica, velocidad de desarrollo y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros.

El día 5, se observó que los tratamientos P1M3T2 – P2M3T2 presentaron diferencia significativas en relación a los demás tratamientos teniendo en cuenta que el M3 (medio Czapek) y la tempertura T2 (27°C) son las óptimas para que el desarrollo del área de desarrollo del hongo se puede realizar de una manera más efectiva y en menor tiempo ya que en este medio tiene los nutrientes necesarios para el desarrollo del mismo ya que aumenta su velocidad de producción de esporas, a diferencia de los tratamientos que estuvieron sometidos a los otros medios de cultivos (APD – M&S) a la temperatura T1 (13,4 °C) que su desarrollo fue de mayor tiempo ya que se no presentaban las condiciones adecuadas para proliferación de esporas, como indica Vallejo (2014) La tasa de desarrollo diario por localidad y por sustrato se obtuvieron en los tratamientos en Guaranda con el sustrato de cebada con un promedio de 5.117 mm de TCD, en San Miguel con el sustrato de arroz con un promedio de 24.828 mm

de TCD y en Chillanes con el sustrato de arroz con un promedio de 24.171 mm de TCD.

5.2 COLORACIÓN DE LAS CEPAS

Trichoderma minutisporum



Figura 1. Coloración de *Trichoderma minutisporum*

La coloración del *Trichoderma minutisporum* en los primeros estadios fue una coloración blanca conforme se producía la maduración del hongo esta iba cambiando la coloración a un verde claro con los bordes blancos claro al momento de completar su maduración total pudimos observar que el hongo tenía una coloración amarillo verdosa, como menciona Falconi (2010), indica que *Trichoderma minutisporum* presenta una coloración verde brillante o amarillento gris pálido verde en forma de parches. No tiene olor, los conidióforos presentan ramificaciones, con ramas primarias cerca del ápice

Trichoderma harzianum



Figura 2. Coloración de *Trichoderma harzianum*

La coloración del *Trichoderma harzianum* en los primeros estadios fue una coloración blanca conforme se producía la maduración del hongo esta iba cambiando la coloración a un verde oscuro con los bordes blancos claro al momento de completar su maduración total pudimos observar que el hongo tenía una coloración verde oscura, como menciona Falconi (2010) el *Trichoderma harzianum* toma una coloración verde amarillenta o verde oscura, al inverso son incoloras amarillentas opacas, olor a tierra.

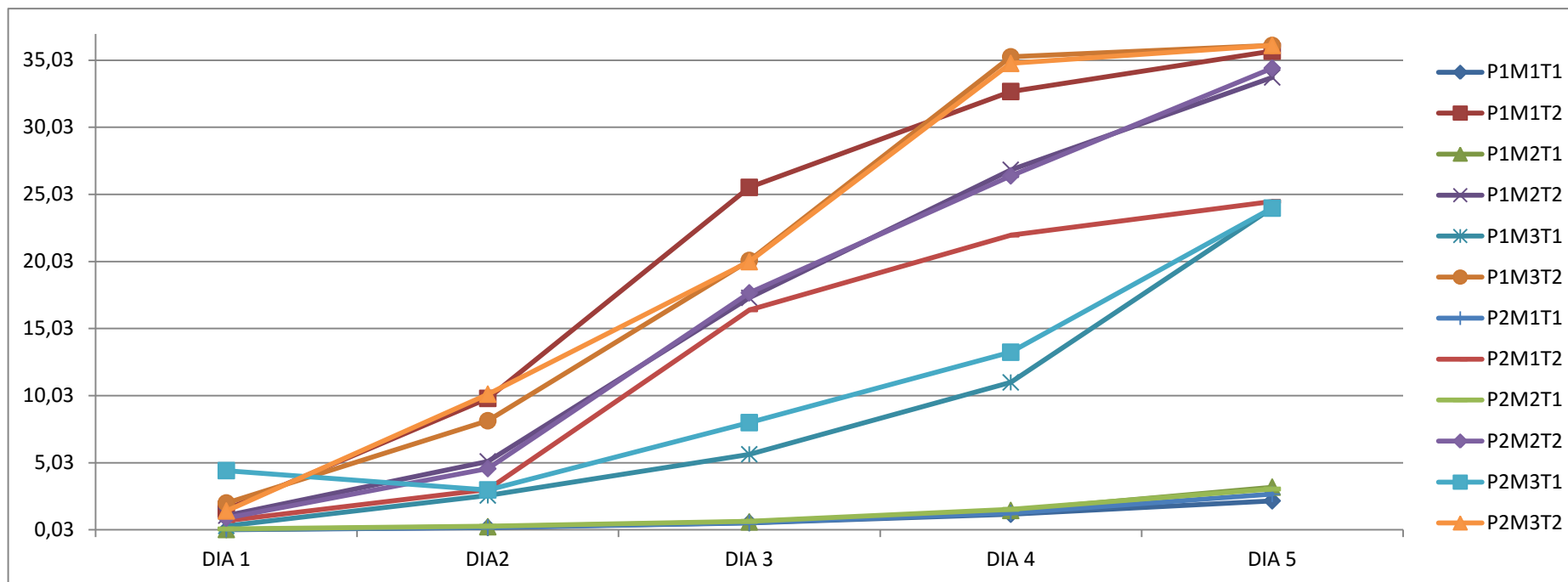


Figura 3. Diferencia de desarrollo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporum* en el transcurso de 5 días

En la figura 5, se observa la interacción de los factores de estudio que intervinieron en el área de desarrollo del *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporum*, teniendo como resultado que a temperatura de 27°C con el medio de cultivo Czapek presentaron las condiciones óptimas para que la proliferación de conidios de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporum* se incremente en menor tiempo y con mayor facilidad.

5.3 CONTEO DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Para realizar el conteo de esporas se utilizó el método de dilución ya explicado en la metodología con concentraciones que fueron desde 10^{-1} hasta 10^{-9} las concentraciones utilizadas para el conteo de UFC para el *Trichoderma harzianum* fue la de 10^{-5} y para el *Trichoderma minutisporum* fue la de 10^{-6} .

Trichoderma harzianum



Figura 4. Colonias de *Trichoderma harzianum* en dilución 10^{-5} .

El resultado obtenido fue: 39 colonias

Aplicando la fórmula: $39 * 10^5 = 3900000$ colonias por ml

Trichoderma minutisporum



Figura 5. Colonias de *Trichoderma minutisporum* en dilución 10^{-6} .

El resultado obtenido fue: 39 colonias

Aplicando la fórmula: $14 * 10^6 = 14000000$ colonias por ml

5.4. VELOCIDAD DE DESARROLLO (DIA)

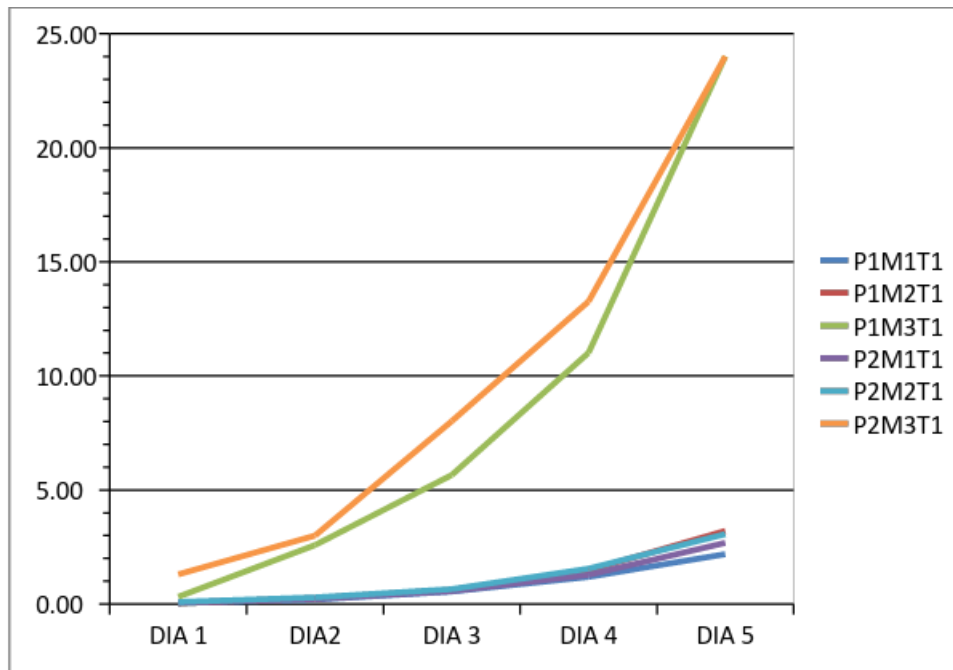


Figura 6. Velocidad de desarrollo de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporium* con una temperatura de 13.4 °C.

En el figura 8, podemos observas la velocidad que tiene el desarrollo de área de las variedad de *Trichoderma* sometidos a la temperatura T1 (13,5 °C) en cual las líneas de desarrollo son constantes en el medio de cultivo PDA y el medio de cultivo M&S a diferencia de las variedad que se encontraban en el medio de cultivo Czapek donde el desarrollo del área es de mejor manera y con mayor facilidad a diferencia de los otros medios. Ya que en los medios de cultivo M1 y la raza P1 fue el que presento menor tiempo velocidad en el desarrollo del área del hongo. como menciona Infante, et al. (2009) que el *Tricoiderma* presenta un tipo de antagonismo que se ve favorecido por las características del agente control biológico plasticidad ecológica, velocidad de desarrollo y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros.

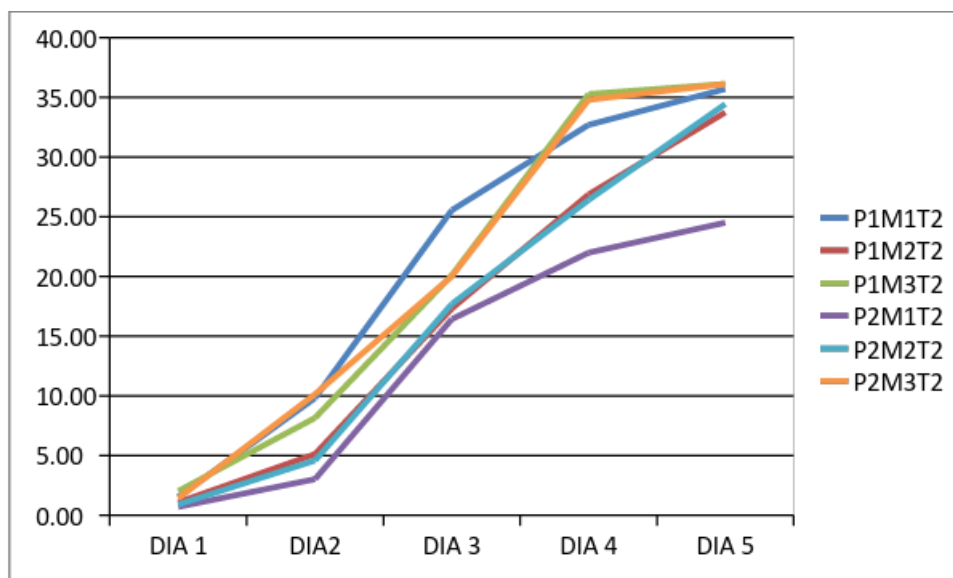


Figura 7. Velocidad de desarrollo en cm^2 de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma minutisporium* a temperatura de 27°C .

En el figura 8, podemos observar la velocidad que tiene el desarrollo de área de las variedades de *Trichoderma* sometidos a la temperatura T1 (27°C) en cual las líneas de desarrollo son constantes en el medio de cultivo PDA y el medio de cultivo M&S a diferencia de las variedades que se encontraban en el medio de cultivo Czapek donde el desarrollo del área es de mejor manera y con mayor facilidad a diferencia de los otros medios. Ya que en los medios de cultivo M1 y la raza P1 fue el que presentó menor tiempo velocidad en el desarrollo del área del hongo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

- La técnica artesanal de arroz resulto efectiva en la presente investigación para la recolección de cepas de *Trichoderma* en las áreas muestreadas.
- Para el desarrollo de las cepas de los *Trichodermas* se utilizó diferentes medios de cultivo; el que facilito el desarrollo de los *Trichodermas* es el medio de cultivo Czapek a una temperatura de 27°C ya que en estas condiciones los hongos se desarrollaron en 5 días a diferencia de los otros medios de cultivo y al ambiente que su desarrollo fue en mayor tiempo, llegando hasta los 10 días.
- El desarrollo de *Trichoderma harzianum* en el medio de cultivo Czapek a una temperatura de 27°C tuvo un desarrollo de 6,33 cm² por día, de *Trichoderma minutisporium* en el medio de cultivo Czapek a una temperatura de 27°C tuvo un desarrollo de 6,82 cm² por día
- La coloración de las colonias al finalizar la maduración del hongo *Trichoderma harzianum* fue de color verde oscuro, al igual *Trichoderma minutisporium* a los 5 días tuvo un color de verde amarillento gris.
- Se obtuvo un gran número de colonias por ml de agua presentes en el ensayo, teniendo como resultado que de *Trichoderma minutisporium* existió 14000000/ml y en el *Trichoderma harzianum* 3900000/ml
- La velocidad de desarrollo de los hongos en los 5 días fue mayor en el medio de cultivo Czapek, ya que facilita la maduración de los micelios y esporas de los *Trichodermas*.
- El proceso de recolección, identificación y desarrollo de los *Trichodermas* permitio la elaboración de un protocolo para el manejo de hongos del genero *Trichoderma*, el mismo que forma parte de la propuesta.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., & Peña, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 257–269. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37012013006>

Brock, J. (2005). *Cultivo de microorganismos*. Recuperado de http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema_02.-_Cultivo_de_microorganismos.pdf

Cadeño, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Perú. Recuperado de <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

Gato, Y., & Rodríguez, D. (2010). Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14(4), 241–246. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092010000400007

Gilchrist, E., Jaramillo, S., & Reynaldi, S. (2009). Efecto sobre la sarna polvosa de cuatro aislamientos del hongo *Trichoderma asperellum* en tres tipos de suelo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 62(1), 4783–4792. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1799/179915377005.pdf>

Guigón, C., & González, P. (2004). Selección de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. con Actividad Antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y Promotoras de Desarrollo en el Cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 9. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/612/61222115.pdf>

Falconí C. 2010. Manual de Taxonomía de *Trichoderma* spp. Microorganismos Agrícolas ecuatorianos.

Hoyos, L., Chaparro, P., Abramsky, M., & Chet, I. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451–

458. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n3/v26n3a10.pdf>
- Laboratories, M. (2015). *Czapek Dox Agar*. Recuperado de <http://www.himedialabs.com/TD/M075.pdf>
- López, Y., Pineda, J., Alexander Hernández, & Ulacio, D. (2010). Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y desarrollo de plantas de maíz. *Bioagro*, 22(1), 37–42. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3706851>
- Lorenzo, M. (2004). Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. *Fitosanidad*, 8(2), 64. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209117836021.pdf>
- Mejía, L., Valero, N., & Cubillos, J. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del desarrollo vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var . *flavicarpa* Degener) *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var . *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81–86. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180314730011>
- Ortiz, J., Hernández, G., Cruz, M., Figueroa, K., Hernández, F., & Figueroa, B. (2013). Inhibición in vitro de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 126–136. Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/39843>
- Perdomo, A. (1995). Protocolos para la producción y uso de microorganismos beneficios en condiciones rurales. *Bogotá Positiva*, (68), 1–27.
- Rodríguez, I., Martínez, C., Michelena, G., & Agenor, F. (2015). Fermentación en estado sólido de *Trichoderma harziannum* bajo campos magnéticos. *ICIDCA*, 49(1), 40–45. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961007>
- Sandoval, C., & Noelting, M. (2011). Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai en dos medios de multiplicación. *F*, 15(4), 215–221. Recuperado de <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/132>

- Sandoval, I., López, O., Bonilla, T., & Oliva, O. (2003). Estudios del biocontrol de hongos del suelo con *Trichoderma harzianum* y la combinación de la solarización del clavel (*Dianthus barbatus*). *Fitosanidad*, 7(4), 23–25. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209118173005.pdf>
- Sivila, N., & Jujuy, S. A. (2013). *Produccion artesanal de Trichoderma*. Argentina. Recuperado de [http://www.cedaf.fca.unju.edu.ar/inv/Manual de *Trichoderma* 2013 - Sivila Alvarez.pdf](http://www.cedaf.fca.unju.edu.ar/inv/Manual%20de%20Trichoderma%202013%20-%20Sivila%20Alvarez.pdf)
- Vallejo, T. (2014). *Caracterización y clasificación de Trichodermas nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio*. Universidad Técnica de Ambato. Recuperado de [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/7691/1/tesis-026 Maestría en Agroecología y Ambiente - CD 256.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/7691/1/tesis-026%20Maestría%20en%20Agroecología%20y%20Ambiente%20-%20CD%20256.pdf)
- Velásquez, O., Ortegón, A., Camacho, A., Giles, M., Palao, M., & Serrano, B. (2009). Cuenta en placa de bacterias, 1–10. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf

6.3. ANEXOS

DATOS DIA 1

TEMPERATURA MEDIOS DE CULTIVO Y VARIEDAD

AREA DE DESARROLLO DIA 1

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
CRE TRANS 36 0.60 0.36 26.09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
BLOQUES	0.20	2	0.10	0.78	0.4707
TRATAMIENTOS	3.92	11	0.36	2.80	0.0190
VARIEDAD	0.05	1	0.05	0.42	0.5242
MEDIOS	1.35	2	0.67	5.40	0.0115
TEMPERATURA	0.68	1	0.68	5.41	0.0288
VARIEDAD*MEDIOS	0.47	2	0.24	1.90	0.1716
VARIEDAD*TEMPERATURA	0.59	1	0.59	4.73	0.0397
MEDIOS*TEMPERATURA	0.30	2	0.15	1.21	0.3161
VARIEDAD*MEDIOS*TEMPERA..	0.48	2	0.24	1.92	0.1686
Error	2.80	22	0.13		
Total	6.92	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,05997

Error: 0,1271 gl: 22

TRATAMIENTOS Medias n

P2M3T1	4.44	3	A
P1M3T2	2.03	3	A B
P1M1T2	1.55	3	A B
P2M3T2	1.43	3	A B
P1M2T2	1.08	3	A B
P2M2T2	0.90	3	A B
P2M1T2	0.71	3	A B
P1M3T1	0.32	3	A B
P2M2T1	0.09	3	B
P2M1T1	0.06	3	B
P1M2T1	0.05	3	B
<u>P1M1T1</u>	<u>0.04</u>	<u>3</u>	<u>B</u>

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24943

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD Medias n

P2	1.27	18	A
<u>P1</u>	<u>0.85</u>	<u>18</u>	<u>A</u>

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,37002

Error: 0,1300 gl: 22

MEDIOS Medias n

M3 2.05 12 A

M1 0.59 12 B

M2 0.53 12 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24943

Error: 0,1300 gl: 22

TEMPERATURA Medias n

T2 1.28 18 A

T1 1.83 18 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64899

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS Medias n

P2 M3 2.94 6 A

P1 M3 1.17 6 A B

P1 M1 0.80 6 A B

P1 M2 0.57 6 A B

P2 M2 0.50 6 A B

P2 M1 0.39 6 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,47233

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD TEMPERATURA Medias n

P1 T2 1.55 9 A

P2 T2 1.53 9 A B

P2 T1 1.02 9 A B

P1 T1 0.14 9 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64899

Error: 0,1300 gl: 22

MEDIOS TEMPERATURA Medias n

M3 T2 2.38 6 A

M3 T1 1.73 6 A

M1 T2 1.13 6 A

M2 T2 0.99 6 A

M2 T1 0.07 6 A
M1 T1 0.05 6 A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,07185

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS TEMPERATURA Medias n

P2 M3 T1 4.44 3 A
P1 M3 T2 2.03 3 A B
P1 M1 T2 1.55 3 A B
P2 M3 T2 1.43 3 A B
P1 M2 T2 1.08 3 A B
P2 M2 T2 0.90 3 A B
P2 M1 T2 0.71 3 A B
P1 M3 T1 0.32 3 A B
P2 M2 T1 0.09 3 B
P2 M1 T1 0.06 3 B
P1 M2 T1 0.05 3 B
P1 M1 T1 0.04 3 B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

AREA DE DESARROLLO DIA 2

Variable N R² R² Aj CV

CRE TRANS 2 36 0.98 0.96 7.89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
BLOQUES	0.10	2	0.05	1.90	0.1731
TRATAMIENTOS	23.76	11	2.16	81.30	<0.0001
VARIEDAD	0.23	1	0.23	8.01	0.0093
MEDIOS	4.42	2	2.21	77.33	<0.0001
TEMPERATURA	16.47	1	16.47	576.66	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS	1.14	2	0.57	20.00	<0.0001
VARIEDAD*TEMPERATURA	0.38	1	0.38	13.24	0.0013
MEDIOS*TEMPERATURA	0.15	2	0.08	2.69	0.0883
VARIEDAD*MEDIOS*TEMPERA..	0.97	2	0.48	16.92	<0.0001
Error	0.58	22	0.03		
Total	24.44	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,48453

Error: 0,0266 gl: 22

TRATAMIENTOS Medias n

P2M3T2 10.14 3 A
P1M1T2 9.82 3 A
P1M3T2 8.16 3 A
P1M2T2 5.12 3 B
P2M2T2 4.59 3 B C

P2M3T1	3.03	3	B C
P2M1T2	3.00	3	B C
P1M3T1	2.58	3	C
P2M2T1	0.29	3	D
P1M2T1	0.26	3	D
P2M1T1	0.23	3	D
P1M1T1	0.20	3	D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11982

Error: 0,0300 gl: 22

VARIEDAD Medias n

P1 4.36 18 A

P2 3.55 18 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17775

Error: 0,0300 gl: 22

MEDIOS Medias n

M3 5.97 12 A

M1 3.32 12 B

M2 2.57 12 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11982

Error: 0,0300 gl: 22

TEMPERATURA Medias n

T2 6.81 18 A

T1 1.09 18 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,31176

Error: 0,0300 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS Medias n

P2 M3 6.56 6 A

P1 M3 5.37 6 A B

P1 M1 5.01 6 B

P1 M2 2.69 6 C

P2 M2 2.44 6 C

P2 M1 1.63 6 C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22690

Error: 0,0300 gl: 22

VARIEDAD TEMPERATURA Medias n

P1	T2	7.70	9	A
P2	T2	5.92	9	B
P2	T1	1.17	9	C
P1	T1	1.01	9	C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,31176

Error: 0,0300 gl: 22

MEDIOS TEMPERATURA Medias n

M3	T2	9.15	6	A
M1	T2	6.43	6	B
M2	T2	4.86	6	B
M3	T1	2.79	6	C
M2	T1	0.27	6	D
M1	T1	0.21	6	D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,51490

Error: 0,0300 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS TEMPERATURA Medias n

P2	M3	T2	10.14	3	A
P1	M1	T2	9.82	3	A
P1	M3	T2	8.16	3	A
P1	M2	T2	5.12	3	B
P2	M2	T2	4.59	3	B C
P2	M3	T1	3.03	3	B C
P2	M1	T2	3.00	3	B C
P1	M3	T1	2.58	3	C
P2	M2	T1	0.29	3	D
P1	M2	T1	0.26	3	D
P2	M1	T1	0.23	3	D
P1	M1	T1	0.20	3	D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

AREA DE DESARROLLO DIA 3

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV

CRE TRANS 3 36 0.97 0.95 10.63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
BLOQUES	0.08	2	0.04	0.36	0.6996

TRATAMIENTOS	78.95	11	7.18	64.65	<0.0001
VARIEDAD	0.08	1	0.08	0.72	0.4047
MEDIOS	5.56	2	2.78	26.45	<0.0001
TEMPERATURA	67.32	1	67.32	640.42	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS	0.87	2	0.43	4.12	0.0290
VARIEDAD*TEMPERATURA	0.53	1	0.53	5.00	0.0349
MEDIOS*TEMPERATURA	4.16	2	2.08	19.78	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS*TEMPERA..	0.44	2	0.22	2.11	0.1436
Error	2.44	22	0.11		
Total	81.48	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,99049

Error: 0,1110 gl: 22

TRATAMIENTOS Medias n

P1M1T2	25.55	3	A
P1M3T2	20.10	3	A B
P2M3T2	20.02	3	A B
P2M2T2	17.69	3	A B
P1M2T2	17.32	3	A B
P2M1T2	16.42	3	B
P2M3T1	8.02	3	C
P1M3T1	5.66	3	C
P2M2T1	0.65	3	D
P1M2T1	0.61	3	D
P2M1T1	0.57	3	D
P1M1T1	0.55	3	D

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22944

Error: 0,1100 gl: 22

VARIEDAD Medias n

P1	11.63	18	A
P2	10.56	18	A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,34037

Error: 0,1100 gl: 22

MEDIOS Medias n

M3	13.45	12	A
M1	10.77	12	B
M2	9.07	12	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22944

Error: 0,1100 gl: 22

TEMPERATURA Medias n

T2	19.52	18	A
----	-------	----	---

T1 2.68 18 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59698

Error: 0,1100 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS Medias n

P2	M3	14.02	6	A
P1	M3	13.05	6	A
P1	M1	12.88	6	A B
P2	M2	9.17	6	B
P1	M2	8.97	6	B
P2	M1	8.50	6	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,43448

Error: 0,1100 gl: 22

VARIEDAD TEMPERATURA Medias n

P1	T2	20.99	9	A
P2	T2	18.04	9	A
P2	T1	3.08	9	B
P1	T1	2.27	9	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59698

Error: 0,1100 gl: 22

MEDIOS TEMPERATURA Medias n

M1	T2	20.99	6	A
M3	T2	20.06	6	A
M2	T2	17.50	6	A
M3	T1	6.84	6	B
M2	T1	0.63	6	C
M1	T1	0.56	6	C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,98596

Error: 0,1100 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS TEMPERATURA Medias n

P1	M1	T2	25.55	3	A
P1	M3	T2	20.10	3	A B
P2	M3	T2	20.02	3	A B
P2	M2	T2	17.69	3	A B
P1	M2	T2	17.32	3	A B
P2	M1	T2	16.42	3	B
P2	M3	T1	8.02	3	C
P1	M3	T1	5.66	3	C
P2	M2	T1	0.65	3	D

P1	M2	T1	0.61	3	D
P2	M1	T1	0.57	3	D
P1	M1	T1	0.55	3	D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

AREA DE DESARROLLO DIA 4

Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
CRE TRANS	4	36	0.99	0.99
			5.65	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
BLOQUES	0.03	2	0.02	0.39	0.6788
TRATAMIENTOS	134.95	11	12.27	284.45	<0.0001
VARIEDAD	0.13	1	0.13	3.28	0.0825
MEDIOS	18.71	2	9.35	228.42	<0.0001
TEMPERATURA	109.48	1	109.48	2673.36	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS	0.68	2	0.34	8.28	0.0018
VARIEDAD*TEMPERATURA	0.58	1	0.58	14.10	0.0010
MEDIOS*TEMPERATURA	4.96	2	2.48	60.60	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS*TEMPERA.	0.41	2	0.20	4.95	0.0158
Error	0.95	22	0.04		
Total	135.93	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61738

Error: 0,0431 gl: 22

TRATAMIENTOS Medias n

P1M3T2	35.28	3	A
P2M3T2	34.79	3	A
P1M1T2	32.70	3	A B
P1M2T2	26.86	3	B C
P2M2T2	26.42	3	B C
P2M1T2	21.99	3	C
P2M3T1	13.26	3	D
P1M3T1	11.01	3	D
P2M2T1	1.55	3	E
P1M2T1	1.47	3	E
P2M1T1	1.28	3	E
P1M1T1	1.19	3	E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13836

Error: 0,0400 gl: 22

VARIEDAD Medias n

P1	18.09	18	A
P2	16.55	18	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20525

Error: 0,0400 gl: 22

MEDIOS Medias n

M3 23.59 12 A

M2 14.29 12 B

M1 14.07 12 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13836

Error: 0,0400 gl: 22

TEMPERATURA Medias n

T2 29.67 18 A

T1 4.96 18 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,35999

Error: 0,0400 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS Medias n

P2 M3 24.03 6 A

P1 M3 23.15 6 A

P1 M1 16.94 6 B

P1 M2 14.17 6 B C

P2 M2 13.98 6 B C

P2 M1 11.64 6 C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26200

Error: 0,0400 gl: 22

VARIEDAD TEMPERATURA Medias n

P1 T2 31.61 9 A

P2 T2 27.73 9 B

P2 T1 5.36 9 C

P1 T1 4.56 9 C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,35999

Error: 0,0400 gl: 22

MEDIOS TEMPERATURA Medias n

M3 T2 35.04 6 A

M1 T2 27.35 6 B

M2 T2 26.64 6 B

M3 T1 12.14 6 C

M2 T1 1.51 6 D

M1 T1 1.24 6 D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59456

Error: 0,0400 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS TEMPERATURA Medias n

P1	M3	T2	35.28	3	A
P2	M3	T2	34.79	3	A
P1	M1	T2	32.70	3	A B
P1	M2	T2	26.86	3	B C
P2	M2	T2	26.41	3	B C
P2	M1	T2	21.99	3	C
P2	M3	T1	13.26	3	D
P1	M3	T1	11.01	3	D
P2	M2	T1	1.55	3	E
P1	M2	T1	1.47	3	E
P2	M1	T1	1.28	3	E
P1	M1	T1	1.19	3	E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

AREA DE DESARROLLO DIA 5

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV

CRE TRANS 5 36 0.98 0.96 8.21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
BLOQUES	0.42	2	0.21	1.57	0.2300
TRATAMIENTOS	120.52	11	10.96	81.19	<0.0001
VARIEDAD	4.7E-04	1	4.7E-04	3.3E-03	0.9545
MEDIOS	20.55	2	10.28	72.69	<0.0001
TEMPERATURA	82.84	1	82.84	585.92	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS	2.5E-03	2	1.3E-03	0.01	0.9911
VARIEDAD*TEMPERATURA	0.01	1	0.01	0.08	0.7824
MEDIOS*TEMPERATURA	17.05	2	8.52	60.30	<0.0001
VARIEDAD*MEDIOS*TEMPERA..	0.07	2	0.03	0.23	0.7935
Error	2.97	22	0.13		
Total	123.92	35			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,09206

Error: 0,1349 gl: 22

TRATAMIENTOS Medias n

P2M3T2	36.13	3	A
P1M3T2	36.13	3	A
P1M1T2	35.70	3	A B

P2M2T2	34.51	3	A	B
P1M2T2	34.44	3	A	B
P2M1T2	33.75	3	A	B
P1M3T1	24.01	3	A	B
P2M3T1	24.01	3	B	
P1M2T1	3.21	3	C	
P2M2T1	3.07	3	C	
P2M1T1	2.68	3	C	
P1M1T1	2.19	3	C	

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24943

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD Medias n

P1 22.50 18 A

P2 22.47 18 A

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,37002

Error: 0,1300 gl: 22

MEDIOS Medias n

M3 30.07 12 A

M2 18.77 12 B

M1 18.62 12 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24943

Error: 0,1300 gl: 22

TEMPERATURA Medias n

T2 35.12 18 A

T1 9.86 18 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64899

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS Medias n

P1 M3 30.07 6 A

P2 M3 30.07 6 A

P2 M2 18.95 6 B

P1 M2 18.76 6 B

P1 M1 18.60 6 B

P2 M1 18.48 6 B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,47233

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD TEMPERATURA Medias n

P1	T2	35.19	9	A
P2	T2	35.03	9	A
P2	T1	9.92	9	B
P1	T1	9.80	9	B

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64899

Error: 0,1300 gl: 22

MEDIOS TEMPERATURA Medias n

M3	T2	36.13	6	A
M1	T2	35.11	6	A
M2	T2	34.10	6	A
M3	T1	24.01	6	B
M2	T1	3.14	6	C
M1	T1	2.44	6	C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,07185

Error: 0,1300 gl: 22

VARIEDAD MEDIOS TEMPERATURA Medias n

P1	M3	T2	36.13	3	A
P2	M3	T2	36.13	3	A
P1	M1	T2	35.70	3	A B
P2	M2	T2	34.51	3	A B
P1	M2	T2	34.44	3	A B
P2	M1	T2	33.75	3	A B
P1	M3	T1	24.01	3	B
P2	M3	T1	24.01	3	B
P1	M2	T1	3.21	3	C
P2	M2	T1	3.07	3	C
P2	M1	T1	2.68	3	C
P1	M1	T1	2.19	3	C

Letras distintas indican diferencias significativas($p \leq 0,05$)

Captura de microorganismos (EMAs)



Elaboración de medio de cultivo



Siembra y Aislamiento de los microorganismos



Área de desarrollo

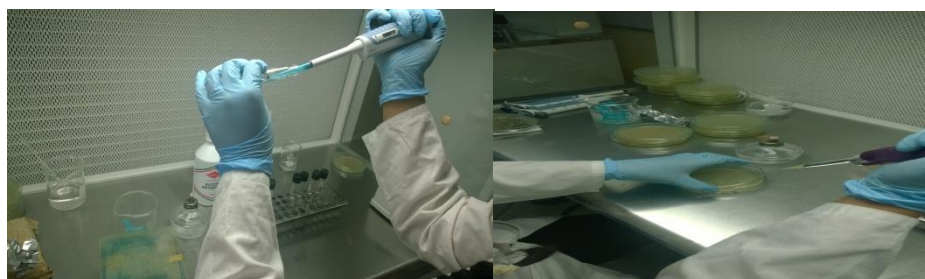


Figura 8 *Trichoderma minutisporium*

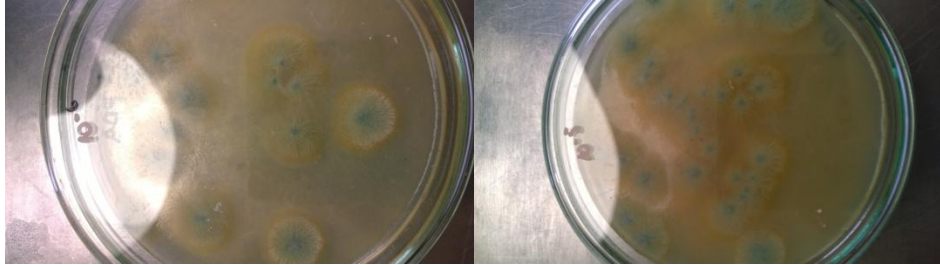


Figura 9. *Trichoderma harzianum*

Diluciones líquidas



Conteo de colonias



Propagación de *Trichoderma*.



CAPÍTULO VII

PROPUESTA

ELABORACION ARTESANAL DE *Trichoderma sp.*

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Instituciones Involucradas:

- Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica.

Responsables administrativos:

- Ing. Mg. Eduardo Cruz
- Ing. Mg. Marco Pérez
- Ing. Mg. Manolo Muñoz

Responsable técnico:

- Oscar Andrés Acosta Toro

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

En la agricultura convencional moderna producto de la revolución verde, los fungicidas son la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. Dichos pesticidas son sustancias químicas que producen innumerables efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo a la generación de microorganismos resistentes o “pestes”, persistencia ambiental de residuos tóxicos, contaminación de suelos y recursos hídricos, lo cual altera el equilibrio ecológico. Una de las alternativas más promisorias para disminuir el impacto ambiental causado por el frecuente uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de plantas se centra en la utilización de agentes de control biológico. Dentro de estos agentes se destacan los hongos del género *Trichoderma*.

7.3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los agricultores tienen muchos problemas en sus cultivos agrícolas ya que se ven muy afectados por las enfermedades ocasionadas por diversos hongos, y se han visto abocados a la utilización exagerada de productos químicos para el control de enfermedades, ocasionando problemas de medio ambiente y de su propia salud, además de la salud de los consumidores.

Cada vez se necesita mayor cantidad de agroquímicos y nuevas moléculas debido a que las enfermedades en los cultivos han generado resistencia, donde el agricultor solo ha aumentado las dosis sin conocimiento del modo y mecanismo de acción de los pesticidas. Es por esto que la importancia de aislar y propagar *Trichoderma sp.* generará una alternativa limpia para que pueda ayudar a los agricultores a combatir los problemas que tienen en los cultivos por el ataque de hongos.

Así para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos presentes en los cultivos es necesario el aislamiento y propagación de hongos *Trichoderma spp.* tomando en cuenta factores como el tipo de medio de cultivo, la humedad y temperatura. (Acosta 2015)

7.4. OBJETIVOS

Captura de *Trichoderma* con trampas artesanales de arroz, para el control biológico de hongos fitopatógenos que atacan a las plantas.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Con la aplicación de la propuesta mencionada se podrá obtener *Trichoderma* de manera artesanal de una manera adecuada y económica en donde el agricultor puede obtener un fungicida natural para controlar diferentes hongos fitopatógenos que atacan a los cultivos, de una manera económica y de gran accesibilidad para el agricultor y con el asesoramiento técnico de la Universidad Técnica de Ambato, y consumir productos sanos sin mucho contaminación por la presencia de fungicidas.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

Los productos agrícolas son de gran importancia para la población, por este motivo estos alimentos deben ser de gran calidad y de gran accesibilidad para la población, por eso es importante bajar los costos de producción e implementar una agricultura limpia por eso es de gran importancia la implementación de alternativas biocontroladoras para el ataque de hongos fitopatógenos, el *Trichoderma* es la alternativa adecuada para el control de dichas enfermedades, con su producción artesanal se ayudara a los agricultores del sector y el asesoramiento de la Universidad para mejorar los productos agrícolas.

7.7. METODOLOGÍA

Se seguirá el protocolo de producción de *Trichoderma* artesanal con los siguientes pasos:

- Captura de EMAs a y través de la trampa de arroz
 - Colocar 4 onzas de arroz cocinado sin sal en una tarrina, luego se mezcló con melaza, en relación 3 a 1
 - Tapar la boca de la tarrina con un pedazo de nylon y se aseguró bien con ligas de plástico.
 - Elegir los sitios donde realizar las capturas,
 - Enterrar las tarrinas en el sitio antes indicado, un total de 4, con el fin d obtener una muestra significativa, a 10 cm de profundidad de la superficie del suelo
 - Recolectar las tarrinas después de 2 semanas y tomar el arroz en el cual estuvo impregnado de microorganismos (EMAs).
- Aislar las cepas de *Trichoderma* e identificar la variedad
- Identificada la variedad sembrar en el medio de cultivo Czapek y mantener a una temperatura de 27°C
- Propagar cepas de *Trichoderma* en arroz cocinado sin sal
- Secar las muestras de *Trichoderma* impregnadas en el arroz
- Realizar la presentación del producto procesado
- Aplicar las muestras en forma foliar solida o directa del arroz en el suelo

7.8. ADMINISTRACIÓN

Se trabajará con los productores bajo el asesoramiento del investigador y la colaboración de la Universidad Técnica de Ambato