

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRÍA EN AGROECOLOGIA Y AMBIENTE

Tema:

***“CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE TRICHODERMAS
NATIVOS APLICANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO A
NIVEL DE LABORATORIO ARTESANAL”***

Trabajo de Titulación.

Previo a la obtención del Grado Académico de Magister en Agroecología y Ambiente

Autora: Ing. María Tránsito Vallejo Ilijama

Director: Ing. José Hernán Zurita Vásquez, Mg.

Ambato - Ecuador

2014

Al Consejo de Posgrado de la Universidad Técnica de Ambato.

El Tribunal de Defensa del trabajo de titulación presidido por el Ingeniero José Hernán Zurita Vázquez, Magister. Presidente del Tribunal e integrado por los señores, Ingeniero Saúl Eduardo Cruz Tobar, Magister, Ingeniero. Segundo Euclides Curay Quispe, Magister, Ingeniero. Marco Oswaldo Pérez Salinas, Magister, Miembros del Tribunal de Defensa, designados por el Consejo Académico de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Dirección de Posgrado, de la Universidad Técnica de Ambato, para receptar la defensa oral del trabajo de titulación con el tema: ***"CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE TRICHODERMAS NATIVOS APLICANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO A NIVEL DE LABORATORIO ARTESANAL"*** elaborado y presentado por la señorita. Ingeniera María Transito Vallejo Ilijama, para optar por el Grado Académico de Magister en Agroecología y Ambiente.

Una vez escuchada la defensa oral el Tribunal aprueba y remite el trabajo de titulación para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.

Ing. José Hernán Zurita Vázquez, Mg
Presidente del Tribunal de Defensa

Ing. Saúl Eduardo Cruz Tobar, Mg
Miembro del Tribunal

Ing. Segundo Euclides Curay Quispe, Mg
Miembro del Tribunal

Ing. Marco Oswaldo Pérez Salinas, Magister
Miembro del Tribunal

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el trabajo de titulación con el tema: ***“CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE TRICHODERMAS NATIVOS APLICANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO A NIVEL DE LABORATORIO ARTESANAL”***, le corresponde exclusivamente a la Ingeniera María Transito Vallejo Ilijama Autora bajo la Dirección del Ingeniero. José Hernán Zurita Vázquez, Magister, Director del trabajo de titulación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.

María Transito Vallejo Ilijama

Autora

Ing. José Hernán Zurita Vázquez, Mg

Director

Ing.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso de este trabajo de titulación como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los Derechos de mi trabajo de titulación, con fines de difusión pública, además autorizo su reproducción dentro de las regulaciones de la Universidad.

Ing. María Transito Vallejo Ilijama

C.C. 0201652518

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico a Dios el ser Supremo por darme la vida, la sabiduría y el conocimiento necesario para culminar con éxito cada una de mis metas planteadas.

A mi querido padre Hugo quien con sus sabios consejos, apoyo económico y principalmente moral me ha brindada la fuerza necesaria para seguir adelante, quien siempre ha estado a mi lado para darme la mano en los momentos más difíciles.

A mi querida y amada hija Damaris Nicole, quien es mi principal razón de vida que a pesar de ser tan pequeña de edad me ha dado grandes lecciones de las cuales aprendido que la constancia, la entrega permanente son la base para salir adelante.

María Transito Vallejo Ilijama

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Dirección de Posgrados, con cada uno de sus catedráticos quienes nos impartieron sus conocimientos y experiencias formándonos profesionales de alta calidad para apoyar al progreso y desarrollo de nuestro querido Ecuador.

Al Ing. Hernán Zurita Vásquez como Director por su apoyo y recomendaciones para el correcto desarrollo del proceso de investigación.

Mi reconocimiento a los señores miembros que conformaron el Tribunal de revisión y calificación de Tesis, Ing. Segundo Curay, Mg., Ing. Marco Pérez, Mg. Ing. Eduardo Cruz Tobar, Mg. por su colaboración, recomendaciones y sugerencias para la culminación con éxito del documento final.

El mayor reconocimiento y estima al Dr. Carlos Falconí, por brindarme sus conocimientos y guía permanente en el proceso investigativo.

Mi sincero agradecimiento y estima a María Isabel Larrea, e Ing. Cristina Troya por su apoyo incondicional, amistad y recomendaciones para culminar con éxito este trabajo.

A la Dirección Provincial Agropecuaria de Bolívar. Por facilitarme las instalaciones para el desarrollo del proceso de investigación.

CONTENIDO	PAG
Página de Título o Portada	I
Página de Al consejo de Posgrado de la Universidad Técnica de Ambato	II
Página de Autoría de la investigación	III
Página de Derechos del Autor	IV
Página de Dedicatoria	V
Página de Agradecimiento	VI
Índice general de contenidos	VII
Índice de cuadros y de Gráficos	VIII
Resumen Ejecutivo	IX
Introducción	1

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Tema	2
1.2. Planteamiento del problema	2
1.2.1 Contextualización	4
1.2.2. Análisis Critico	5
1.2.3. Prognosis	6
1.2.4. Formulación del Problema	7
1.2.5. Interrogantes (Subproblemas)	7
1.2.6.Delimitacion del objeto de la investigación	7
1.2.6.1. Delimitación geográfica	8

1.2.6.2. Delimitación Temporal	8
1.3. Justificación	8
1.4. Objetivos	9
1.4.1. General	9
1.4.2. Especifico	9

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la Investigación	10
2.2. Fundamentación Filosófica	12
2.3. Fundamentación Legal	13
2.4. Categorías Fundamentales	14
2.4.1. Características del genero <i>Trichoderma</i>	14
2.4. 2. Clasificación taxonómica	15
2.4.3. Morfología	15
2.4. 4. Mecanismos de Acción	16
2.4.5. Aplicaciones y resultados del uso de <i>Trichoderma</i> en el control de patógenos de plantas.	18
22.4.6. Aislamientos Nativos	20
2.4.7. Formas de conservación de Microorganismos	21
2.4.8. Producción Limpia	23
2.4.8. 1. Captura de Microorganismos	23
2.4.8 2. Caracterización e Identificación de microorganismos	24

2.4.9. Medios de Multiplicación de <i>Trichoderma</i> .	24
2.5. Hipótesis	25
2.6. Señalamiento de las variables	25

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1 Enfoque	26
3.2. Modalidad básica de la Investigación	26
3.3. Nivel o tipo de investigación	27
3.4. Población y muestra	28
3.5. Operacionalizacion de las variables	29
3.6. Plan de recolección de la información	29
3.7. Plan de Procesamiento y Análisis.	29
3.8. Manejo del Ensayo.	29
3.8.1. Materiales de Campo	29
3.8.1.2. Materiales de Laboratorio	29
3.8.2. Factores en estudio.	29
3.8.3. Ubicación Geográfica.	30
3.8.4. Obtención de la muestra.	31
3.8.5. Preparación de Sustrato	31
3.8.6. Colocación de muestras	32
3.8.7. Preparación de Medios de Cultivo para inoculación de Cepas de <i>Trichoderma</i> .	32

3.8.8. Siembra, aislamiento y purificación de potenciales cepas benéficas de <i>Trichoderma</i> spp	34
3.8.9. Purificación de cepas.	34
3.8.10. Conteo de esporas de <i>Trichoderma</i> sp. Para determinación de Biomasa	34
3.8.11. Tasa de crecimiento diario (TCD)	35
3.8.12. Caracterización macroscópica de los aislados de <i>Trichoderma</i> desarrollas en cada uno de los medios.	35
3.8.12.2. Determinación de morfología en el microscopio.	36
3.8.13. Evaluación estadística de los tratamientos.	36

CAPITULO IV

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1 Análisis de los resultados	38
4.2. Interpretación de los datos	38
4.2.1. Resultados de los Sustratos evaluados por localidad	38
4.2.2..Resultados del análisis de varianza para evaluación de Sustratos y Localidad	39
4.2.3. Análisis de varianza para Tasa de Crecimiento Diario de los aislados de <i>Trichoderma</i> .	41
4.2.4. Análisis de Varianza para determinar la biomasa	48
4.2.5. Clasificación e identificación de Cepas Aisladas.	55
4. 3. Verificación de hipótesis.	72

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	73
5.2. Recomendaciones	75

CAPITULO VI

PROPUESTA

Título.

6.1 Datos Informativos.	76
6.2 Antecedentes de la propuesta.	78
6.3 Justificación	79
6.4 Objetivos.	79
6.5. Análisis de factibilidad.	79
6.6. Fundamentación.	80
6.7 Modelo Operativo.	84
6.8. Administración.	84
6.9. Previsión de la evaluación	84
Material de referencia	85
Anexos	91

INDICE DE TABLAS

	PAG
Tabla 1. Operacionalizacion de la variable independiente.	27
Tabla 2. Tratamientos de los sustratos colocados en las diferentes zonas	30
Tabla 3. Tratamientos en diferentes medios de cultivo	30
Tabla 4. Zonas en las cuales se ubicaron las trampas nutricionales.	31
Tabla 5. Resultados del análisis de varianza para evaluación de Sustratos y Localidad	39
Tabla 6. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de sustratos	40
Tabla 7. Prueba de Tukey al 5 % para comparación por localidad	40
Tabla 8. Análisis de varianza para Tasa de crecimiento diario de Aislados de <i>Trichoderma</i> .	41
Tabla 9. Prueba de Tukey al 5% para Comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) entre localidad	42
Tabla 10 Prueba de Tukey al 5% para Comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) entre el sustrato del cual se aisló la cepa de <i>Trichoderma</i> .	43
Tabla 11. Prueba de Tukey al 5% para Comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) de cepa de <i>Trichoderma</i> , entre medios de cultivo.	43
Tabla 12. Prueba de Tukey al 5% para Comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) interacción entre localidad y sustratos.	44
Tabla 13. Prueba de TUKEY al 5% para comparación de la Tasa de Crecimiento Diario en la interacción medios de cultivo Papa dextrosa Agar, (PDA); Maíz dextrosa Agar (MDA); Trigo dextrosa Agar (TDA) y Localidad.	45
Tabla 14. Prueba de Tukey al 5% para comparaciones de la Tasa de Crecimiento Diario entre sustratos y medios de cultivo.	46
Tabla 15. Prueba de Tukey al 5 % para comparar interacciones de la Tasa de Crecimiento Diario de aislados de <i>Trichoderma</i> entre localidades, medios de Cultivo y Sustratos.	47
Tabla 16. Análisis de varianza para determinar la cantidad de Biomasa	48

producida por los aislados de *Trichoderma* por medio de cultivo.

Tabla 17. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa por localidad.	49
Tabla 18. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa por sustrato del cual se aisló el <i>Trichoderma</i> .	50
Tabla 19. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa por medio de cultivo en el que se inoculó los aislados de <i>Trichoderma</i> .	50
Tabla 20. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa de los aislados de <i>Trichoderma</i> . Por localidad y medios de cultivo.	51
Tabla 21. Prueba de Tukey al 5 % para comparar Biomasa, entre Sustrato y Medio de Cultivo.	52
Tabla 22. Prueba de Tukey al 5 % para comparar Biomasa, entre Medios de Cultivo, Localidad y Sustratos de los aislados de <i>Trichoderma</i> .	53

INDICE DE GRÀFICOS	PAG
Gráfico 1. Morfología externa de <i>Trichoderma</i> spp	16
Gráfico 2. Muestra de la dilución para el conteo de esporas para determinar la biomasa en ml.	35
Gráfico 3. Evaluación de sustratos por localidad	40
Gráfico 4. Crecimiento de Aislados en los medios de cultivo PDA, MDA, TDA.	44
Gráfico 6. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de cebada creciendo en medio PDA.	55
Gráfico 7. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado de sustrato de quinua creciendo en medio PDA.	56
Gráfico 8. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de arroz creciendo en medio PDA	
Gráfico 9. Cepa de <i>Trichoderma</i> , aislado del sustrato de arroz creciendo en medio TDA	56
Gráfico 10. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislada del sustrato de quinua creciendo en medio TDA	57
Gráfico 11. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de cebada creciendo en medio TDA	58
Gráfico 12. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de quinua creciendo en medio MDA	59
Gráfico 13. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de cebada creciendo en medio MDA	59
Gráfico 14. Cepa de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de arroz creciendo en medio MDA	60
Gráfico 15. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de quinua creciendo en medio PDA	60

Gráfico 16. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de arroz creciendo en medio PDA	61
Gráfico 17. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp en sustrato de cebada creciendo en medio PDA	61
Gráfico 18. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp en sustrato de arroz creciendo en medio MDA	62
Gráfico 19. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de quinua creciendo en medio PDA	62
Gráfico 20. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de arroz creciendo en medio TDA	63
Gráfico 21. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp en sustrato de quinua creciendo en medio TDA	63
Gráfico 22. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de cebada creciendo en medio TDA	64
Gráfico 23. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de quinua creciendo en medio TDA	64
Gráfico 24. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de cebada creciendo en medio TDA	65
Gráfico 24. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de arroz creciendo en medio TDA	65
Gráfico 25. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de quinua creciendo en medio MDA.	66
Gráfico 26. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislado del sustrato de cebada creciendo en medio MDA	67
Gráfico 27. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp aislados del sustrato de arroz creciendo en medio MDA	67
Gráfico 28. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp en sustrato de quinua creciendo en medio	68

PDA

Gráfico 29. Cepas de *Trichoderma* spp en sustrato de cebada creciendo en medio PDA 68

Gráfico 30. Cepas de *Trichoderma* spp en sustrato de arroz creciendo en medio PDA 69

Gráfico 31. *Trichoderma viride*, aislado de Chillanes 69

Gráfico 32. *Trichoderma harzianum*, aislado de Chillanes, San Miguel Y Guaranda 70

Gráfico 33. *Trichoderma pseudokoningii* aislado de San Miguel y Guaranda 71

Gráfico 34. *Trichoderma* spp aislado de Chillanes 72

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN DE POSGRADO
MAESTRIA EN AGROECOLOGIA Y AMBIENTE

Tema: "CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE TRICHODERMAS NATIVOS APLICANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO A NIVEL DE LABORATORIO ARTESANAL".

Autora: Ing. María Transito Vallejo Ilijama.

Director: Ing. José Hernán Zurita Vásquez, Mg

Fecha. 08 de mayo del 2014

RESUMEN EJECUTIVO

La investigación de Caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal, se realizó en la provincia Bolívar Cantón Guaranda, donde se evaluó tres sustratos; arroz, cebada y quinua, tres medios de cultivo; Trigo Dextrosa Agar (TDA), Maíz Dextrosa Agar (MDA), Papa Dextrosa Agar (PDA), las muestras de las colonias fueron obtenidas de Chillanes, San Miguel y Guaranda. Como resultados se obtuvo la mejor trampa nutricional para *Trichoderma* fue el sustrato de quinua en las tres localidades. 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 aun no está determinada en las claves taxonómicas; en San Miguel y Guaranda *Trichoderma Harzianum* y *Trichoderma Pseudokoningii*. Las especies caracterizadas durante este proceso de investigación demuestran su acción de agentes antagónicos de hongos fitopatógenos que habitan el suelo (micoparasitismo).

Descriptors, Agentes controladores, Cepas Nativas, Conidios, Colonias, Localidades, Medio controlado, Medios de Cultivo, Sustrato, Sustancias Enzimáticas, *Trichoderma*

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DIRECCIÓN DE POSGRADO

MAESTRIA EN AGROECOLOGIA Y AMBIENTE

Topic: "CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF NATIVE *TRICHODERMAS* APPLYING DIFFERENT CULTURE MEDIA ARTISAN LABORATORY LEVEL".

Author: Ing. Maria Vallejo Transit Ilijama.

Directed. Ing. José Hernán Vásquez Zurita, Mg

Date. 08 may- 2014

SUMMARY

Research Characterization and classification of native Trichodermas apply it Cando different culture media level artisan workshop was held in the Canton Guaranda Bolívar province, where three substrates were evaluated; rice, barley and quinoa three culture media; Wheat Dextrose Agar (TDA), Corn Dextrose Agar (MDA), Potato Dextrose Agar (PDA), samples of colonies were obtained from Chillanes, San Miguel and Guaranda. As a result it was found that the best nutritional trap Trichoderma quinoa was the substrate in the three localities. In all three media were able to characterize the morphology of Trichoderma structures: in Chillanes three species was characterized; Trichoderma harzianum and Trichoderma Viride and Trichoderma spp latter is not yet determined the taxonomic keys; San Miguel and Guaranda, Trichoderma harzianum and Trichoderma pseudokoningii. The species characterized during this research process demonstrate its antagonistic action of agents' pathogenic fungi that inhabit the soil (mycoparasitism).

Descriptors. Agents' drivers, Native strains, Conidia, Colonies, Localities, Mean Controlled, Culture Media, Substrate, Enzyme Substances Trichoderma.

INTRODUCCIÓN

Con el propósito de generar nuevas tecnologías de producción sanas y amigables con el ambiente. Esta investigación evaluó el comportamiento de *Trichodermas* nativos y su caracterización en tres tipos de sustratos: arroz, cebada y quinua y tres medios de cultivo: Maíz Dextrosa Agar, Trigo Dextrosa Agar, y Papa Dextrosa Agar; aislados de tres zonas deferentes Guaranda, San Miguel y Chillanes.

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable que debe ser evaluada dada sus características de biocontrolador eficaz contra fitopatogénos 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 fitopatogénos ejerciendo un efecto antagonico, debido a su ubicuidad, su facilidad para ser aisladas y cultivadas, su crecimiento rápido en un gran número de sustratos ya que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al. 1982. Citado por Cobos C.2010).

El principal beneficio para la agricultura es el antagonismo con microorganismos patógenos de las plantas, por su capacidad de producir secreciones toxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en los hongos fitopatogénos 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 oxigeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido crecimiento. (Villegas, 2000).

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.- TEMA DE INVESTIGACION

CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE *TRICHODERMAS* NATIVOS APLICANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO A NIVEL DE LABORATORIO ARTESANAL.

1.2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

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)

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. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser

eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. (Agamez, E. et al. 2008).

Investigaciones recientes han demostrado que la aplicación del *Trichoderma spp* en el cultivo del maíz y cuyas raíces han sido colonizadas por dicho microorganismo, requieren menos fertilizante nitrogenado, que el maíz no tratado; lo cual implica un ahorro del 35 al 40% de fertilizante. Conociendo que dicho cultivo demanda mucho Nitrógeno, existe la posibilidad real que las aplicaciones de nitrógeno químico, sean disminuidas, disminuyendo así los costos de aplicación y una mejora apreciable del medio ambiente. El empleo del *Trichoderma* puede beneficiar a los productores agrícolas en sus propósitos de lograr cosechas más sanas y con mayor productividad. (Agámez, E. et al, 2008.)

El género *Trichoderma spp* puede degradar pesticidas organoclorados, clorofenoles, y otros insecticidas como DDT, endosulfán, pentacloronitrobenceno, aldrin y dieldrin, herbicidas como trifluralin y glifosato. Este hongo posee enzimas tales como celulasas, hemicelulasas y xylanases que ayudan a la degradación inicial del material vegetal y por ultimo enzimas de mayor especialización que contribuyen a la simplificación de moléculas complejas como son las de biopesticidas. (Agámez, E. et al, 2008.)

Se han realizado experimentos donde se ha comprobado que la aplicación del *Trichoderma spp*, degrada algunos grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente. Esto abre las puertas hacia la descontaminación de extensas áreas de suelos que se han contaminado por el uso irracional e indiscriminado de pesticidas de un alto efecto residual, causantes de grandes daños para la salud animal y humana. (Agámez, E. et al, 2008.)

Trichoderma spp posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo a los funguicidas. Sin embargo, el nivel de resistencia difiere entre cepas. Algunas líneas han sido seleccionadas o modificadas para ser resistentes a agroquímicos específicos. La mayoría de productores de cepas de este hongo destinadas a control biológico poseen información relacionada con la susceptibilidad o resistencia a un amplio rango de agroquímicos. Esto con el fin

de que estos aislamientos sean compatibles con métodos de control aplicados, los cuales incluyen control químico. (Agámez, E. et al, 2008.)

1.2.1. Contextualización.

La utilización extensiva de compuestos químicos para el control de enfermedades, la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas y el deterioro en la salud de productores y consumidores, han promovido la búsqueda de alternativas viables que garanticen una mayor sostenibilidad en la producción agrícola, minimizando el impacto sobre el medio ambiente.

Desde 1980 Rhizobacterias y hongos biocontroladores han sido investigados como posibles alternativas de producción limpia. El empleo de agentes de control biológico (BCAs) han permitido una reducción en la aplicación de fungicidas químicos y por lo tanto un control más eficiente de patógenos causantes de enfermedades, al ser incorporadas a los programas de manejo integrado. (Tobar, C. 2008)

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 y se encuentra ampliamente distribuido en el 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. (Tobar, C. 2008)

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 crecimiento 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. (Villegas, 2005).

Falconí, 2010, manifiesta que las especies del genero *Trichoderma* spp son fáciles de aislar y obtener cultivos puros, sean estos de los más diversos escenarios ecológicos del planeta. Sus propiedades biocatalíticas constituyen el máximo criterio de multiplicación, considerando tecnologías sencillas de uno de los microorganismos contenidos en el microcosmos de cultivos del Ecuador. Esta tecnología se justifica en base a características biocatalíticas mas relevantes de cada uno de los aislados, cepas, variaciones que tienen los individuos dentro de este grupo y que influyen positivamente a los cultivos donde fueron localizados, sea como reguladores de plagas, enfermedades, estimulando la biomasa radicular o activando el sistema inmune vegetal.

El objetivo final es la de identificar y multiplicar desde el punto de vista agronómico, la función esencial de los más variados mecanismos de acción en base a los cuales posteriormente se las usara para el diseño de sistemas de inserción biocatalítica en los cultivos en los cuales se han extraído las muestras.

1.2.2. Análisis Crítico

En nuestro país los estudios o investigaciones en torno a *Trichoderma* spp son muy incipientes o se los ha realizado muy superficialmente, desaprovechando de esta manera la posibilidad de manejar problemas fitopatológicos a muy bajos costos y sin riesgos para el medio ambiente.

La posibilidad de aislar y caracterizar especies de *Trichoderma* spp, nativos mediante procesos sencillos y artesanales utilizando diferentes sustratos y medios de cultivo es una alternativa que contribuirá a generar información útil para la consecución de herramientas que permitan la obtención de posibles productos

agroecológicos con aislados nativos de *Trichoderma* spp, los cuales se puedan experimentar en el campo para el control de enfermedades fúngicas. (Falconí, 2010)

Muchos hongos habitantes del suelo subsisten en las plantas vivas de diversos cultivos, causando grandes daños a las raíces y otras partes subterráneas de las plantas, lo que interfiere seriamente con su desarrollo. Entre los hongos del suelo que causan grandes pérdidas están: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, los cuales afectan a una gran cantidad de cultivos (algodón, arroz, cacahuate, café, cebolla, pimiento, tabaco, tomate, etc.). (Agrios, 2005).

Los daños ocasionados por estos patógenos varían de acuerdo con el año, lugar, cultivo y problema del que se trate. Sin embargo, hay reportes que los cuatro hongos tienen una incidencia de alrededor de 79.8% (Garza, 1996; Velásquez et al., 2004), estos patógenos pueden llegar a causar pérdidas de un 40 a 70% cada año en el cultivo de (Rincón y Velásquez, 1999). El monto de las pérdidas varía: para *Phytophthora infestans* las pérdidas oscilan alrededor del 40 al 70% en función de la variedad y las condiciones ambientales. Su aparición temprana puede llevar a la pérdida total de la cosecha y se calcula que los daños económicos ascienden sólo en los países en desarrollo a 2.7 millones de dólares (Hausladen, 2006). Actualmente, las medidas utilizadas para el control de las enfermedades del suelo son el uso de productos químicos; sin embargo, su uso indiscriminado ha tenido grandes consecuencias y se han encontrado aislamientos de hongos resistentes a fungicidas; por ejemplo, *Rhizoctonia solani* resistentes a fungicidas (Hernández, et al, 2005), y para *Phytophthora* sp. resistente a metalaxil (Riveros, et al., 2003). También hay evidencias importantes de una grave contaminación derivada de los plaguicidas, que no sólo afecta a la flora y la fauna que han sido expuestas en forma significativa a dichas sustancias, sino también han contribuido al deterioro de la calidad del aire, agua, suelos y alimentos, así como también de la salud de jornaleros y consumidores (Albert, 2004).

1.2.3. Prognosis.

Trichoderma spp es empleado como bioagente para el control de diferentes fitopatógenos, por lo que ha contribuido a sustituir en muchos cultivos las aplicaciones de pesticidas químicos, que son más caros y dañinos a la salud de las personas y de los animales. Ello ha posibilitado la producción de alimentos sanos y ecológicos, potenciando de manera significativa una Agricultura Orgánica en correspondencia con las actuales necesidades de los consumidores.

Por ello es necesario y fundamental ir generando nuevas tecnologías en cada uno de los Agroecosistemas dentro de la producción agrícola que vayan garantizando productos sanos y de calidad a través de la utilización de biocontroladores como *Trichoderma* spp.

1.2.4. Formulación del problema.

Será posible la caracterización morfológica y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal”

1.2.5. Interrogantes (subproblemas)

¿En qué sustratos existirá mayor presencia de colonias de *Trichoderma*?

¿En qué medio de cultivo se logrará aislar y purificar de mejor manera las cepas de *Trichoderma*?

¿En qué medios de cultivo los aislados de *Trichoderma* tendrán mejor comportamiento? .

¿Es qué medio de cultivo se logrará caracterizar y clasificar la morfología de *Trichoderma* nativo?.

1.2.6. Delimitación del Objeto de investigación.

Cepas de *Trichoderma* capturadas en tres zonas, de la provincia Bolívar, Guaranda, San Miguel y Chillanes.

1.2.6.1. Delimitación geográfica.

Recolección de muestras de *Trichoderma* spp en los siguientes sectores

Cantón Guaranda, parroquia Santa Fe, Comunidad El Tuso, Cantón Chillanes, parroquia Matriz, comunidad San Juan Pamba, Cantón San Miguel, parroquia San Vicente, comunidad San Vicente.

Para el proceso de aislamiento y caracterización, se trabajó en el laboratorio artesanal perteneciente a la Dirección Provincial Agropecuaria de Bolívar, (MAGAP), ubicado en la ciudad de Guaranda.

1.2.6.2. Delimitación Temporal.

Esta investigación se inició en septiembre del 2013 hasta Marzo del 2014, con la colocación de recipientes con los sustratos en las zonas antes indicadas y posteriormente con la caracterización y clasificación de *Trichoderma* spp.

1.3.-JUSTIFICACION.

La agricultura constituye el 68 % de la actividad económica base de la Provincia de Bolívar, pues gracias a las ventajas comparativas del territorio (diversidad de climas, suelos, topografía, etc.), ha sido posible generar una variedad de productos, entre ellos se encuentra el cultivo de trigo, maíz, cebada, papa, lenteja, fréjol y arveja en las zonas altas y la producción de café, banano, caña y frutas como la mandarina y la naranja en el subtrópico, pero lamentablemente este sector presenta una serie de deficiencias de carácter técnico y crediticio que se asocian con la tradicional forma de comercialización y las labores de manejo de los

cultivos en una gran proporción se realizan en condiciones desfavorables contribuyendo a ocasionar contaminación, erosión-eólica e hídrica. La poca productividad se ve afectada por la falta de tecnificación y la escasa asistencia técnica que da como resultado que los rendimientos de la producción cada vez vayan decreciendo y hoy lo vuelve poco competitivo y rentable. (Paredes, 2012)

En el presente proceso de investigación, se establece la validación para la caracterización y clasificación de *Trichoderma* spp con la finalidad de determinar la potencialidad y debilidad inherente frente a diferentes medios de cultivo, lo cual puede contribuir de manera significativa en el establecimiento de estrategias que permitan dinamizar el sector agropecuario que basa su producción en tecnologías amigables con el medio ambiente.

1.4. OBJETIVOS.

1.4.1. General

- Evaluar diferentes sustratos y medios de cultivo para la captura de cepas y caracterización morfológica de *Trichoderma* spp. nativos en las zonas de Guaranda San Miguel y Chillanes.

1.4.2. Específicos

- Aislar y purificar cepas nativas de *Trichoderma* spp. en los diferentes medios de cultivo
- Describir morfológicamente las cepas aisladas.
- Determinar el comportamiento de las cepas de *Trichoderma* sp., frente a los diferentes medios de cultivo

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES DE INVESTIGACION.

Las especies de *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas por cerca de 70 años pero es solo recientemente que las cepas han comenzado a ser comercialmente aprovechadas. El éxito de las cepas de *Trichoderma* spp como (BCAs), es debido a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorable, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizosfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción de crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa. Estas propiedades han hecho que *Trichoderma* spp se presente en cualquier habitad en alta proporción. (Benítez y Rincón 2004).

Liu y Baker en 1980; Chet y colaboradores en 1987, demostraron que especies de *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma hamatum* fueron especialmente eficientes en el control de patógenos como *Rhizoctonia solani*. Varios aislamientos de *Trichoderma harzianun* se han utilizado exitosamente en el control de algunas enfermedades ocasionadas por *Rhizoctonia solani* como dampig off en tomate, pudriciones radiculares en plantas de frejol, podredumbre negra en raíz en fresa, pudrición de tallos en clavel, pudrición de raíz en habas y mal de tallo en café. (Gracia et al. 2005).

Cobos, G. 2010. En su trabajo de investigación de “Evaluación de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. para el control de Sigatoka Negra (*Paracercospora fijiensis* m.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio” obtiene los siguientes resultados recolecta, aisla, selecciona, identifica y caracteriza morfológica y molecularmente las cepas nativas de *Trichoderma* spp de varias zonas bananeras del país, con potencial de ser usadas como medida de control alternativo para la Sigatoka Negra del banano. El potencial antagónico de

Trichoderma spp frente al agente causal *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cuya forma imperfecta se denomina *Paracercospora fijiensis* Morelet, se evaluó mediante un ensayo de acción inhibitoria in vitro. Se analizaron 11 cepas de *Trichoderma* spp. recolectadas de diferentes zonas bananeras del país s y 3 cepas de *Trichoderma* spp. del banco de cepas del laboratorio de fitopatología (IASA II). El mejor control antagónico de *Trichoderma* spp. contra el patógeno *Paracercospora fijiensis* se obtuvo con los tratamientos T4, T9 y T11 correspondientes a las cepas recolectadas en las localidades de Paisaje, Machala y Bonanza. Estos tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas entre 84% y 90%. 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.

Yumbay, M. 2011, en su investigación determinó la eficiencia de varias cepas de *Trichoderma* spp. nativas (Florícola San Alfonso) y una cepa exótica (cepa C19 de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA – ESPE) en el control del hongo fitopatógenos *Botrytis cinérea* . Se aislaron 21 cepas nativas de la florícola San Alfonso, las cuales, junto con la cepa C₁₉ fueron sometidas a pruebas de crecimiento radial y pruebas de antagonismo in vitro en el laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA – ESPE. Posteriormente se seleccionaron dos cepas nativas (8_a y 7b) que presentaron los mejores resultados en las variables que se evaluaron y la cepa exótica (cepa C₁₉) para elaborar el bioformulado y aplicarlo en campo. A nivel de campo se realizó la aplicación de los bioformulados en tres variedades de rosas (Freedom, Amelia y Dekora; los cuales fueron evaluados durante todo un ciclo productivo luego de la ejecución de un pinch a todos los tallos). Los tratamientos estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales y al mismo manejo. Para la aplicación de los tratamientos se utilizaron cortinas móviles para evitar el efecto de borde durante el empleo de fungicidas sistémicos, sólo recibían

productos protectantes durante todo el tiempo de evaluación. Las variables que se midieron fueron: severidad en cámara húmeda, incidencia y severidad en el campo.

En trabajos realizados por Stefanova, M. (1999), se señala el flujo de producción de un biopreparado de *Trichoderma* en cultivo bifásico líquido-líquido y líquido-sólido, utilizando como medio melaza-levadura, obteniendo concentraciones de conidios de $2-3 \times 10^8$ /ml, en la fermentación líquida, y con la sólida de $2-3 \times 10^9$ conidios/g. La producción semi-industrial e industrial de *Trichoderma*, es una alternativa tecnológica muy eficiente desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de biofungicidas de alta calidad, involucra procesos estandarizados con el control de variables como humedad temperatura y flujo de aireación. Este último muy importante puesto que puede mejorar la cantidad y calidad de las esporas producidas. (Agosin et ál., 1997).

En Colombia, el arroz es el sustrato más utilizado para la producción de biopreparados de *Trichoderma* sp. a partir de procesos de fermentación artesanal e industrial. En la actualidad la empresa Sanatrade S.A. elabora un producto llamado Tricho-D el cual tiene como ingrediente activo al hongo *Trichoderma harzianum*, conocido como un bio-regulador y antagonista natural de los fitopatógenos, este producto es utilizado en Colombia en investigaciones para la protección de zocas del café frente al ataque de *Cerotocystis fimbriata*. (Castro y Rivillas, 2003).

2.2. FUNDAMENTACION FILOSOFICA.

La mayoría de las enfermedades de las plantas se controlan con fungicidas químicos los cuales se aplican al suelo, semillas, follaje y el fruto, generando consecuencias negativas de contaminación para la salud, el ambiente, la residualidad y el desarrollo de resistencia, esto ha generado buscar alternativas utilizando microorganismos cuya actividad biológica disminuye el daño causado por los patógenos de las plantas.

El *Trichoderma* probablemente sea el hongo benéfico, más versátil y polifacético que abunda en los suelos. No se conoce que dicho microorganismo 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; debido a ello, muchos investigadores le llaman el hongo hiperparásito. Ello convierte al *Trichoderma* en un microorganismo de imprescindible presencia en los suelos y cultivos, y de un incalculable valor agrícola. (Falconí, 1997).

2.3. FUNDAMENTACION LEGAL.

El presente proceso de investigación se fundamenta en la **constitución del 2008 de la república del Ecuador. En la cual dice:**

Art. 14.- Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*.

Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Art. 15.- El Estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho al agua.

Se prohíbe el desarrollo, producción, tenencia, comercialización, importación, transporte, almacenamiento y uso de armas químicas, biológicas y nucleares, de contaminantes orgánicos persistentes altamente tóxicos, agroquímicos internacionalmente prohibidos, y las tecnologías y agentes biológicos experimentales nocivos y organismos genéticamente modificados perjudiciales para la salud humana o que atenten contra la soberanía alimentaria o los

ecosistemas, así como la introducción de residuos nucleares y desechos tóxicos al territorio nacional.

2.4. Categorías Fundamentales.

2.4.1. Características del genero *Trichoderma*

El género *Trichodermas* spp es un hongo aislado del suelo que se reproduce asexualmente, es un hongo filamentosos anamorfo, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesta de quitina de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólido, líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Harman et al. 1981).

El género *Trichoderma* spp es uno de los más estudiados, entre numerosos agentes de control biológico, por sus características de antagonismo en condiciones naturales. El se comporta como hiperparásito frente a diversos patógenos, atacando directamente y produciendo la ruptura del micelio de los hongos productores de enfermedades de las plantas. (Arcia, A. 2006)

Las especies de este género son hongos de vida libre, altamente interactivos en las raíces suelo y ambiente foliar, también se ha descrito en este género una gran capacidad de inactivar exudados originados en las semillas en germinación, que estimulan el desarrollo de propágulos de hongos patógenos de plantas en el suelo, (Howell, 2002; Harman 2004), su estudio ha estado dirigido a aumentar la densidad del inóculo, mediante prácticas agrícolas o por introducción directa en el suelo. (Papavizas, 1985).

El género *Trichoderma* spp se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, encontrándose en prácticamente todos los suelos y otros hábitats naturales, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica. *Trichoderma* spp es un colonizador secundario pudiendo ser aislado de materia orgánica descompuesta, superficie de raíces de plantas, madera en descomposición y en esclerocios o propágulos de otros hongos. (Papavizas, 1985).

1.4.2. Clasificación Taxonómica.

Las especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* spp han sido plenamente caracterizadas por tener aplicación en el ámbito agrícola, principalmente para el control biológico de otros organismos patógenos que atacan a los cultivos.

1.4.2.1. Características Generales

Clasificación propuesta por Rifai, 1969

Hongos	filamentosos.
Reino:	<i>Fungi</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Hypocreaceae</i>
Género:	<i>Trichoderma</i>

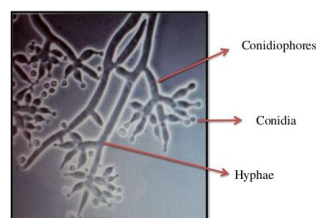
1.4.3. Morfología

Trichoderma spp es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesto por quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos. (Harman G. 1998).

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

La mayoría de cepas de *Trichoderma* spp no poseen etapa sexual, por lo que producen únicamente esporas asexuales. Sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas cepas, pero no han sido consideradas para propósitos de biocontrol. La etapa sexual cuando está presente, corresponde a *Hypocrea*, que es un hongo Ascomycotina.

Las cepas de *Trichoderma* a menudo son rápidamente identificadas en su género por sus características morfológicas distintivas, que incluye rápido crecimiento, el color de las conidias es verde intenso o blanco y una gran cantidad de ramificaciones, pero de manera diferente una pobre estructura de conidióforos. (Gams & Bisett, 1998).



Singh, et. al 2007

Gráfico 1. Morfología externa de *Trichoderma* spp

1.4.4. Mecanismos de acción.

Trichoderma spp como antagonista, puede tener diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentran el micoparasitismo, competencia, antibiosis e inducción de resistencia en las plantas. Este proceso de micoparasitismo sería uno de los principales mecanismos involucrados en el antagonismo de *Trichoderma* como agente biocontrolador. (Elad et al, 1993).

Este proceso incluiría el crecimiento del antagonista hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o formando estructuras similares a ganchos o apresorios en la superficie del hospedero, que le permitirían, penetrar al interior (del patógeno) y por acción de enzimas líticas (quitinasa y β -1,3-glucanasa) degradar su pared celular (Elad et al, 1993).

La competencia por sustrato y nutrientes sería otro mecanismo que explicaría el efecto antagónico de *Trichoderma* spp. Este proceso ocurre cuando dos o más organismos requieren el mismo recurso y el uso de éste por uno, reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia fundamentalmente se produce por recursos esenciales como carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico. Un mecanismo que recientemente ha ganado adherentes es la competencia que se produce a nivel de la rizosfera cuando se aplican cepas de *Trichoderma* spp a las semillas, produciéndose un rápido crecimiento en conjunto con el desarrollo radicular de las plantas tratadas, compitiendo entonces a este nivel por nutrientes y espacio. (Howell et al 2000).

La actividad antibiótica de *Trichoderma* spp se debería a la secreción de sustancia antibióticas o metabolitos que inhiben la actividad parasítica de los patógenos (Dubos,1987). Estos metabolitos serían volátiles y no volátiles, del tipo antibióticos como viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide (Lumsden et al 1992). De todas estas micotoxinas la más representativa es

Trichodermin que actuaría inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos, por lo tanto su reproducción. (García, R. 2005).

Otro mecanismo propuesto para explicar la actividad biocontroladora de especies de *Trichoderma*, es la inducción de resistencia en las plantas hospederas tratadas con el agente biocontrolador. Este concepto ha sido fundamentado por Yedidia et al 1999 y Yedidia et al 2000, quien demostró que raíces de cucurbitáceas inoculadas con *T. harzianum*, presentan una respuesta defensiva tanto en las raíces como en las hojas de las plantas tratadas, demostraron que las hifas del hongo biocontrolador penetran la epidermis y corteza superior de la raíz de la cucurbitácea. La planta responde con una marcada actividad de la enzima peroxidasa frecuentemente asociada con la producción de fungitoxinas, un incremento en la actividad quitinasa y la deposición de celulosa en la superficie interna de la pared celular. Se ha comparado esta relación a la que se establece entre vegetales y micorrizas. Se han identificado tres tipos de compuesto producidos por cepas de *Trichoderma* que son responsables de inducir resistencia en las plantas, entre ellas se encuentran: proteínas con función enzimática, homólogos de proteínas, oligosacaridos y otros compuestos de bajo peso molecular, que son liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de enzimas de *Trichoderma* spp. (Baker et al, 1995)

2.4.5. Aplicaciones y resultados del uso de *Trichoderma* en el control de patógenos de plantas.

Se han investigado diferentes formas de aplicación de *Trichoderma* spp, tanto a nivel de suelo como en el filoplano (superficie de las hojas), para aumentar sus poblaciones e incrementar su capacidad de control, esto debido principalmente a la naturaleza saprofítica y a la versatilidad nutricional de este antagonista, que lo capacita para crecer sobre los mismos sustratos utilizados por los patógenos. Numerosos trabajos señalan a distintas especies de *Trichoderma* spp como importantes agentes de biocontrol de enfermedades producidas por un amplio rango de patógenos, entre los cuales están *Armillaria mellea*, *Phytophthora* spp,

Phytophthora spp, Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Botrytis cinérea y Fusarium spp. (Chet, 1987).

Se ha demostrado que *Trichoderma* spp es capaz de colonizar las flores desplazando al patógeno de su habitual sitio de infección, constituyendo ésta la principal forma de antagonismo contra *B. cinerea*, además produce enzimas capaces de degradar las paredes celulares de este patógeno, (Chet, 1987). Por ello se recomiendan los tratamientos con *Trichoderma* spp durante etapas tempranas, desde la floración, tanto para vid como frutillas. (Dubos et al 1983).

A partir de evaluaciones de la capacidad inhibitoria de algunos antagonistas, aislados de huertos de manzano, sobre la producción de pseudotecios y ascosporas de *Venturia inaequalis* se realizaron aplicaciones foliares de algunos antagonistas para el control de *V. inaequalis* en otoño, logrando una reducción significativa en la producción de ascosporas, tanto en hojas incubadas a temperatura controlada, como en el huerto. De estos antagonistas, *Trichoderma* redujo un 75,2% la producción de ascosporas, indicándolo como un importante y potencial controlador del inóculo inicial de este patógeno.(Philon et al, 1997)

Aplicaciones de antagonista, directas al suelo o mezcla con sustratos de crecimiento han logrado un eficiente control para diversos patógenos principalmente los relacionados con la caída de plantas. Tres aislados de *Trichoderma* y *Gliocladium virens*, tolerantes a bajas temperaturas y con actividad antibiótica a *Phytophthora cactorum* fueron evaluadas para el control de la pudrición radical y de la corona del manzano en plantas de invernadero obteniendo una significativa reducción en el daño de las raíces y un incremento en el peso de las plantas. A partir de aislados de 48 cepas de *Trichoderma*, recolectadas en el país, resultaron a nivel de laboratorio, 10 cepas, capaces de inhibir en un rango de 20 a 45% el crecimiento de *Phytophthora cryptogea*, en manzanos supresora de patógenos, numerosos estudios indican a este antagonista, como promotor o estimulador del crecimiento de las plantas. Esto último es producto de su capacidad colonizadora, que permite controlar o eliminar a los

patógenos, así como sobrevivir por largos periodos en la rizósfera utilizando los exudados de las superficies radiculares, lo que además les proporciona una protección a cierto estrés de tipo físicos, determinando un rápido crecimiento de las raíces. (Villegas M. 2005).

Domínguez, 1994. Manifiesta que los antagonistas además de ser incorporados al suelo junto con la materia orgánica (compost) o aplicados directamente por aspersión, como en los casos anteriores, también pueden ser inoculados a las semilla, revistiéndolas con *Trichoderma* como alternativa para introducir el agente al suelo, producir el establecimiento y multiplicación del antagonista en las raicillas y de esta forma reducir el damping-off producido por *R. solani*, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *Fusarium* spp y *Pythium* spp .

Campell, 1989 describe el uso de *Trichoderma* spp para el control de *Verticillium albo-atrum* en tomate, melón y algodón logrando un control de un 60-80% en suelos naturalmente infestados. El antagonista se aplicó en la semilla como en la mezcla de suelo utilizada en el trasplante. La misma respuesta se encontró en crisantemos. En ambos casos el mecanismo de acción correspondería a Antibiosis.

2.4.6. Aislamientos Nativos.

El desarrollo de una tecnología para la producción de un agente de control biológico debe dar énfasis a la obtención de aislamientos nativos, ya que estos presentan un comportamiento que se adecua a las condiciones agroecológicas regionales. Esta búsqueda se organizará en base a recorridos de campo, que permitan la obtención de muestras en lugares donde los patógenos de interés se manifiesten con un bajo índice de infección. Como ejemplo de esto es recomendable buscar en ecosistema con baja intervención humana, como quebradas, rodales de bosques nativos y regiones apartadas de los campos agrícolas, así como en zonas rurales que no utilizan agroquímicos y el manejo de la nutrición se base en el uso materia orgánica. (Domínguez, T. 1994)

La toma de muestras se puede realizar en mantillo de bosque nativo, corteza vegetal y madera en descomposición. En algunos casos es posible identificar colonias de *Trichoderma* en distintos estados de crecimiento. La toma de muestra se realiza en bolsas de polipropileno, cerrándolas para evitar su desecamiento. Domínguez, T. (1994).

El procesamiento de ellas se efectúa, tomando submuestras de 20 a 30 gramos que se distribuyen en placas en cámara húmeda por un período de 7 a 10 días, con observaciones diarias hasta la aparición de colonias de hongos con crecimientos similares a los de *Trichoderma* Cuando la toma de muestra se realiza a nivel de suelo, estas se extraen entre los 10-30 cm. De profundidad. (Domínguez, T. 1994)

2.4.7. Formas de conservación de Microorganismos

2.4.7.1. Cepario de Conservación.

Entre las técnicas más comunes de conservación se encuentran:

- ✓ Cepario en tubo de cultivo
- ✓ Cepario en sílica gel
- ✓ Cepario liofilizado
- ✓ Cepario en Nitrógeno líquido

Todos los aislamientos se mantendrán en un cepario de conservación, aún aquellos que no tengan un grado de antagonismo alto, pues pudieran servir en el futuro para otros estudios. Una técnica muy efectiva de conservación consiste en separar los conidios del sustrato donde se reprodujo el antagonista y obtener de este modo los conidios puros, los conidios así obtenidos, con un contenido de humedad entre 5-10%, pueden ser almacenados por un tiempo prolongando conservando su viabilidad. (Chet. 1987).

2.4.6.2. Cepario en tubo de cultivo

Los aislamientos que resulten promisorios una vez realizadas las pruebas de antagonismo se destinarán al cepario de trabajo. El cepario de trabajo se mantendrá en tubos de cultivo, en cuñas de PDA, Sabouraud dextrosa agar, Agar malta, cualquier medio rico en nutrientes es suficiente para su mantenimiento. Para preservar el hongo por un período de tiempo mayor se utilizan medios no inclinados sobre los que se siembra el hongo (7-10 días), posteriormente se cubre con aceite mineral, este método tiene como ventaja que no necesita renovar la cepa con tanta frecuencia como las mantenidas en cuñas de agar, el hongo puede mantener una mayor longevidad y estabilidad aunque el método sea más laborioso. (Domínguez, T. 1994)

2.4.6.3. Cepario en sílica gel.

Se introduce sílica gel en tubos con tapa rosca y se esterilizan con calor seco durante 3 horas a 180 °C y luego se enfrían en un baño de hielo durante algunas horas, luego se prepara una suspensión de conidios con 5% de leche descremada, (función crioprotectora), y se le incorpora a los recipientes con sílica en la proporción de 0,5 ml para 4 gramos de sílica. Se deja reposar por 15 minutos en baño de hielo para finalmente permanecer en un ambiente seco por 15 días. Estos recipientes se pueden conservar a 4 °C. Para la reutilización de las cepas basta tomar unos 4 cristales de sílica y pasarlos por un medio nutritivo adecuado. Domínguez, T. (1994)

2.4.6.4. Cepario liofilizado

La liofilización es un proceso de secado rápido en frío, bajo presión reducida (vacío), Se prepara una suspensión conidial del hongo que se desea conservar, se puede utilizar como soporte leche en polvo descremada al 11% y como crioprotector glutamato de sodio al 5%. Se coloca en una liofilizadora, se cierran

al vacío y se almacenan. Para reactivar los bulbos liofilizados se les añade suero fisiológico al 0,9 % o agua con Tween- 80 al 0,1 %. (Domínguez, T. 1994)

2.4.6.5. Cepario en Nitrógeno líquido.

En nitrógeno líquido se alcanzan temperaturas de -196 °C, lo que permite conservar los organismos casi de manera indefinida. Se debe utilizar un agente crioprotector para evitar el daño de las conidias durante el proceso de congelamiento y descongelado del antagonista. La mezcla crioprotectora esta compuesta por agua destilada estéril, 10 % de glicerol o 15 % de sulfato de dimetila, en la cual se suspenden las conidias. Luego de agitar la mezcla (con las conidias) se coloca 1,8 ml de ella en tubos de vidrio borosilicatado, (criotubos), estos son llevados a -20 °C por 2 horas para una preadaptación al frío y permitir que el crioprotector penetre y envuelva al microorganismo. Posteriormente son llevados a los recipientes con Nitrógeno líquido. Manual de producción y utilización de *Trichoderma* spp. (Domínguez, T. 1994)

2.4.8. Producción Limpia

Trichoderma spp, 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. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. (Boletín Técnico de Producción N°. 30, 2003)

2.4.8. 1. Captura de Microorganismos

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. Pertenece a la subdivisión Deuteromycetes 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. Manual de producción y utilización de *Trichoderma* spp. (Boletín Técnico de Producción N°. 30, 2003)

El *Trichoderma* spp posee aislamientos con poderes antibióticos, los cuales actúan contra varios microorganismos fitopatógenos. Se comporta como saprofito en la rizosfera, siendo capaz de destruir residuos de plantas infectadas por patógenos. Se considera que su acción es antagonista, siendo capaz de sacar el mejor provecho por su alta adaptación al medio y por competir por el sustrato y por espacio. La importancia del hombre en esta relación radica en saber manejar las especificidades de cada uno para lograr que prevalezca la interacción a favor de la planta y el antagonista. Manual de producción y utilización de *Trichoderma* spp. (Boletín Técnico de Producción N°. 30, 2003).

2.4.8 2. Caracterización e Identificación de microorganismos.

Para aislar a *Trichoderma* spp de las muestras de suelo, se utilizara diferente medios. Las colonias de *Trichoderma* spp se reconocerán en base a su morfología con ayuda de un microscopio. La identificación de los aislados de *Trichoderma* se realizara mediante estudios morfológicos de colonias creciendo sobre los medios. Para observar las características de los conidióforos y conidias (esporas) se utilizara un microscopio compuesto, utilizando las técnicas de campo claro, y contraste de fases. Se medirán las siguientes estructuras: conidias, fialides, y clamidosporas. Para la identificación de las especies de *Trichoderma* spp se usaran claves taxonómicas. (Guigón, C. 2010).

2.4.9. Medios de Multiplicación de *Trichodermas*.

En los hongos, se necesita que la fuente C esté en exceso en el medio o sustrato y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo. Los inóculos se preparan a partir de subcultivos de preinóculos a una concentración final en el sustrato inoculado de propágulos/g.

Los preinóculos pueden desarrollarse sobre sustratos sólidos (grano arroz, grano trigo, cáscara de trigo, cáscara de arroz, harina de maíz, etc.) incluyendo los medios agarizados de cultivo o por cultivos líquido estático o agitado (compuestos por combinaciones de materias primas carbonadas y nitrogenadas como melaza de caña de azúcar, licor de maíz, almidón de maíz, sacarosa, extracto de levadura, extracto de levadura cervecera, etc.) siendo el objetivo fundamental la obtención de una biomasa homogénea. La relación carbono (C): Nitrógenos (N) es esencial y de este balance en lo fundamental dependerá el que se logre la formación de los propágulos deseados. (Claro, 2006).

2.4. HIPOTESIS.

H₁. Con la utilización de diferentes sustratos y medios de cultivo **SE** logrará la captura y caracterización de *Trichoderma* nativos.

H₀. Con la utilización de diferentes sustratos y medios de cultivo **NO** se logrará la captura y caracterización de *Trichoderma* nativos.

1.5. Señalamiento de las variables.

2.5.1. Variable Independiente: Medios de cultivo y sustratos

2.5.2. Variables dependientes: *Trichoderma* spp

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Enfoque

La presente investigación tiene un enfoque cualitativo y cuantitativo, ya que a través de la utilización de varios sustratos trata de capturar colonias de *Trichoderma* spp y aislados en los diferentes medios de cultivo trata de caracterizar y clasificar microorganismos benéficos (*Trichoderma* spp); e intenta proponer un esquema de producción encaminada al uso de agentes biológicos con la finalidad de desarrollar procesos productivos amigables para el ambiente.

3.2. Modalidad Básica de la Investigación

3.2.1. De campo. La obtención de muestras se realizó en campo abierto, en donde se colocó las trampas nutricionales de arroz, quinua y cebada en la raíz de plantas de papa (*Solanum tuberosum*), en un periodo de 12 días se obtuvo la información mediante la observación directa de colonias con características de *Trichoderma* spp

3.2.2. Bibliográfica-Documental. Se realizó un sustento en las investigaciones documentadas y validadas, facilitando la evaluación y el análisis de toda la información recopilada a través de libros, revistas científicas, folletos, publicaciones e internet.

3.2.3. Experimental. Se realizó el aislamiento correspondiente de cada muestra obtenida en el campo y se aisló en el laboratorio; a través de la utilización de modelos de experimentación nos permitió llegar a un análisis de los resultados obtenidos a partir de los datos generados durante el proceso investigativo con lo que se verificó la influencia de los factores de las variables de interés, es decir se manejaron variables establecidas en forma intencional.

3.3. Nivel o tipo de Investigación.

3.3.1. Explicativo. Se trató del conocimiento de la eficiencia de *Trichoderma* en los tratamientos empleados, obteniéndose una explicación técnica y científica con los resultados obtenidos.

3.4. Población y Muestra.

Por tratarse de un estudio experimental a nivel de laboratorio no se establecieron muestras.

3.5. Operacionalización de las Variables.

Durante la investigación se determinaron algunos indicadores que se fueron monitoreando; tales como adaptación, crecimiento, color, olor y concentración de conidios de *Trichoderma* spp en cada medio de cultivo. Estas variables se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Operacionalización de las variables independiente y dependiente

VARIABLE	DEFINICION	INDICADORES	ITEMS
INDEPENDIENTE:			
Medios de cultivo y Sustratos	Material alimenticio para la captura y el crecimiento de colonias de microorganismos	Medios de cultivo Sustratos	Papa Dextrosa Agar, Maíz Dextrosa Agar, Trigo Dextrosa Agar Arroz, cebada, quinua
DEPENDIENTE			
<i>Trichoderma</i>	Es un hongo que se encuentra de forma natural en el suelo que tiene efectos benéficos para la agricultura.	Tasa de Crecimiento Diario. Biomasa. Caracterización.	mm/día, No de esporas por medio de cultivo Descripción de morfología Taxonomía Bioquímica

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

3.6. Plan de recolección de Información.

La información generada se recopiló mediante la observación directa y el análisis tanto en laboratorio como en campo, dicha información fue registrada en una libreta de campo, los datos tomados fueron:

- Trampa nutricional con mayor población de *Trichoderma* spp tomando en cuenta las zonas
- Número de días en el que apareció la colonia en cada uno de los sustratos y en cada zona
- Medio de cultivo que pobló en menor tiempo el *Trichoderma* spp
- Características morfológicas de *Trichoderma* en cada uno de los tratamientos
- Número de esporas contenidas en los medios de cultivo. Maíz Dextrosa Agar, Trigo Dextrosa Agar y Papa Dextrosa Agar.

Para determinar el número de esporas contenidas en cada tratamiento se empleó la siguiente fórmula propuesta por Falconí, C. 2010.

$$N = \frac{\text{Numero de esporas contadas}}{\text{Superficie recontada (0,1mm}^2\text{) x profundidad de la cámara (0,025mm) x dilución}}$$

Es decir.

Número de células: En cada medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, Trigo Dextrosa Agar, Papa Dextrosa Agar.

Superficie recontada: 0.1mm²

Profundidad de la cámara 0.1mm²

Dilución: 1x10⁻³= 1/1000.

3.7. Plan de Procesamiento y Análisis.

Para los datos obtenidos en la investigación se aplicó un análisis estadística descriptiva y pruebas de significación para los resultados que fueron significativos.

3.8. MANEJO DEL ENSAYO.

3.8.1. Materiales de Campo

Trampas nutricionales (vasos plásticos, ligas y gasa) con sustrato de arroz, quinua y cebada para *Trichoderma*, cultivo de *Solanum tuberosum*, fundas transparentes, bandejas para recolección de muestras, paletas y azada.

3.8.1.2. Materiales de Laboratorio

- Material de vidrio: Cubre objetos, porta objetos, tubos de ensayo, pipetas graduadas
 - Equipos: Balanza analítica, incubadora, autoclave, microscopio, cámara de Newbauer, agitador y refrigerador.
 - Otros materiales: Material de papelería, papel toalla, mechero de alcohol, cajas de Petri de plástico, aza de platino, estilete, alcohol antiséptico y alcohol industrial, agua destilada.

3.8.2. FACTORES EN ESTUDIO.

a. Factor A. Localidades: Guaranda, San Miguel y Chillanes.

b. Factor B. Sustratos: Arroz, quinua y cebada.

c. Factor C. Medios de Cultivo: TDA (Trigo Dextrosa Agar), MDA (Maíz Dextrosa Agar), PDA (Papa Dextrosa Agar).

Tabla 2. Tratamientos de los sustratos colocados en las diferentes zonas

Localidad	Sustrato	Código	Repetición
Guaranda (G)	Quinoa (Q)	G.Q.Papa	3
	Cebada (C)	G.C.Papa	3
	Arroz (A)	G.A.Papa	3
San Miguel (S.M)	Quinoa (Q)	S.M.Q.Papa	3
	Cebada (C)	S.M.C.Papa	3
	Arroz (A)	S.M.A.Papa	3
Chillanes (CH)	Quinoa (Q)	CH.Q.Papa	3
	Cebada (C)	CH.C.Papa	3
	Arroz (A)	CH.A.Papa	3

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

Tabla 3. Tratamientos en diferentes medios de cultivo

Localidad	Sustrato	Medios de cultivo	Código	Nº de Repeticiones
Guaranda	Quinoa	PDA	Quinoa PDA G	3
		TDA	Quinoa TDA G	3
		MDA	Quinoa MDA G	3
	Cebada	PDA	Cebada PDA G	3
		TDA	Cebada TDA G	3
		MDA	Cebada MDA G	3
	Arroz	PDA	Arroz PDA G	3
		TDA	Arroz TDA G	3
		MDA	Arroz MDA G	3
San Miguel	Quinoa	PDA	Quinoa PDA S.M	3
		TDA	Quinoa TDA S.M	3
		MDA	Quinoa MDA S.M	3
	Cebada	PDA	Cebada PDA S.M	3
		TDA	Cebada TDA S.M	3
		MDA	Cebada MDA S.M	3
	Arroz	PDA	Arroz PDA S.M	3
		TDA	Arroz TDA S.M	3
		MDA	Arroz MDA S.M	3
Chillanes	Quinoa	PDA	Quinoa PDA CH	3
		TDA	Quinoa TDA CH	3
		MDA	Quinoa MDA CH	3
	Cebada	PDA	Cebada PDA CH	3
		TDA	Cebada TDA CH	3
		MDA	Cebada MDA CH	3
	Arroz	PDA	Arroz PDA CH	3
		TDA	Arroz TDA CH	3
		MDA	Arroz MDA CH	3

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

3.8.3. Ubicación Geográfica.

Provincia: Bolívar

Cantón: Guaranda

Parroquia: Veintimilla.

Lugar: Vivero la Playa Dirección Provincial Agropecuaria de Bolívar (MAGAP)
Laboratorio Artesanal.

La presente investigación se sujetó a la siguiente metodología.

3.8.4. Obtención de la muestra.

La trampas para la captura de *Trichoderma* spp, se lo realizó en tres zonas las mismas que se describen en la Tabla 4

Tabla 4. Zonas en las cuales se ubicaron las trampas nutricionales.

Provincia	Cantón	Parroquia	Comunidad/Recinto	COORDENADAS		
				X	Y	Z
Bolívar	Guaranda	Santa Fe	El Tuso Bajo	720133	9819318	2645
	San Miguel	San Vicente	San Vicente	720263	9809951	2389
	Chillanes	Matriz	San Juan Pamba	715747	9785664	2364

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

3.8.5. Preparación de Sustrato

La preparación de los diferentes sustratos se lo realizó de la siguiente manera.

3.8.5.1. Sustrato de quinua. Se pesó en una balanza digital 1 libra de quinua, la misma que se lavó con agua caliente y se la dejó reposar durante una noche con la finalidad de eliminar la saponina. Al día siguiente se lavó nuevamente con agua caliente hasta que el agua estuvo clara, posteriormente se dejó al fuego durante 5 minutos. Se procedió a colar y colocar en vasos desechables en una cantidad de 40 g, se cubrió con una gasa sujetado con una liga, finalmente se etiquetó.

3.8.5.2. Sustrato de cebada. Se pesó 1 libra de arroz de cebada, se lavó con agua caliente hasta que esta salió clara, luego fue colocada al fuego durante 10 segundos, se procedió a colar y poner en los vasos desechables en una cantidad 40 g, se tapó con gasa sujeta con una liga, se etiquetó.

3.8.5.3. Sustrato de Arroz. Se pesó 1 libra de arroz, se lavó con agua hasta que esta salga clara, luego se lo colocó al fuego durante 1 minuto, se procedió a colar y poner en los vasos desechables en una cantidad de 40 g y taparlo con gasa sujeta con una liga y se etiquetó.

3.8.6. Colocación de muestras

En cada planta de papa (*Solanum tuberosum*) se colocó una trampa nutricional con sustrato de arroz, quinua y cebada, a 20 cm de profundidad junto a la raíz del vegetal, en las zonas de Guaranda, San Miguel y Chillanes. Las trampas fueron dejadas por un periodo de 12 días, una vez que se observó la presencia de colonias de *Trichoderma* se realizó la recolección respectiva.

3.8.7. Preparación de Medios de Cultivo para inoculación de Cepas de *Trichoderma*.

La preparación de los tres medios de cultivo empleados en esta investigación se sujetó al siguiente protocolo enunciado por Falconí, C. 2010

a. Medio de cultivo PDA

300 g papas peladas y picadas

1 Cacerola

1 colador de cocina o gasa

1 Prueba de pH de papel o medidor de pH

Procedimiento

Colocar las papas peladas y picadas en una cacerola con aproximadamente 1,2 litros de agua del grifo y deja hervir durante 1 hora.

Retirar la olla del fuego y se deja enfriar el líquido hasta que pueda ser manejado cómodamente (unos 10 minutos).

Tamizar el contenido con un colador y luego de añade dextrosa y agar en 1 litro de agua de extracto de patata.

Realizar la prueba el pH de la solución con un medidor de pH. El mismo que deberá estar entre los 6 a 6,5 y si no corregir con una gota de solución de ácido clorhídrico hasta dejarlo en el Ph, óptimo. Si el Ph es inferior a 6 se debe regular con una gota de solución de hidróxido de sodio y volver a probar.

Colocar en las botellas boecos y sellarlo con un papel aluminio estas no debe quedar herméticamente cerrado sino semicerrado ya que deben dejar salir gases y llevarlo a autoclavar en una olla de presión para esterilizar a 121 grados centígrados a una presión de 15 atmosferas de presión (psi) durante 15 minutos.

Apagar la olla y dejar que se enfríe hasta que los frascos puedan ser manipulados, para dispensar en las cajas petris en una cantidad de 20 ml en cada una.

b. Preparación de Medio MDA

300 g harina de maíz fresca y cernida

1 Cacerola

1 colador de cocina o gasa

1 Prueba de pH de papel o medidor de pH

Procedimiento

Seguir el mismo protocolo descrito anteriormente para medio de cultivo PDA

c. Preparación de Medio TDA

300 g harina de trigo fresca y cernida

1 Cacerola

1 colador de cocina o gasa

1 Prueba de pH de papel o medidor de pH

Procedimiento.

Seguir el mismo protocolo descrito anteriormente para medio de cultivo PDA

3.8.8. Siembra, aislamiento y purificación de potenciales cepas benéficas de *Trichoderma spp*

Para realizar la siembra en cada una de las cajas petri se tomó en cuenta la asepsia del lugar, para lo cual se procedió a limpiar el mesón de trabajo con cloro y alcohol y se colocó un mechero de buncce durante 15 minutos con la finalidad de evitar cualquier tipo de contaminación. En las trampas nutricionales se realizó un raspado sobre las colonias que presentaron características de *Trichoderma spp*, posteriormente el raspado fue colocado en los medios de cultivo (Trigo Dextrosa Agar, Maíz Dextrosa Agar y Papa Dextrosa Agar) los cuales estaban dispensados 20 ml en cajas Petri plásticas, estas fueron selladas con parafilm y etiquetadas.

3.8.9. Purificación de cepas.

Una vez desarrolladas las cepas en los diferentes medios de cultivo, se procedió a purificar las colonias. Para lo cual se dispensó 20 ml de cada medio en las cajas petris, con una asa se tomó un pequeño raspado en la colonia y se lo colocó en el centro de la caja con el nuevo medio, se selló con parafilm y se etiquetó posteriormente se colocó en la cámara de incubación a una temperatura de a 27.5°C, se lo dejó por un período de 3 a 8 días observándose su comportamiento todos los días.

3.8.10. Conteo de esporas de *Trichoderma* sp. Para determinación de Biomasa

Cuando se observó que el *Trichoderma* pobló toda la caja se procedió hacer el conteo de esporas, la misma que nos servirá para calcular la biomasa contenida en 1 ml en cada medio de cultivo; para lo cual se agregó 1ml de solución búfer para realizar la cosecha de esporas de cada caja se dio movimientos circulatorios suaves; posteriormente se realizó tres diluciones en tubos de ensayo de la siguiente manera: en tres tubos de ensayo se colocó 9 ml de agua destilada y se etiquetó (10^1 , 10^2 , 10^3) cada uno de ellos. En el primer tubo (10^1) se colocó el 1ml de las esporas cosechadas, se tapó con parafilm y se procedió a agitar para obtener una dilución homogénea, luego con ayuda de una pipeta se tomó 1ml de la primera dilución y fue colocada en el segundo tubo obteniendo una dilución de 10^2 , nuevamente se tapó y se agitó, finalmente se tomó 1ml de la dilución 10^2 y se colocó en el tercer tubo (10^3).

La tercera dilución fue utilizada para hacer el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, en dicha cámara se colocó en el canal del centro entre los dos hemisferios una gota de la dilución y se colocó el cubre objetos evitando que queden burbujas, posteriormente la cámara fue colocada en el microscopio y se fue observando desde el lente 4x, 10x y 40x, en este último se pudo observar de mejor manera las esporas, el conteo se realizó en los 25 cuadros que contiene la cámara y en los dos hemisferio norte y sur para así obtener un total de esporas en 1ml. Esto se realizó para cada uno de los tratamientos.

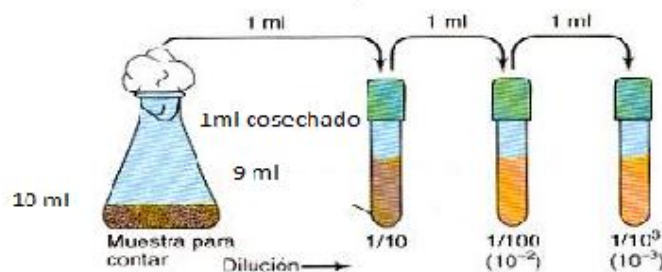


Grafico 2. Muestra de la dilución para el conteo de esporas para determinar la biomasa en ml.

3.8.11. Tasa de crecimiento diario (TCD)

Para determinar la tasa de crecimiento diario, se evaluó en un periodo de 8 días a partir de su inoculación para lo cual se procedió a dibujar en la base de cada caja petri los halos de crecimiento diario, se midió con la ayuda de un calibrador graduado en milímetros. Tomando en cuenta que la base de la caja petri tiene un diámetro de 8,6 cm. La fórmula aplicada para determinar la TCD fue la siguiente: Falconí, C. 2010.

$$V = E/T$$

Dónde:

V = velocidad de crecimiento

E = Diámetro de crecimiento diario

T = Tiempo (número de días).

3.8.12. Caracterización macroscópica de los aislados de *Trichoderma* desarrollas en cada uno de los medios.

A medida que el *Trichoderma* spp, iba poblando la caja se observó los colores, el crecimiento sea esta regular o irregular de cada una de las cepas en cada tratamiento y el olor que estos presentaron y la presencia de antibiosis y metabolitos los cuales se reconocerán por la coloración que se observe en los tratamientos.

3.8.12.2. Determinación de morfología en el microscopio.

De cada uno de los tratamientos se preparó una placa en la cual se colocó una gota agua destilada sobre el porta objetos, con la ayuda de una asa estéril se procedió a hacer un fino raspado de la colonia y se colocó sobre la gota de agua, se puso el cubreobjetos evitando que se haga burbujas, para que la imagen no se distorsione, finalmente la placa se colocó al microscopio para su observación e identificación de la especie. Esta identificación fue comparada con las características

morfológicas descritas en el Manual de Taxonomía de *Trichoderma* spp, microorganismos agrícolas ecuatorianos, por Falconí, C. 2010.

3.8.13. Evaluación estadística de los tratamientos.

Se utilizó un diseño de bloques completamente al Azar, con un arreglo factorial de 3 x 3 x 3, y tres repeticiones. es decir tres localidades (Guaranda, San Miguel y Chillanes) para la colocación de sustrato (arroz, quinua, cebada), a nivel de laboratorio se utilizaron tres medios de cultivo (Trigo Destroza Agar, (TDA), Maíz Destroza Agar (MDA), y Papa Destroza Agar (PDA)). Obteniendo así un total de 27 tratamientos y 81 repeticiones, los análisis obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey utilizando el software ESTATISXS versión 4.4.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4. Análisis de los resultados

4.1. Sustratos evaluados por localidad

a. Guaranda

- Trampa nutricional de arroz, se observó la presencia de *Trichoderma* spp, a partir de 5 días cubriendo una pequeña parte del sustrato, presentado su color característico verde botella, olor agradable similar al coco, además hubo la presencia de *Fusarium*, que se lo reconoció por su color rosado y rojo; *Penicillium verde pálido* y *Rhizoctonia* por su color gris en el sustrato.
- Trampa nutricional con quinua. La población de *Trichoderma* spp se estableció entre los 4 días cubriendo en gran parte el sustrato, además hubo la presencia de *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*.
- Trampa nutricional con arroz de cebada, la presencia de *Trichoderma* spp, fue muy baja y el tiempo en poblarse fue entre los 7 días, además que el sustrato a partir de los 4 días comenzó a descomponerse y adquirir un olor desagradable.

b. San Miguel.

- Trampa nutricional de arroz, se observó la presencia de *Trichoderma* spp a partir de 6 días cubriendo una pequeña parte del sustrato, se observó mayor presencia de *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*.
- En la trampa nutricional con quinua. La población de *Trichoderma* spp se estableció entre los 4 días cubriendo en gran parte del sustrato, existió también la presencia de *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctoni*.

- Para la Trampa nutricional de arroz de cebada, la presencia de *Trichoderma spp*, fue muy baja y el tiempo en poblarse fue entre los 9a 12 días, además que el sustrato a partir de los 4 días comenzó a descomponerse y adquirir un color desagradable.

c. Chillanes

- Trampa nutricional de arroz, la presencia de *Trichoderma spp* se dio a partir de 5 días cubriendo una pequeña parte del mismo, además se observó la presencia de *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*.
- En la trampa nutricional con quinua la población de *Trichoderma spp* se estableció entre los 3 días cubriendo en su totalidad el sustrato, la presencia de *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctonia* fue muy baja.
- Trampa nutricional de arroz de cebada, la presencia de *Trichoderma spp*, fue muy baja y el tiempo en poblarse fue entre los 7 días, el sustrato a partir de los 3 días comenzó a descomponerse y adquirir un olor desagradable.

Tabla. 5. Resultados del análisis de varianza para evaluación de Sustratos y Localidad

Fuente de Variación.	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor de F
Localidad	2	1,44	1,86 ns
Sustrato	2	18,78	24,14 **
Error	4	0,78	
Total	8		

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

Coefficiente de variación = 13,01 %

ns = no significativo

** = altamente significativo

En la Tabla 5. Se muestran los resultados obtenidos la cual nos permiten informar que los sustratos utilizados en la captura de Cepas Nativas de *Trichoderma*, tuvieron una diferencia estadística significativa. Mientras que en la evaluación por localidad no resultaron diferencias significativas entre ellas.

Tabla .6. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de sustratos.

SUSRATO	Medias	Rango
Cebada	4,33	a
Arroz	6,67	a
Quinoa	9,33	b

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 6. La respuesta obtenida en los diferentes tratamientos en cuanto a sustratos fue diferente siendo el mejor tratamiento para la captura de colonias de *Trichoderma* el sustrato de quinua debido a su alto contenido de proteína.

Tabla 7. Prueba de Tukey al 5 % para comparación por localidad

Localidad	Medias	Rango
Guaranda	6	a
Chillanes	7	a
San Miguel	7,33	a

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla .7, la respuesta en relación a la localidad según la prueba de significación mínima al 5 % se determinó que en los tratamientos aplicados no existe diferencia estadística significativa.

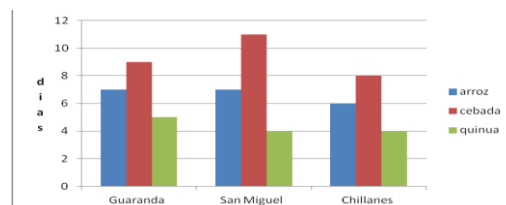


Grafico 3. Evaluación de sustratos por localidad

El mejor sustrato para captura de *Trichoderma* en las tres localidades evaluadas y en un periodo de tiempo entre los 4 días, fue el sustrato o trampa nutricional de quinua, esto se debe a su alto contenido de proteína lo cual prefiere el *Trichoderma*. También se evidenció que en este sustrato existió menor incidencia de patógenos como *fusarium*, *Rhizhoctonia* y *Penicilium*.

4.1.2. Análisis de varianza para tasa de crecimiento diario de los aislados de *Trichoderma*.

El crecimiento de las cepas asiladas de *Trichiderma* spp, de las tres localidades tuvieron gran importancia ya que son característica que más adelante nos ayudarán para la descripción morfológica de las cepas analizadas.

Varios factores son los que determinaron su crecimiento diario, tales como el tipo de medio de cultivo en el cual se inoculo ya que son factores que basan su nutrición y capacidad de esporulación.

Tabla 8. Análisis de varianza para tasa de crecimiento diario de Aislados de *Trichoderma*.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de f
Repeticiones	2	11.423	0.87ns
Localidad	2	10.568	0.81ns
Sustratos	2	31.002	2.36ns
Medios de cultivo	2	218.232	16.62**
Loc.*Sust	4	110.405	8.41**
Loc.*Med	4	374.294	28.51**
Sust.*Med	4	44.975	3.43ns
Loc.*Sust.*Medio	8	41.161	3.14ns
Error	52	13.127	
Total	80		

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

CV = 16.61%

ns = no significativo
** = altamente significativo

En la tabla .8 se muestran el análisis de varianza en referencia a la evaluación de los factores que determinaron la tasa de crecimiento diario de *Trichoderma* donde se estableció para localidades no existe diferencia estadística significativa, ya que los aislados se sometieron a que su aislamiento y crecimiento se lo manejo en un laboratorio donde las condiciones de temperatura y humedad son totalmente controladas, para los sustratos resultó altamente significativo debido principalmente a la calidad de nutrientes de cada sustrato, en el caso de quinua por su alto valor proteínico, en cuanto a los medios de cultivo de los tratamientos son altamente significativos debido basicamente a la calidad nutricional lo cual determinaron su diferencia entre ellos.

Tabla 9. Prueba de Tukey al 5% para comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) entre localidad

Localidad	mm/día	Rango
Guaranda	22.457	a
San Miguel	21.753	a
Chillanes	21.210	a

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla N.9. Nos indica que en los tratamientos aplicados en cuanto a la tasa de crecimiento diario de los aislados de *Trichoderma* no existió diferencia significativa, esto se debe a que se lo realizo en un ambiente controlado es decir el ensayo se manejo dentro de un laboratorio artesanal.

Tabla 10. Prueba de Tukey al 5% para comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) entre el sustrato del cual se aisló la cepa de *Trichoderma*.

Sustrato	mm/día	Rango
Arroz	22.901	a
Quinoa	21.759	a
Cebada	20.760	a

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 10, La respuesta de la tasa de Crecimiento diario en cuanto a los sustratos no fue significativa entre ellas, obteniéndose los mejores promedios con los aislados del sustrato de arroz con un promedio de 22,901 mm / día, con los aislados del sustrato de quinua con un promedio de 21,759 mm/día y con los aislados del sustrato de cebada con un promedio de 20,760 mm/día.

Tabla 11. Prueba de Tukey al 5% para comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) de cepa de *Trichoderma*, entre medios de cultivo.

Medios de cultivo	mm/día	Rango
Papa Dextrosa Agar (PDA)	25.089	a
Maíz Dextrosa Agar (MDA)	20.220	b
Trigo Dextrosa Agar (TDA)	20.111	b

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 11. Encontramos que los tratamientos aplicados para la tasa de crecimiento diario de las cepas aisladas existió una diferencia entre ellas siendo su mayor crecimiento en el Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar con un promedio de 25,089 mm diario. Mientras que en los medios de Cultivo Maíz Dextrosa Agar y Trigo Dextrosa Agar, obtuvieron un crecimiento diario de 20,220 mm y 20,111 mm respectivamente.

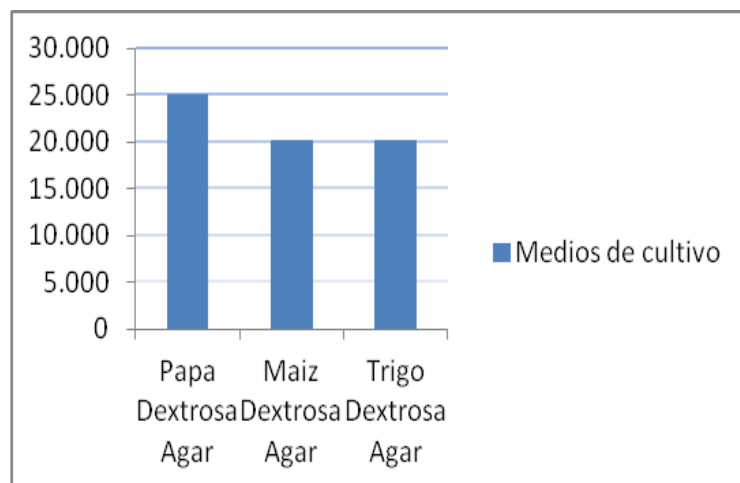


Grafico 4. Crecimiento de Aislados en los medios de cultivo PDA, MDA, TDA.

En el grafico 4 se observa que el mejor crecimiento diario de los aislados de *Trichoderma* se lo obtuvo con el medio Papa Dextrosa Agar. (PDA).

Tabla 12. Prueba de Tukey al 5% para comparaciones de la tasa de crecimiento diario (TCD) interacción entre localidad y sustratos.

Localidades	Sustratos	mm/día	Rangos
Guaranda	Cebada	25.117	a
San Miguel	Arroz	24.828	ab
Chillanes	Arroz	24.171	ab
San Miguel	Quinua	22.854	abc
Guaranda	Quinua	22.550	abc
Chillanes	Quinua	19.871	abc
Guaranda	Arroz	19.706	abc
San Miguel	Cebada	19.587	bc
Chillanes	Cebada	17.577	c

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la Tabla 12. La respuesta de la tasa de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* dependió del sustrato y de la localidad, obteniéndose los mejores 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.

Tabla 13. Prueba de TUKEY al 5% para comparación TCD. en la interacción medios de cultivo Papa dextrosa Agar, (PDA); Maíz dextrosa Agar (MDA); Trigo dextrosa Agar (TDA) y Localidad.

Localidad	Medios de cultivo	mm/día	Rango
San Miguel	Papa dextrosa Agar	26.367	a
Chillanes	Maiz Dextrosa Agar	25.944	ab
Chillanes	Papa dextrosa Agar	25.531	ab
San Miguel	Trigo Dextrosa Agar	24.631	ab
Guaranda	Trigo Dextrosa Agar	23.550	ab
Guaranda	Papa dextrosa Agar	23.369	ab
Guaranda	Maiz Dextrosa Agar	20.453	b
San Miguel	Maiz Dextrosa Agar	14.261	c
Chillanes	Trigo Dextrosa Agar	12.153	c

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla .13, se muestran los resultados de la tasa de crecimiento diario obteniéndose en San Miguel su mayor crecimiento diario con el Medio Papa Dextrosa Agar, con un promedio de 26.367 mm diario, con medio de cultivo Trigo dextrosa Agar un promedio de 24,631 mm, y su menor crecimiento se lo obtuvo con el medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar con un promedio de 14,261 mm diario. En Chillanes su mayor crecimiento se lo obtuvo con Maíz Dextrosa Agar con un promedio de 25,944 mm diario y 25.531 mm diario con Papa Dextrosa Agar, y su menor crecimiento se lo obtuvo en el medio Trigo Dextrosa Agar con un promedio de 12,153 mm diario. En Guaranda su mejor crecimiento fue con el medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar con un promedio de 23,550 mm diario, Papa Dextrosa Agar con un promedio de 23,369 mm diario, siendo su menor crecimiento con el medio Maíz Dextrosa Agar, con un promedio de crecimiento diario de 20,453 mm.

Tabla 14. Prueba de Tukey al 5% para comparaciones de la tasa de crecimiento diario entre sustratos y medios de cultivo.

Sustratos	Medios de Cultivo	mm/día	Rango
Quinoa	Papa dextrosa Agar	26.906	a
Arroz	Papa dextrosa Agar	25.054	ab
Cebada	Papa dextrosa Agar	23.307	abc
Arroz	Maíz Dextrosa Agar	23.007	abcd
Cebada	Trigo dextrosa Agar	21.431	abcd
Arroz	Trigo dextrosa Agar	20.643	bcd
Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	20.110	bcd
Quinoa	Trigo dextrosa Agar	18.260	cd
Cebada	Maíz Dextrosa Agar	17.542	d

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 14. Se establece que la respuesta de la tasa de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* fue altamente significativa y dependió de los sustratos y medios de cultivo, obteniéndose el mejor crecimiento con el aislado del sustrato de quinua e inoculado en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar con un promedio de 26,906 mm diario, con el sustrato de arroz con un promedio de 25,054 mm diario y finalmente con el sustrato de cebada con un promedio de 23,307 mm diario. La tasa de crecimiento diario en el medio de cultivo Maíz dextrosa Agar con los sustratos de arroz, quinua y cebada con promedios de 23,007 mm, 20,110 mm y 17,542 mm diario respectivamente. Para el medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar el crecimiento de los aislados de *Trichoderma* de los diferentes sustratos los promedios obtenidos fueron, cebada 21,431 mm, arroz 20,643, quinua con un promedio de 18,260 mm diario.

Tabla 15. Prueba de Tukey al 5 % para comparar interacciones de la Tasa de Crecimiento Diario de aislados de *Trichoderma* entre localidades, medios de Cultivo y Sustratos.

Localidades	Sustratos	Medios de Cultivo	mm/día	Rango
Chillanes	Arroz	Maíz Dextrosa Agar	32.493	a
San Miguel	Arroz	Papa Dextrosa Agar	31.593	ab
San Miguel	Quinoa	Papa Dextrosa Agar	29.927	abc
Guaranda	Cebada	Trigo dextrosa Agar	28.473	abcd
Chillanes	Quinoa	Papa Dextrosa Agar	27.150	abcde
Chillanes	Cebada	Papa Dextrosa Agar	26.520	abcde
San Miguel	Cebada	Trigo dextrosa Agar	26.193	abcde
Guaranda	Cebada	Papa Dextrosa Agar	25.820	abcde
San Miguel	Arroz	Trigo dextrosa Agar	25.260	abcde
Guaranda	Quinoa	Papa Dextrosa Agar	23.640	abcde
Chillanes	Arroz	Papa Dextrosa Agar	22.923	abcde
Chillanes	Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	22.727	abcde
Chillanes	Cebada	Maíz Dextrosa Agar	22.613	abcde
Guaranda	Quinoa	Trigo dextrosa Agar	22.603	abcde
San Miguel	Quinoa	Trigo dextrosa Agar	22.440	abcde
Guaranda	Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	21.407	abcde
Guaranda	Cebada	Maíz Dextrosa Agar	21.057	abcdef
Guaranda	Arroz	Papa Dextrosa Agar	20.647	bcdef
Guaranda	Arroz	Trigo dextrosa Agar	19.573	cdefg
Guaranda	Arroz	Maíz Dextrosa Agar	18.897	cdefg
San Miguel	Arroz	Maíz Dextrosa Agar	17.630	defg
San Miguel	Cebada	Papa Dextrosa Agar	17.580	defg
Chillanes	Arroz	Trigo dextrosa Agar	17.097	defg
San Miguel	Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	16.197	efg
Chillanes	Quinoa	Trigo dextrosa Agar	9.737	fg
Chillanes	Cebada	Trigo dextrosa Agar	9.627	fg
San Miguel	Cebada	Maíz Dextrosa Agar	8.957	g

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 15, En cuanto a las interacciones de los factores en estudio la respuesta de las localidades respecto a la tasa de crecimiento diario de las cepas de *Trichoderma*; dependieron de los sustratos y de los medios de cultivo.

Los mejores tratamientos para Chillanes se obtuvieron en los aislados de *Trichoderma* de los sustratos de arroz inoculados en medio Maíz Dextrosa Agar

con un promedio de 31,493 mm de Tasa de Crecimiento Diario, sustrato de quinua en medio PDA con un promedio de 27.150 mm de TCD.

La respuesta para la tasa de crecimiento diario en la localidad de San Miguel dependió de los sustratos y de los medios de cultivo obteniéndose los mejores tratamientos en sustrato de arroz inoculados en medio PDA con un promedio de 31.593 mm de TCD, sustrato de quinua inoculados en medio PDA con un promedio de 29.927 mm de TCD.

La respuesta de la tasa de crecimiento diario para las cepas de *Trichoderma* de la localidad de Guaranda dependió de los sustratos y medios de cultivo en la cual los mejores tratamientos fueron; en sustrato de cebada inoculados en medio TDA, con un promedio de 28.473 mm de TCD, sustrato de cebada inoculados en MDA con un promedio de 25.820 mm de TCD, sustrato de quinua inoculados en medio PDA, con un promedio de 23.640 mm de TCD.

4.1.2. Análisis de Varianza para determinar la biomasa

Tabla 16. Análisis de varianza para determinar la cantidad de Biomasa producida por los aislados de *Trichoderma* por medio de cultivo.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Valor de F
Repetición	2	1008.6	1.082 ns
Localidad	2	1749.4	1.88 ns
Sustrato	2	68467.9	73.49 **
Medios de Cultivo	2	5586.4	6.00 **
Loc.* Sustr	4	33064.2	35.49 **
Loc. * Medio. C	4	36827.2	39.53 **
Sust.*Medio. C	4	29501.2	31.66 **
Loc.* Sustr*. Medio. C	8	31039.2	33.31 **
Error	52	931.7	
Total	80		

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

CV = 10.83%
 ns = no significativo
 ** = altamente significativo.

En la tabla 16, se analiza los resultados obtenidos en cuanto a la variable de producción de biomasa de los aislados de *Trichoderma* spp frente a los diferentes tratamientos aplicados, podemos decir que las localidades no incidieron significativamente dentro de este factor. Mientras que los sustratos, medios de cultivo y la interacción entre los sustratos y medios de cultivo resultaron de gran importancia para la determinación de biomasa en cada una de las cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 17. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa por localidad.

Localidad	Esporas /ml	Rango
Guaranda	287.78	a
Chillanes	284.81	a
San Miguel	272.59	a

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 17. La respuesta de la producción de biomasa en cuanto a localidades estadísticamente no fue significativa ya que las localidades únicamente se utilizaron para la captura de las colonias, las mismas que fueron llevadas y aisladas en el laboratorio artesanal.

La mayor producción de biomasa de las cepas de *Trichoderma* spp resultaron en los aislados de Guaranda con un promedio de 287.78 esporas por ml, las cepas de Chillanes con un promedio de 284.81 esporas por ml, y finalmente San Miguel con un promedio de 272.59 esporas por ml las mismas que para determinar el número de esporas se utilizó una dilución de 10^{-3}

Tabla 18. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa por sustrato del cual se aisló el *Trichoderma*.

Sustrato	Esporas /ml	Rango
Arroz	335.19	a
Cebada	274.81	b
Quinoa	235.19	c

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 18, se muestran los resultados obtenidos con relación a los tratamientos aplicados en la que la producción de biomasa en ml lo cual nos indica que el sustrato utilizada en la captura de las colonias influencia significativamente para la producción de biomasa de cada uno de los aislados, obteniéndose así con el sustrato de arroz la mayor producción con un promedio de 335,19 esporas por ml. En el sustrato de cebada un promedio de 274,81 esporas por ml, y el sustrato de quinua con un promedio de 235,19 esporas por ml.

Tabla. 19. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa por medio de cultivo en el que se inoculó los aislados de *Trichoderma*.

Medios de Cultivo	Esporas /ml	Rango
Papa Dextrosa Agar	297.78	a
Trigo Dextrosa Agar	277.41	b
Maíz Dextrosa Agar	270.00	b

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 19. La respuesta de la producción de biomasa fue altamente significativa y dependió de los medios de cultivo, registrándose los mejores tratamientos en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar con un promedio de 297.78 esporas por ml, con el medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar, con un promedio de 277.41 esporas por ml, y con el medio de cultivo Maíz Dextrosa

Agar, con un promedio de 270,00 esporas por ml las mismas, la dilución utilizada para el conteo de la concentración de esporas en todos los medios fue en una dilución de 10^{-3} .

Tabla 20. Prueba de Tukey al 5 % para comparación de biomasa de los aislados de *Trichoderma*. Por localidad y medios de cultivo.

Localidad	Medios de Cultivo	Espora/ml	Rango
Guaranda	Papa Dextrosa Agar	385.56	a
Chillanes	Trigo Dextrosa Agar	308.89	b
San Miguel	Maíz Dextrosa Agar	304.44	c
Chillanes	Maíz Dextrosa Agar	280.00	bc
San Miguel	Trigo Dextrosa Agar	271.11	bcd
Chillanes	Papa Dextrosa Agar	265.56	bcd
Guaranda	Trigo Dextrosa Agar	252.22	cd
San Miguel	Papa Dextrosa Agar	242.22	cd
Guaranda	Maíz Dextrosa Agar	225.56	d

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 20. La cantidad de producción de biomasa dependió de los medios de cultivo empleados obteniéndose los mejores tratamientos en los aislados de Guaranda con el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar con un promedio de 385,56 esporas por ml, aislados de *Trichoderma* de Chillanes en medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar con un promedio 308,59 de esporas por ml. Los aislados de San Miguel con un promedio de 304,44 espóra por ml en inoculados en medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar.

Los aislados de Chillanes Con el medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, y Papa Dextrosa Agar obtienen un promedio en la producción de esporas de 280 y 265,56 esporas por ml respectivamente.

Los aislados de San Miguel en los medios de cultivo Trigo y Papa Dextrosa Agar alcanzan un producción de biomasa de 271, 11 y 241,22 espora por ml, respectivamente.

Mientras que los aislados de Guaranda su menor producción de biomasa lo obtienen en los medios de cultivo de Trigo y Maíz Dextrosa Agar con promedios de 252.22 y 225.56 esporas por ml. respectivamente.

Tabla 21. Prueba de Tukey al 5 % para comparar Biomasa, entre Sustrato y Medio de Cultivo.

Sustratos	Medios de cultivo	Esporas / ml	Rangos
Arroz	Papa Dextrosa Agar	404.44	a
Arroz	Trigo Dextrosa Agar	347.78	b
Cebada	Maíz Dextrosa Agar	316.67	b
Cebada	Papa Dextrosa Agar	257.78	c
Arroz	Maíz Dextrosa Agar	253.33	c
Cebada	Trigo Dextrosa Agar	250.00	c
Quinua	Maíz Dextrosa Agar	240.00	c
Quinua	Trigo Dextrosa Agar	234.44	c
Quinua	Papa Dextrosa Agar	231.11	c

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 21. La respuesta de la producción de biomasa de los aislados de *Trichoderma* spp en cuanto a los sustratos empleados e inoculados en los diferentes medios de cultivo fue altamente significativa obteniéndose los mejores tratamientos en los aislados del sustrato de arroz inoculado en medios de cultivo Papa Dextrosa Agar, con un promedio de 404, 44 espora por ml, en el medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar con un promedio de 347,78 esporas por ml, con el sustrato de Cebada aislados en el medio de cultivo Maíz dextrosa Agar un promedio de 316,67 esporas por ml, en Papa Dextrosa Agar un promedio de 257,78 esporas por ml, en Trigo Dextrosa Agar un promedio de 250,00 esporas por ml. Con el sustrato de quinua la producción de esporas en los tres medios empleados fueron en promedios Maíz Dextrosa Agar 240,00 esporas por ml, Trigo

Dextrosa Agar 234,44 esporas por ml, y Papa Dextrosa Agar 231,11 esporas por ml.

Tabla 22. Prueba de Tukey al 5 % para comparar Biomasa, entre Medios de Cultivo, Localidad y Sustratos de los aislados de *Trichoderma*.

Localidad	Sustrato	Medio de Cultivo	Esporas /ml	Rango
Guaranda	Arroz	Papa Dextrosa Agar	710.00	a
San Miguel	Arroz	Trigo Dextrosa Agar	383.33	b
Chillanes	Arroz	Trigo Dextrosa Agar	340.00	bc
San Miguel	Cebada	Maíz Dextrosa Agar	336.67	bcd
San Miguel	Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	336.67	bcd
Chillanes	Cebada	Maíz Dextrosa Agar	320.00	bcde
Guaranda	Arroz	Trigo Dextrosa Agar	320.00	bcde
Chillanes	Cebada	Papa Dextrosa Agar	316.67	bcde
Chillanes	Arroz	Maíz Dextrosa Agar	296.67	bcdef
Chillanes	Cebada	Trigo Dextrosa Agar	296.67	bcdef
Guaranda	Cebada	Maíz Dextrosa Agar	293.33	bcdefg
Chillanes	Quinoa	Trigo Dextrosa Agar	290.00	bcdefg
Chillanes	Arroz	Papa Dextrosa Agar	266.67	cdefg
San Miguel	Quinoa	Papa Dextrosa Agar	250.00	cdefgh
San Miguel	Arroz	Maíz Dextrosa Agar	240.00	defgh
Guaranda	Cebada	Trigo Dextrosa Agar	240.00	defgh
San Miguel	Cebada	Papa Dextrosa Agar	240.00	defgh
San Miguel	Arroz	Papa Dextrosa Agar	236.67	efgh
Guaranda	Quinoa	Papa Dextrosa Agar	230.00	efgh
Chillanes	Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	223.33	efgh
Guaranda	Arroz	Maíz Dextrosa Agar	223.33	efgh
San Miguel	Quinoa	Trigo Dextrosa Agar	216.67	fgh
Guaranda	Cebada	Papa Dextrosa Agar	216.67	fgh
Chillanes	Quinoa	Papa Dextrosa Agar	213.33	fgh
San Miguel	Cebada	Trigo Dextrosa Agar	213.33	fgh
Guaranda	Quinoa	Trigo Dextrosa Agar	196.67	gh
Guaranda	Quinoa	Maíz Dextrosa Agar	160.00	h

Elaborado por. Ing. María Vallejo Ilijama. 2014.

En la tabla 22. La respuesta de la producción de biomasa de *Trichoderma* fue altamente significativa y dependió del sustrato la localidad y del medio de cultivo, registrándose los mejores tratamientos para Guaranda el sustrato de arroz inoculado en medio de cultivo PDA, con un promedio de 710 esporas por ml. En Trigo Dextrosa Agar con un promedio de 320,00 esporas por ml, con el sustrato

de cebada inoculado en Maíz dextrosa Agar un promedio de 293,33 esporas por ml, con el sustrato de cebada inoculado en Trigo dextrosa Agar un promedio de 240,00 esporas por ml, en Papa Dextrosa Agar aislado del sustrato de quinua un promedio de 230,00 esporas por ml, en Maíz Dextrosa Agar inoculado del sustrato de Arroz un promedio de 223,33 esporas por ml, en Papa Dextrosa Agar inoculado del sustrato de cebada un promedio de 216,67 esporas por ml. del sustrato del quinua aislado en medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar y Maíz Dextrosa Agar con un promedio de 196.67 esporas por ml, y 160,00 esporas por ml respectivamente.

La respuesta de los tratamientos con relación a San Miguel fueron: con el sustrato de arroz inoculado en medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar, con un promedio de 383.33 esporas por ml, sustrato de cebada y quinua en medio Maíz Dextrosa Agar un promedio de 336,67 esporas por ml, con el sustrato de quinua en Papa Dextrosa Agar un promedio de 250,00 con cebada un promedio de 240,00 esporas por ml, con arroz un promedio de 236,67 esporas por ml, con el sustrato de quinua inoculado en Trigo Dextrosa Agar un promedio de 261.67 esporas por ml y con el sustrato de cebada un promedio de 213,33 esporas por ml.

Para Chillanes la respuesta de los tratamientos aplicados fueron: con el sustrato de arroz inoculado las cepas en medio Trigo Dextrosa Agar, con un promedio de 340 esporas por ml, con el sustrato de cebada un promedio de 296,67 esporas por ml, y con el sustrato de quinua un promedio de 290,00 esporas por ml. para el medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, inoculados con el sustrato de cebada un promedio de 320 esporas por ml, con arroz un promedio de 296,67 esporas por ml, del sustrato de quinua un promedio de 223,33 esporas por ml, para el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar aislados de los sustrato de cebada un promedio de 316,67 esporas por ml, sustrato de arroz un promedio de 266,67 esporas por ml, y con el sustrato de quinua con un promedio de 231,33 esporas por ml.

4.1.3. Caracterización morfológica de Cepas Aisladas.

4.1.3.1. Características macroscópicas de aislados de *Trichoderma* de la zona Chillanes Comunidad San Juan Pamba. En los medios de cultivo Maíz Dextrosa Agar (MDA), Papa Dextrosa Agar (PDA), Trigo dextrosa Agar (TDA).

La caracterización de las cepas aisladas se basó en los siguientes aspectos; a través de la observación Macroscópica en la que se registró el comportamiento y la forma de crecimiento, el color de las colonias, el olor de las mismas y la emisión de antibiosis y Metabolitos secundarios. El segundo aspecto fue la observación Microscópica, en la que se describió: la forma y el color de los conidios, la presencia de fialides, ramificaciones, hifas y micelios. El tercer punto a tomar en cuenta fue la tasa de crecimiento diario con lo que se procedió a la descripción taxonómica. Estas características se evaluaron en un periodo de 8 días a partir del inicio de su crecimiento.

En el grafico 6. describimos que la cepa de *Trichoderma* spp aislado del sustrato de Cebada inoculado en medio de cultivo, Papa Dextrosa Agar (PDA), del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes, el crecimiento de la colonia fue irregular comienza desde el centro donde se sembró emitiendo sus micelios hacia el resto de la caja, forman islas, existe una concentración de colonias de color verde (*Trichoderma*), 69,5,% colonias de color blanquecino (micelios) 23,7 % cubren toda la caja, presenta un olor similar al de tierra de bosque nativo, presencia de colonias de color amarillo (antibiosis y Metabolitos). 6,8 %. Esto nos indica que estas cepas tienen la capacidad de generar antibióticos lo cual ayudarán al control de enfermedades de los diversos cultivos, los metabolitos contribuyen a que *Trichoderma* se proteja contra el resto de microorganismos.

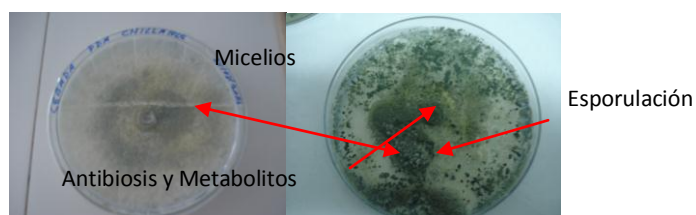


Grafico 6. Cepa de *Trichoderma* asilado del sustrato de cebada creciendo en medio PDA.

En el grafico 7. El crecimiento de *Trichoderma* aislado del sustrato de quinua e inoculado en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes, el crecimiento es regular desde el centro hacia fuera dispersa, la concentración de colonias de esporas es poco en toda la caja su coloración es verde claro 16,4 %, (*Trichoderma*), cubierta por una capa algodonosa blanquecina 80,3 % (micelios), En el centro de la caja presenta la formación de color amarillento 3,3 %, (Antibiosis y metabolitos). su olor similar a bosque nativo. El medio de cultivo mantiene una coloración crema.

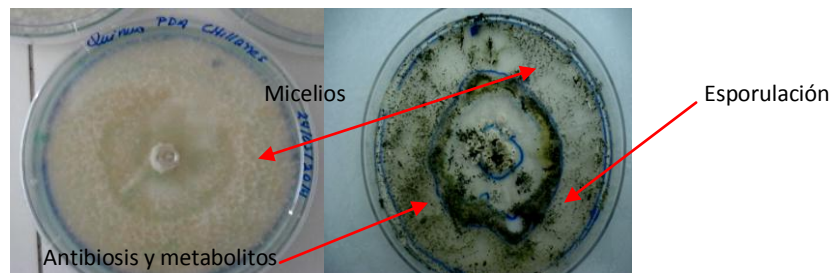


Grafico 7. Cepa de *Trichoderma* aislado de sustrato de quinua creciendo en medio PDA.

En el grafico 8. El crecimiento de *Trichoderma* aislado del sustrato de arroz e inoculado en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes, su crecimiento es con un anillo concéntrico desde el centro colonias de color verde en mayor cantidad (*Trichoderma*), 86,6 %. Formación de un anillo de color amarillo (Antibiosis y Metabolitos) 10,4 % recubierta por una capa blanquecinas (Micelios) 3 % , primero se desarrolla el micelio, su olor es similar a bosque nativo. El medio e cultivo mantiene una coloración crema.

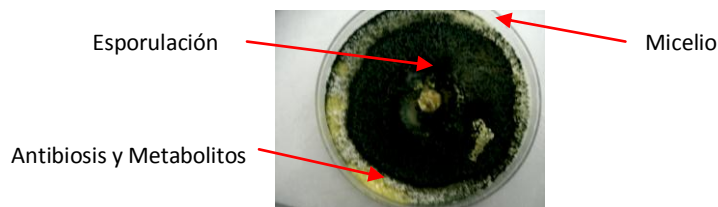


Grafico 8. Cepa de *Trichoderma*, aislado del sustrato de arroz creciendo en medio PDA

En el Grafico 9, el crecimiento del *Trichoderma* aislado del sustrato de arroz inoculado en medio Trigo dextrosa Agar (TDA), del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes, su crecimiento va desde el centro con la formación de anillos concéntricos, presenta formaciones algodonosas, a su alrededor existe la presencia un anillo de color amarillo (Antibiosis, Metabolitos) su olor característico fuerte y similar a coco, color de la colonia verde intenso, la caja presenta mayor evapotranspiración. El color del medio es crema.

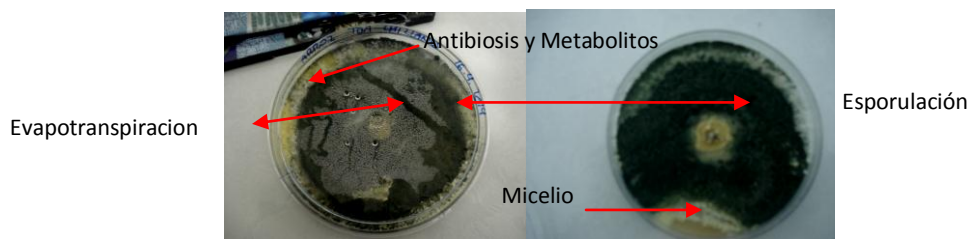


Grafico 9. Cepa de *Trichoderma*, aislado del sustrato de arroz creciendo en medio TDA

En el gráfico 10 se observa la cepa de *Trichoderma*, la cual se aisló del sustrato de quinua y fue inoculado en medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar (TDA) del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes, Se observó un crecimiento irregular de colonias en toda la caja; colonias de color amarillo (Antibiosis y Metabolitos) 67,8 %, colonias de color verde (*Trichoderma*), 19,9 % además de la presencia de micelio (blanco) 12,1 %, olor fuerte a coco. A medida que el hongo se desarrollaba se observó que el medio de cultivo original (color crema) se tornaba de un color rosado, esto se debe a una expresión genética del *Trichoderma* en función de la nutrición proporcionada, (quinua tiene proteína).

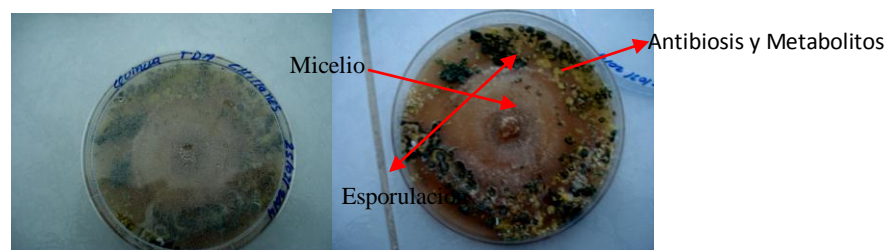


Grafico 10. Cepa de *Trichoderma*, aislada del sustrato de quinua creciendo en medio TDA

En el grafico 11.aislado del sustrato de cebada e inoculado en medio Trigo Dextrosa Agar. del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes su crecimiento de micelios blanquecinos (micelio) 63.4 % formación de antibiosis y metabolitos de color amarillo 11.1 % y formaciones de colonias verdes (*Trichoderma*), 25 % y el 0, 5% es del medio de cultivo en que no crece su olor es a bosque nativo y a coco pero muy suave.

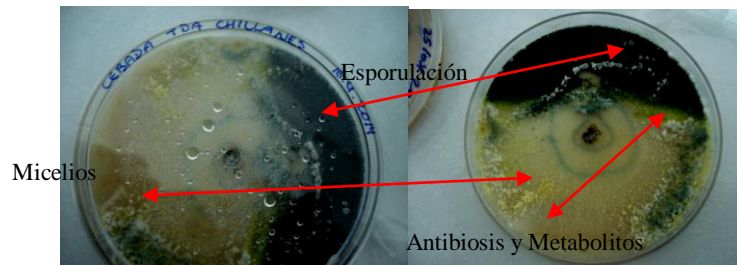


Grafico 11. Cepa de *Trichoderma*, aislado del sustrato de cebada creciendo en medio TDA

En el grafico 12 aislado del sustrato quinua e inoculado en medio Maíz Dextrosa Agar (MDA), del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes el crecimiento de *Trichoderma* fue irregular un solo anillo en el centro y denso 84.8 %, distribución de esporas irregulares se forma como islas los micelios se extiende en toda la caja 11,6 % presenta de una capa de color amarillo (Antibiosis y Metabolitos), 3,6 %, su olor a tierra de bosque nativo y a coco, color de la colonia de *Trichoderma* verde oscuro. La coloración del medio permanece crema que fue el color original

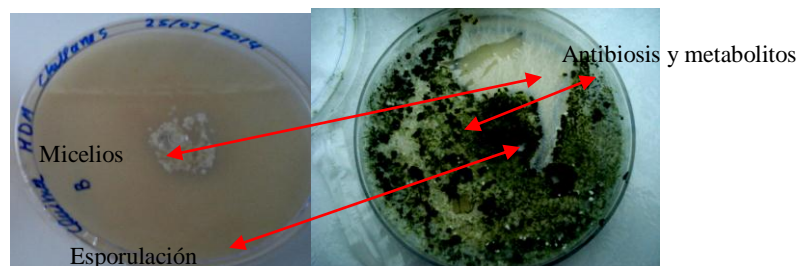


Grafico 12. Cepa de *Trichoderma*, aislado del sustrato de quinua creciendo en medio MDA

Grafico 13. *Trichoderma* aislado del sustrato de cebada inoculado en medio Maíz Dextrosa Agar, del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes, crecimiento irregular y disperso se presenta colonias de color verde (*Trichoderma*) 61,9 % en su mayoría rodeada de micelios algodonosos blanquecino (micelio), 33,1 presencia de colonias amarillentas (Antibiosis y Metabolitos), 1.3 % y un 3.7 % de medio de cultivo donde no creció nada, su olor a tierra de bosque nativo y coco.

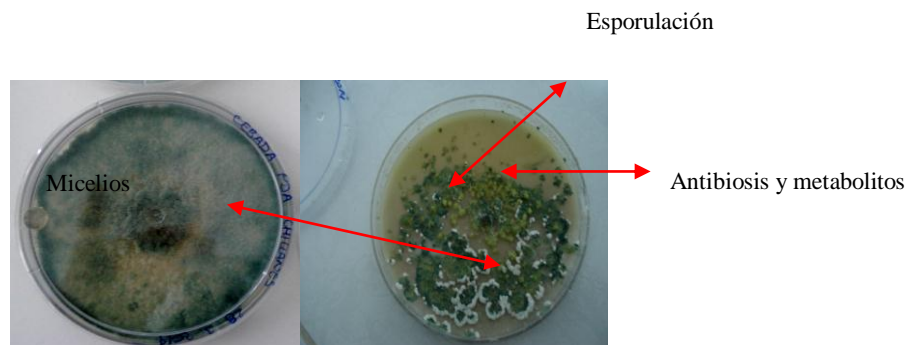


Grafico 13. Cepa de *Trichoderma*, aislado del sustrato de cebada creciendo en medio MDA

En el grafico 14 se muestran las características del *Trichoderma* aislado del sustrato de arroz inoculado en medio Maíz Dextrosa Agar, del recinto San Juan Pamba, Cantón Chillanes a los 8 días su crecimiento aun no ha cubierto la caja, observándose que su crecimiento es muy poco formando pequeñas colonias de color verde (*Trichoderma*), 23.9 % únicamente los micelios blanquecinos cubren toda la caja (micelio), 75.3 %, existe la presencia de colonias de color amarillo (Antibiosis y Metabolitos) 1.2 %, olor a coco y bosque nativo.

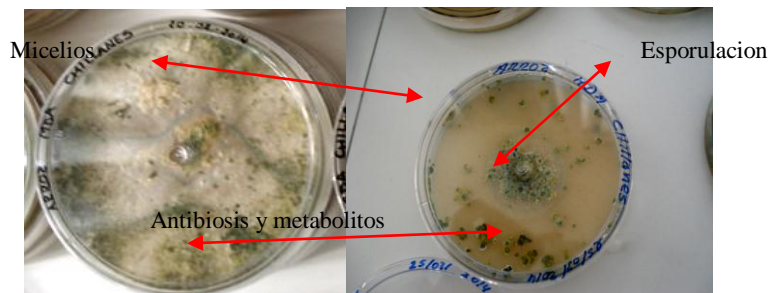


Grafico 14. Cepa de *Trichoderma*, aislado del sustrato de arroz creciendo en medio MDA

4.1.3.2. Características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* en medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, Papa Dextrosa Agar, Trigo Dextrosa Agar de San Miguel comunidad San Vicente.

En el grafico 15 se muestran los aislados de *Trichoderma* del sustrato de quinua e inoculados en medio Papa Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel tuvieron un crecimiento uniforme, llenando totalmente la caja, las colonias de *Trichoderma* en un 80 % estaban cubiertas por una capa muy fina y algodonosa de micelios blanquecinos, 15 % presencia de una fina capa de color amarillo (antibiosis y metabolitos), 5 % el color del medio de cultivo fue crema color original, presento olor muy suave a tierra de bosque nativo

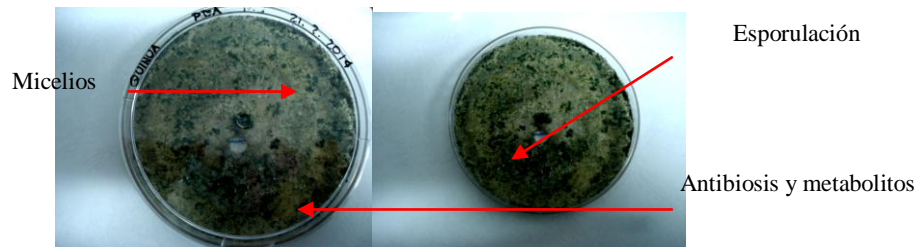


Grafico 15. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de quinua creciendo en medio PDA

En el grafico 16. Encontramos los aislados de *Trichoderma* del sustrato de arroz e inoculados en medio Papa Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel crecimiento irregular con formación de islas de color verde (*Trichoderma*), 60 %, recubierta de una fina capa algodonosa (micelio) 39 % también existe la presencia de una capa de color amarillo (antibiosis y metabolitos) 1 %, presenta un olor a tierra casi que no se percibe.

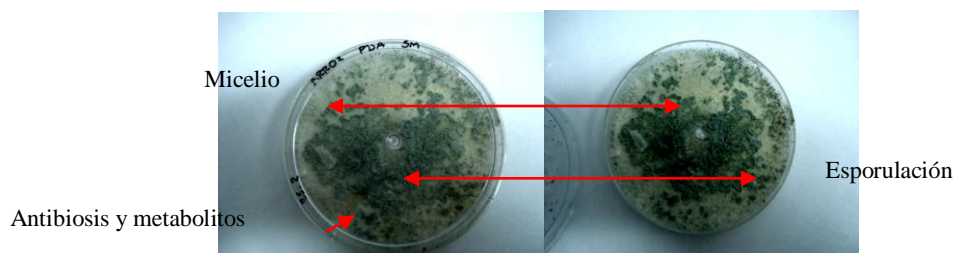


Grafico 16. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de arroz creciendo en medio PDA

Grafico 17. Se muestran los aislados del sustrato de cebada e inoculado en medio Papa Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel, crecimiento desde el centro formando anillos irregulares con una población de esporas muy densa la coloración verde (*Trichoderma*), 54.%, una capa algodonosa blanquecina (micelio) 46 %, su olor es a tierra de bosque muy suave.

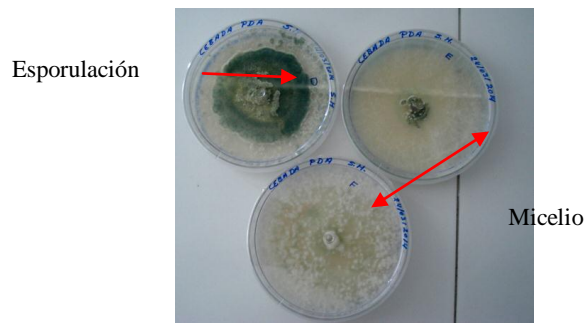


Grafico 17. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de cebada creciendo en medio PDA

En el grafico 18, se observa las características presentadas de los aislados de *Trichoderma* del sustrato de arroz inoculados en medio Maíz Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel, crecimiento irregular desde el centro población de colonias verde (*Trichoderma*) 25.7% la misma que está cubierta por formaciones algodonosas muy densa blanquecinas (micelios) 74,3 %, olor a coco dulce.

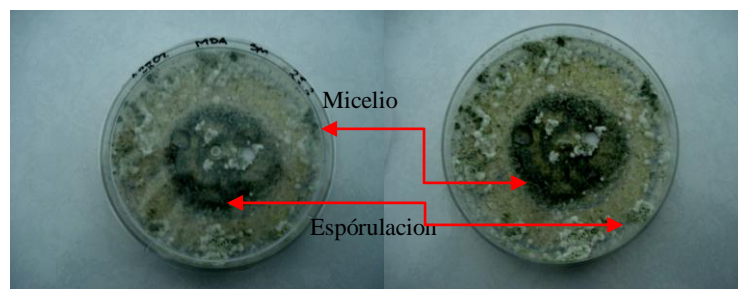


Grafico 18. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de arroz creciendo en medio MDA

En la figura 19. Podemos observar el aislado del Sustrato quinua e inoculado en medio Maíz Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel, su crecimiento es irregular no forma anillos, colonias de color verde (*Trichoderma*)

86,6 %, en el centro existe presencia de pústulas de color amarillo, (Antibiosis y metabolitos) 4.9, y de micelio 8.5 %. Su olor a tierra y muy débil a coco.

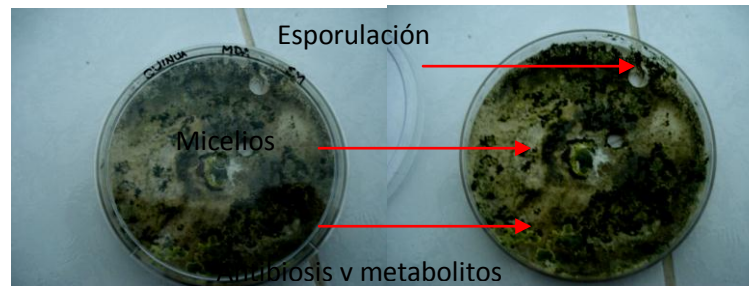


Grafico 18. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de quinua creciendo en medio MDA

Grafico 19, se muestra los aislados de *Trichoderma* del sustrato de cebada inoculados en medio Maíz Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel , en que su crecimiento es irregular, formación de islas de densas de color verde botellas rodeadas (*Trichoderma*) 72,7 % por un anillo algodonoso blanquecino (micelios) 9,6 % existe la presencia de pústulas de color amarillo, 11,3 %, y un 6,4 % del cultivo original el mismo que no presenta ninguna de estas colonias, su olor a tierra de bosque muy suave.

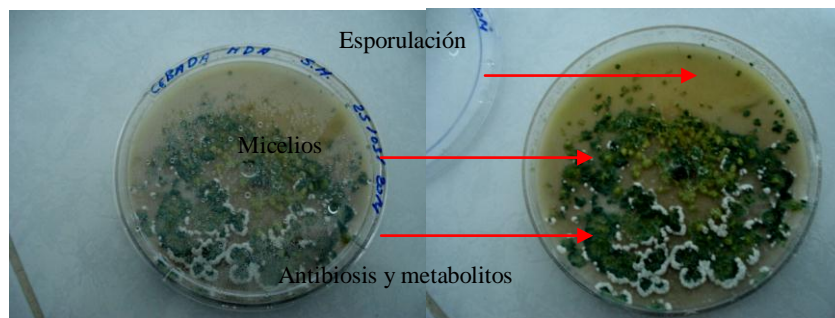


Grafico 19. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de quinua creciendo en medio PDA

Grafico 20. Se puede observar el aislado de *Trichoderma* spp del sustrato de arroz en medio Trigo Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel presenta crecimiento irregular en toda la caja, pústulas de color verde 36.8 % (*Trichoderma*), una capa fina algodonosa que cubre totalmente la caja, 63,2 % (micelio), no presenta olor y su color es verde opaco.

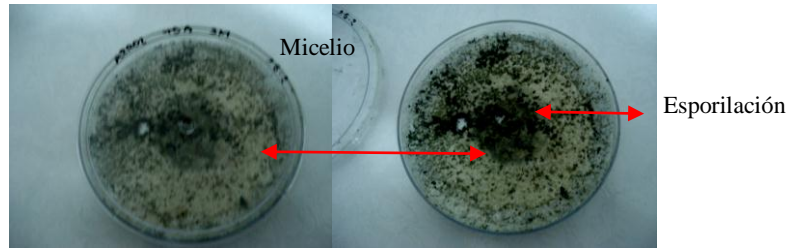


Grafico 20. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de arroz creciendo en medio TDA

En el grafico 21 observamos las características presentadas de los aislados de *Trichoderma* spp, del sustrato de quinua e inoculado en medio Trigo Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel donde su crecimiento es irregular y cubre toda la caja mediante la formación de islas de colonias verdes 74,7 % (*Trichoderma*), presenta una capa de colonias de color verde amarillentas 18,5 % (Antibióticos y metabolitos), cubierta por una fina capa algodonosa de color blanquecina 6,8 % (micelios), no presenta olor.



Grafico 21. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de quinua creciendo en medio TDA

En el grafico 22 se observa a los aislados de *Trichoderma* spp del sustrato de cebada e inoculados en medio Trigo Dextrosa Agar, del recinto San Vicente del cantón San Miguel donde su crecimiento se inicia con un anillo irregular, la misma que cubre la mitad de la caja de color verde oscuro 79,2 % (*Trichoderma*), existe la formación de un anillo concéntrico de color blanquecino y algodonosa 20,8 % (micelio), la caja se presenta con mayor humedad no presenta olor,

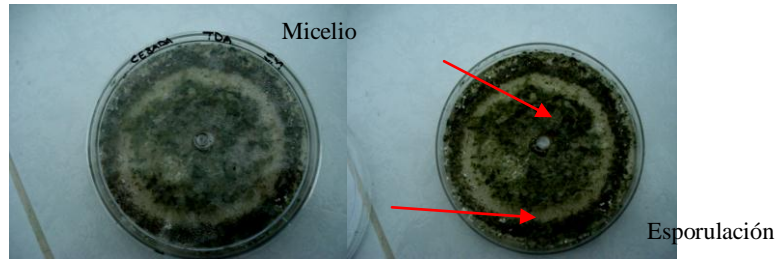


Grafico 22. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de cebada creciendo en medio TDA

4.1.3.3. Características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* en medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, Papa Dextrosa Agar, Trigo Dextrosa Agar de la comunidad El Tuso. Guaranda.

En el grafico 23 se muestra las características presentadas del aislado de *Trichoderma* spp del sustrato de quinua en medio de cultivo Trigo Dextrosa Agar, donde su crecimiento es irregular, 54,1% (*Trichoderma*), con presencia de pústulas algodonosas blanquecinas 37.6 % (micelio), y un 8, 3 % es de la presencia de Antibióticos y metabolitos secundarios, su olor es a coco.

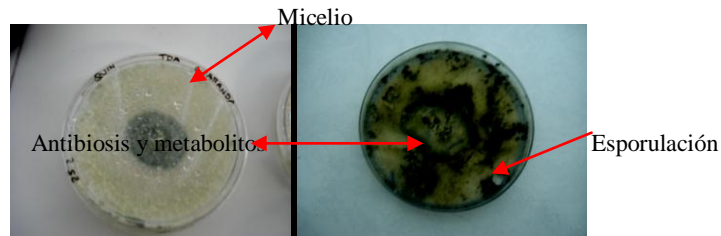


Grafico 23. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de quinua creciendo en medio TDA

En el grafico 24 observamos las características presentados del aislado de *Trichoderma* spp, del sustrato de cebada e inoculado en medio Trigo Dextrosa Agar, del recinto el Tuso del cantón Guaranda en la cual su crecimiento es irregular con colonias de color verde 24,7 % (*Trichoderma*), los micelios blanquecinos se extienden por toda la caja en un 69,5 %, y la presencia de pústulas amarillentas en un 5,8 % que corresponde a los antibióticos y metabolitos secundarios. En cuanto a su olor casi no se presenta o percibe.

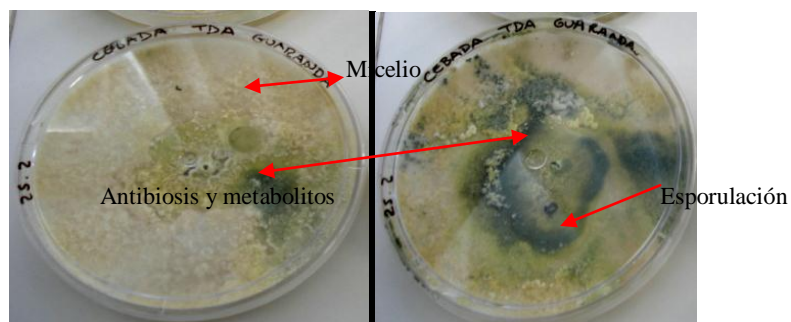


Gráfico 24. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de cebada creciendo en medio TDA

En el grafico 25, se observa las características presentadas del aislado de *Trichoderma* spp, del sustrato de arroz e inoculado en medio Trigo Dextrosa Agar, del recinto el Tuso del canton Guaranda el crecimiento es irregular presenta formaciones algodonosas, la población de colonias verdes (*Trichoderma*) es muy baja 13,9 %, presenta mayor emisión de micelios blanquecinos y algodonosos 84, 2 % y la formación colonias de color amarillo (antibióticos y metabolitos secundarios) es de 1,9 % , el olor es a coco, la caja se presenta con mayor humedad,

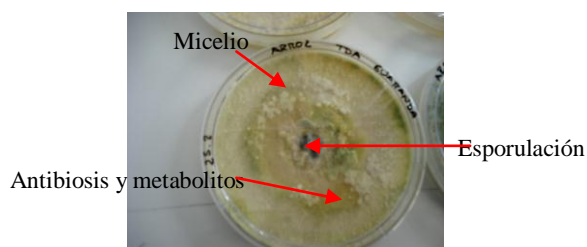


Grafico 24. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de arroz creciendo en medio TDA

Grafico 25. Aislado de *Trichoderma* spp, del sustrato de quinua, del recinto El Tuso, inoculado en medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, del recinto el Tuso del canton Guaranda presenta un crecimiento irregular desde el centro hacia unos 68, 5 % de colonias verde (*Trichoderma*), la caja está recubierta por los micelios de color blanquecinos, 28, 3 % hay la presencia de una capa muy fina de color amarillento, 3,2 % (antibiosis y metabolitos secundarios) su olor es a coco

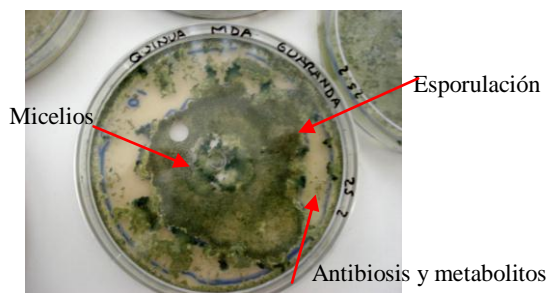


Grafico 25. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de quinua creciendo en medio MDA.

Grafico 26 se observa las características presentadas del aislado de *Trichoderma* spp, del sustrato de cebada del recinto el Tuso, e inoculado en medio de cultivo Maíz Dextrosa Agar, del recinto el Tuso cantón Guaranda, su crecimiento es irregular con muy poca presencia de colonias de color verde 41,7 % (*Trichoderma*), el 58,3 % está cubierta por una capa algodonosa blanquecina (micelios), la caja presenta mayor humedad, el medio de cultivo adquiere un tono rosado, y su olor es a coco.

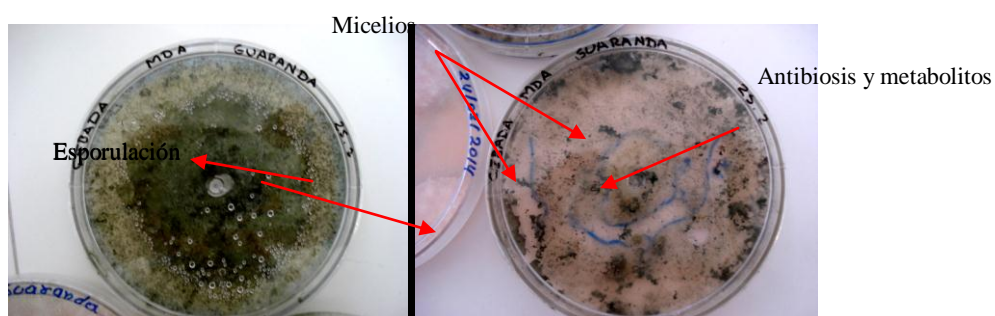


Gráfico 26. Cepas de *Trichoderma* aislado del sustrato de cebada creciendo en medio MDA

Grafico 27. Observamos las características del aislado de *Trichoderma* spp del sustrato de arroz en medio Maíz Dextrosa Agar, del recinto el Tuso cantón Guaranda, donde su crecimiento es irregular de las colonias de *Trichoderma* en un 37,3 %, los micelios de color blanquecino cubre toda la caja 56,9 % y la presencia de colonias de color verde amarillenta en un porcentaje de un 5,8 % corresponde a los antibióticos y metabolitos secundarios, su olor es a coco.

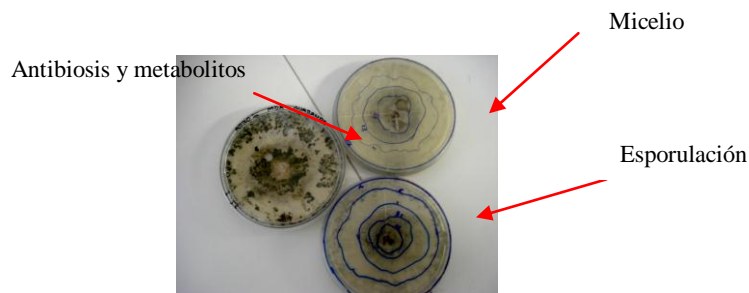


Gráfico 27. Cepas de *Trichoderma* aislados del sustrato de arroz creciendo en medio MDA

Grafico 28. Características del aislado de *Trichoderma* spp, del sustrato de quinua e inoculado en medio Papa Dextrosa Agar del recinto el Tuso cantón Guaranda, crecimiento es irregular desde el centro en los extremos su población de colonias es más densa de color verde claro 81,7 % corresponde a *Trichoderma*, presenta unas pústulas de color amarillo 12,3 % que corresponde a las secreciones enzimáticas tóxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en hongos fitopatógenos que habitan el suelo (antibiosis y metabolitos secundarios), y el 6 % corresponde a los micelios que son algodonosos y blanquecinos, la caja se presenta con mayor humedad, su olor es a coco.

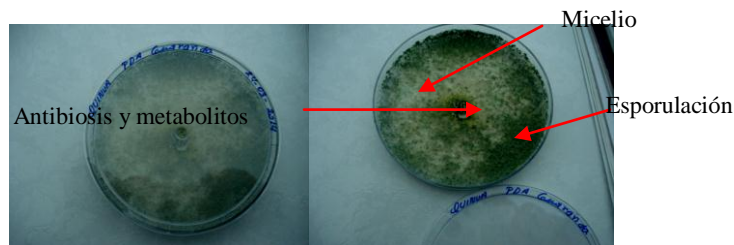


Grafico 28. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de quinua creciendo en medio PDA

Grafico 29. Características del aislado de *Trichoderma* spp, del sustrato de cebada e inoculado en medio Papa Dextrosa Agar, del recinto el Tuso, cantón Guaranda donde su crecimiento es irregular en los extremos existe mayor presencia de población de colonias de *Trichoderma* en un 76,9 %, hacia el centro presenta una capa algodonosa blanquecina en un 17,9 % corresponde a los micelios, en su parte central existe una coloración amarillenta 5,2 % que corresponde a los antibióticos y metabolitos secundarios su olor es a coco.

Antibiosis y

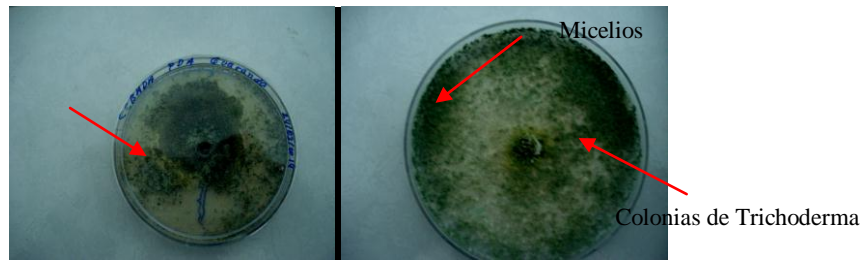


Grafico 29. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de cebada creciendo en medio PDA

Grafico 30. Características del aislado del *Trichoderma* spp, del sustrato de arroz e inoculado en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, del recinto el Tuso cantón Guaranda, su crecimiento desde el centro con una población de esporas muy densa y de color verde botella 91,4 % corresponde a *Trichoderma*, presenta un anillo de color amarillento 5,5 % pertenece a antibióticos y metabolitos secundarios, y una capa algodonosa blanquecina que corresponde a los micelios 3,1 %, su olor característico a coco.



Gráfico 30. Cepas de *Trichoderma* en sustrato de arroz creciendo en medio PDA

b. Caracterización microscópica de los aislados de Chillanes, San Miguel y Guaranda.

La caracterización microscópica se basó en la observación de la forma de los conidios, fialídes, ramificaciones, micelios e hifas. Cabe destacar que estas características se presentaron en los tres medios de cultivo, con la única diferencia que en los medios de Maíz Dextrosa Agar y Trigo Dextrosa Agar, observar y definir sus características fue más complejo ya que era mucho más la presencia de conidios o esporas lo cual dificultó la nitidez de la imagen de la morfología del *Trichoderma*.

Las características macroscópicas y microscopía que corresponden a las cepas aisladas de Chillanes, San Miguel y Guaranda se describen a continuación.

Durante esta investigación se logró identificar y caracterizar las siguientes especies de *Trichoderma* los mismos que fueron analizados y comparados con el manual de taxonomía de *Trichoderma* spp, microorganismos agrícolas ecuatorianos enunciado por C. Falconí 2010.

Trichoderma Viride únicamente se lo identifico en la zona de Chillanes, en el recinto San Juan Pamba, entre las características observadas describimos: **Micelio**, al inicio de su crecimiento es blanquecino, y a partir de los 5 días comienza su coloración característico verde; **Conidios** son de paredes lisas, con varios matices de color verde claro de forma subglobosas y ovoides; **Fialides**, presentan ramificaciones laterales son delgadas y tienen la forma de una botella alargada. **Hifas**, Hialinas, incoloras, brillantes y dependiendo del sustrato estas adquieren un ligero tono verde. **Conidióforos**. Poseen un eje principal a partir del cual se localizan las ramificaciones a intervalos irregulares, orientadas hacia las porciones apicales del conidióforo. **Crecimiento de las colonias**, de crecimiento lento con abundante micelio y va desde el borde de la caja. En el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, se notó que crece más rápido Mientras que en los medios de cultivo Trigo Dextrosa Agar y Maíz Dextrosa Agar es lento y es muy disperso en toda la caja. A medida que crece el *Trichoderma* en el medio de cultivo se presenta zonas en las cuales existe la **Producción de Antibiosis y Metabolitos Secundarios**. Lo cual se manifiesta con colonias de color amarillo opaco. Presenta su **Olor** característico a coco muy suave y alcanfor.



Grafico 31. *Trichoderma viride*, aislado de Chillanes

Trichoderma Harzianum. A esta especie se lo identificó y caracterizó en los suelos del recinto San Juan Pamba, Chillanes , San Miguel recinto San Vicente y el recinto el Tuso cantón Guaranda, entre las características observadas describimos: **Micelio**, emite sus micelios partir del segundo día de inoculación en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, (PDA), mientras que en los medios de Cultivo Trigo Dextrosa Agar (TDA), y Maíz Dextrosa Agar (MDA) a partir del 4 día su micelio es blanquecino, su coloración característico verde comienza a partir de los 6 días en el medio PDA; **Conidios** se presentan subglobosas y ovoides de color verde pálido y hialinas. **Fialides**, son largas y delgadas y tienen la forma de una botella en verticilos de 3 a 4 pareadas y forman estructuras piramidales. **Hifas**, de intenso crecimiento son hialinas, incoloras y elongadas. **Crecimiento de las colonias** En el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, es rápido mientras que en los medios de cultivo Trigo Dextrosa Agar y Maíz Dextrosa Agar es lento y existe mayor presencia de **Antibióticos y Metabolitos secundarios**. Su **Olor**, es similar a tierra de bosque nativo.

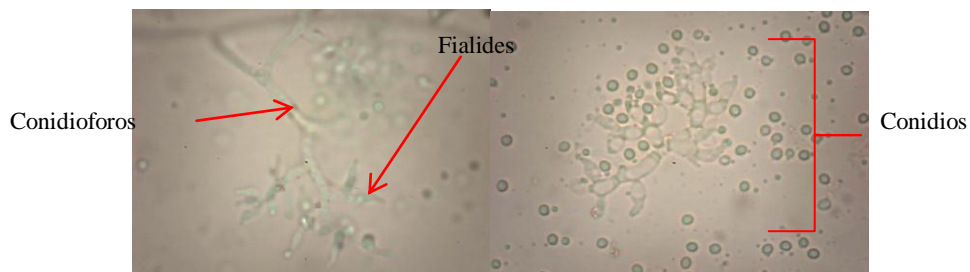


Grafico 32. *Trichoderma Harzianum*, aislado de Chillanes, San Miguel Y Guaranda

Trichoderma Pseudokoningii. A esta especie se lo identificó y caracterizó en los suelos de San Miguel recinto San Vicente y el recinto el Tuso cantón Guaranda, entre las características observadas describimos: **Micelio**, emiten sus micelios al segundo días después de la inoculación es blanquecino, su coloración característico verde azulado comienza a partir de los 5 días en el medio PDA; **Conidios**, son de forma cilíndrica verde oscuro y se asocian con conidios más delgados y siguen una secuencia ordenada. **Fialides**, se presentan solitarias,

únicas, largas y delgadas, la ramificación es distante entre ellas y terminan en forma de cono. **Hifas**, Hialinas incoloras y elongadas. **Crecimiento de las colonias**. En el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, es rápido mientras que en los medios de cultivo Trigo Dextrosa Agar y Maíz Dextrosa Agar es lento y disperso. **Producción de Antibiosis y Metabólicos Secundarios**. En esta cepa no se evidencio. **Olor**, no presenta un olor característico

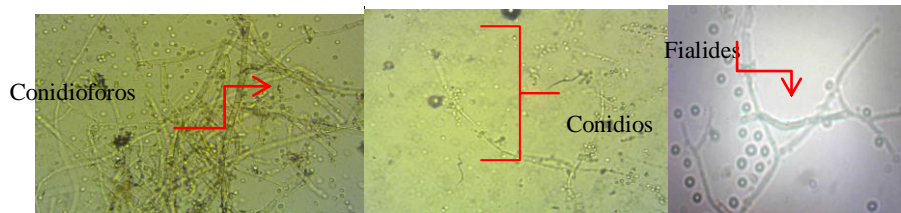


Grafico 33. *Trichoderma Pseudokoningii* aislado de San Miguel y Guaranda

Trichoderma spp. A esta especie se lo identificó y caracterizó únicamente en los suelos del Recinto San Juan Pamba del Cantón Chillanes su descripción es la siguiente. **Micelio**, emiten sus micelios al segundo día después de la inoculación es blanquecino, días en el medio PDA; Mientras que en los medios de cultivo Trigo y Maíz Dextrosa Agar a partir del tercer día después de la inoculación. **Conidios**, las colonias se presentan de forma cilíndrica y color amarillenta en el centro y al borde de un color verde claro y lisos y se distribuyen uniformemente a lo largo de la estructura y muy pegados al conidióforo. **Fialides**, son gruesas y transparentes y terminan en punta, presenta una ramificación principal de la cual emite otra ramificación y siempre se encuentra colonias de conidios a su alrededor. **Hifas**, Hialinas y elongadas. **Crecimiento**. En el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, es rápido mientras que en los medios de cultivo Trigo Dextrosa Agar y Maíz Dextrosa Agar es lento. La **Producción de Antibiosis y Metabólicos Secundarios**. En esta cepa no se evidencio. **Olor**, característico. Estas Características fueron comparadas con el Manual de Taxonomía de *Trichoderma spp*, microorganismos agrícolas ecuatorianos descrita por C. Falconí 2010, en las cuales tiene una similitud con la descripción de *Trichoderma citrinoviride* Bissett, sin embargo en esta descripción en cuanto a la disposición de las colonias de conidios y la forma de los conidios no coinciden, por lo tanto se

asume que se trata de una especie que aún no está descrita taxonómica ni morfológicamente.

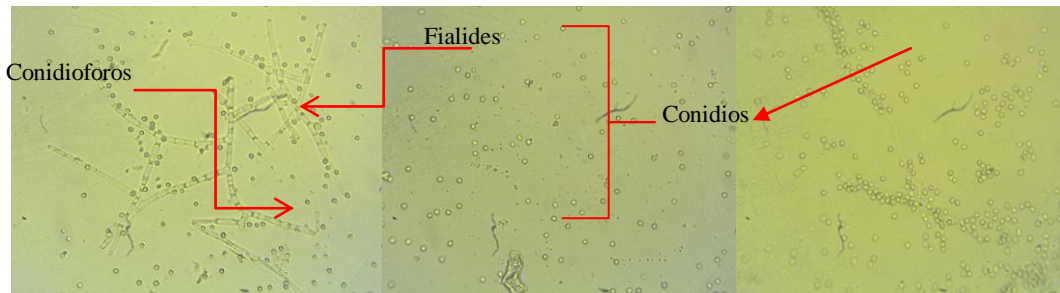


Grafico 34. *Trichoderma* spp aislado de Chillanes

4. 2. Verificación de hipótesis.

Al utilizar los sustratos de arroz, cebada, y quinua se logró capturar colonias de *Trichoderma* resultando el sustrato de quinua el mejor tratamiento para la captura de las colonias en menor tiempo.

Utilizando los medios de cultivo de Trigo, Maíz y Papa Dextrosa Agar, (TDA, MDA, PDA) se lograron aislar, purificar y caracterizar e identificar morfológicamente las especies presentes en las zonas de Guaranda, San Miguel y Chillanes, resultando el mejor tratamiento para la caracterización morfológica el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

Al concluir la investigación de Caracterización de *Trichoderma* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal se determinó lo siguiente.

- 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 crecimiento 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
- La tasa de crecimiento diario con los medios de cultivo demostraron los mejores tratamientos en el medio de cultivo PDA con un promedio de 25.089 mm de TCD día, MDA con un promedio de 20.220 mm de TCD y TDA, con un promedio de 20.111 mm de TCD.
- Los mejores tratamientos en cuanto a la tasa de crecimiento por sustrato, medio de cultivo y localidad se obtuvieron; para Chillanes en los sustratos de arroz en medio MDA con un promedio de 31,493 mm de TCD, sustrato de quinua en medio PDA con un promedio de 27.150 mm de TCD.

- Para San Miguel en sustrato de arroz inoculados en medio PDA con un promedio de 31.593 mm de TCD, sustrato de quinua inoculados en medio PDA con un promedio de 29.927 mm de TCD.
- Para Guaranda en sustrato de cebada inoculados en medio TDA, con un promedio de 28.473 mm de TCD, sustrato de cebada inoculados en MDA con un promedio de 25.820 mm de TCD, sustrato de quinua inoculados en medio PDA, con un promedio de 23.640 mm de TCD.
- La mayor producción de biomasa de las cepas de *Trichoderma* fue las cepas de Guaranda con un promedio de 287.78 esporas por ml, las cepas de Chillanes con un promedio de 284.81 esporas por ml, y finalmente San Miguel con un promedio de 272.59 esporas por ml las mismas que fueron contabilizadas en una dilución de 10^{-3} .
- 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 crecimiento, color y olor presentados en cada medio.
- La mejor observación a nivel del microscopio compuesto, de la morfología de *Trichoderma*, se determinó en el Medio de cultivo PDA, para las tres zonas evaluadas.
- En la comunidad San Juan Pamba del cantón Chillanes, se lograron identificar tres especies de trichoderma nativos que son *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma spp* esta última aun no está determinada en las claves taxonómicas disponibles.

- En la comunidad San Vicente perteneciente al cantón San Miguel se lograron identificar dos especies de los aislado que coincide con las característica de *Trichoderma Harzianum* y *T. pseudokoningii*.
- En la comunidad de Tuso bajo parroquia Santa Fe cantón Guaranda se lograron identificar dos cepas que corresponde a la clasificación taxonómica de *Harzianum* y *T. pseudocinigi*.
- Las especies identificadas durante este proceso de investigación secretan sustancias enzimáticas tóxicas extracelulares lo cual nos indica que son agentes controladores de hongos fitopatógenos que habitan el suelo (micoparasitismo),

5.2. Recomendaciones.

En la provincia Bolívar es necesario ir generando tecnologías sencillas que permitan llegar al sector productivo con insumos de alta calidad y que sean amigables con el ambiente sin afectar la salud de sus pobladores. Durante esta investigación se ha generado un banco de microorganismos beneficios específicamente *Trichoderma* de tres zonas diferentes las misma que deben ser aprovechadas toda su potencialidad para la producción de bioinsumos para el control de fitopatógenos de los diversos cultivos de la zona y así minimizar la utilización exagerada de los agroquímicos.

A las instituciones gubernamentales no gubernamentales, educativas de nivel superior, centros de investigación se recomienda utilizar y difundir la propuesta que se ha generado durante esta investigación, con la finalidad que se aproveche de una mejor forma la microfauna con que cuenta nuestro país en cuanto a microorganismos benéficos y sus diferentes mecanismos de acción dentro de la agricultura la misma que servirá como base para la generación de tecnologías en

la producción de bioinsumos a través de la utilización de microorganismo *Trichoderma* spp, los mismos que deben estar regidos con parámetros donde se mantenga un equilibrio ecológico sin llegar a la erosión y explotación indiscriminada de los mismos.

CAPITULO VI.

PROPUESTA

Título.

Producción Masiva de *Trichoderma Nativos* para el uso en la agricultura en la provincia Bolívar.

6.1 Datos Informativos.

Ubicación Geográfica. Provincia Bolívar

Cantón Guaranda.

Parroquia. Veintenilla

Sector. Vivero la Playa

Institución. Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca (MAGAP)

Ejecutor. Ing. María Vallejo Ilijama

Población Beneficiada. Productores de la Provincia Bolívar

6.2 Antecedentes de la propuesta.

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. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con

contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. Además su gran variabilidad se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos.

Principales beneficios agrícolas del *Trichoderma*.

- 1) Ofrece un control eficaz de enfermedades de plantas.
- 2) Posee un amplio rango de acción.
- 3) Elevada propagación en el suelo, aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos.
- 4) Ayuda a descomponer materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para la planta, por lo tanto tiene un efecto indirecto en la nutrición del cultivo.
- 5) Estimula el crecimiento de los cultivos porque posee metabolitos que promueven los procesos de desarrollo en las plantas.
- 6) Puede ser aplicado en compostaje o materia orgánica en descomposición para acelerar el proceso de maduración de estos materiales, los cuales a su vez contendrán el hongo cumpliendo también función de biofungicida.
- 7) Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagonistas.
- 8) No necesita plazo de seguridad para recolección de la cosecha.
- 9) Preservación del medio ambiente al disminuir el uso de fungicidas.
- 10) Economía en los costos de producción de cultivos.
- 11) Ataca patógenos de la raíz (*Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*) y del follaje (*Botritis* y *Mildiu*) antes que puedan ser detectados y evita el ataque de *Phytophthora*.

- 12) Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje.
- 13) Promueve el crecimiento de raíces y pelos absorbentes.
- 14) Mejora la nutrición y la absorción de agua.
- 15) Disminuye o elimina la dependencia de fumigantes químicos.
- 16) No se ha registrado ningún efecto fitotóxico.
- 17) Moviliza nutrientes en el suelo para las plantas.
- 18) Actúa como biodegradante de agrotóxicos.
- 19) Se puede emplear en sustratos de organopónicos y zeopónicos.
- 20) Protege las semillas agrícolas y botánicas de fitopatógenos.
- 21) Es compatible con Micorrizas, Azotobacter y otros biofertilizantes.
- 22) También es compatible con bio agentes controladores de plagas y enfermedades.

6.3 Justificación

La producción agrícola en la provincia Bolívar en los últimos años se ve gravemente afectada por la utilización exagerada de pesticidas lo que ha conllevado a la contaminación progresiva de los suelos, el agua, el aire y sobre todo la salud de los pobladores y con el propósito de generar alternativas de producción sana y sobre todo disminuir el uso indiscriminado de agrotóxicos, en este marco en la actualidad se desarrollan biopreparados en base a microorganismos antagónicos como *Trichoderma* spp que pueden reducir el impacto de los patógenos vegetales.

Durante esta investigación se ha logrado caracterizar algunas cepas de *Trichoderma* spp, en tres zonas de la provincia los cuales serán multiplicados y posteriormente formulados con tecnologías sencillas para ser utilizados en los diferentes cultivos de la zona.

6.4 Objetivos.

6.4.1. General.

Producir cepas de *Trichoderma* Nativos para el control de enfermedades fungosa en diferentes cultivos de la Provincia Bolívar.

6.5. Análisis de factibilidad.

Trichoderma es un organismo dominante en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con la abundante microflora circundante. La factibilidad de la propuesta se fundamenta en la posibilidad de producir bioinsumos a base de *Trichoderma* nativos que fueron identificadas y clasificadas durante el proceso de investigación, para el control de enfermedades a través de tecnologías limpias y amigables con el ambiente ya que este hongo es fácil de aislar y reproducir, porque se desarrolla en varios sustratos, como lo hemos comprobado en nuestra investigación utilizando sustratos de quinua, cebada y arroz, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas.

6.6. Fundamentación.

Falconí (2012), manifiesta, la idea de producir masivamente *Trichoderma* spp, como uno de los microorganismos más representativos en el campo agrícola, ambiental y toxicológico, con el impacto benéfico, que conlleva su aplicación en

el campo agropecuario constituye una de las ideas más acertadas que ha tenido el gobierno nacional.

Las razones son claras y sencillas *Trichoderma spp*, comprende en esencia el modelo biocatalítico más relevante del manejo de cultivos, condiciones ambientales y sustentabilidad productiva. Sus principios activos describen el lenguaje del comportamiento de poblaciones microbianas, estado de activación genética microbiano y vegetal. Su actividad multifacética representada por más de un individuo, coadyuvan procesos productivos de alta intensidad agronómica (Falconí, 2012).

Pero sobre todas estas razones el grupo de hongos del género *Trichoderma spp*, es uno de los bioindicadores más relevantes de la versatilidad genética microbiana presentes en sistemas agrícola del Ecuador y con que un país micromegadiverso puede contar para el cumplimiento de compromisos, como la seguridad alimentaria, por lo tanto es importante conocerla y administrarla (Falconí, 2012).

6.7. Modelo Operativo.

6.7.1. Metodología.

Con las cepas ya aisladas de las zonas de Chillanes, San Miguel y Guaranda para su multiplicación se regirá a la siguiente metodología.

6.7.1.2. Limpieza del área de trabajo

El mesón de trabajo debe estar completamente limpio y desinfectado con cloro y alcohol, en la cual se deberá encender tres mecheros de buncé o realizar un flameado de alcohol sobre el mesón con la finalidad de que no exista ningún tipo de contaminación de otros agentes.

6.7.1.2. Preparación del sustrato de arroz para inoculación con *Trichoderma*.

Se pasara 2 kg de arrocillo, se lavara hasta que el agua salga bien clara, colocar al fuego durante 1 minuto, se colara, y envasara en botellas o fundas en una cantidad de 150 g por cada unidad, se sellará y se procederá a realizar el autoclave o esterilización a 121°. C, durante 15 minutos.

6.7.1.3. Siembra del inóculo en fundas o botellas con sustrato de arroz.

Una vez que las fundas estén auto clavadas y frías, se procederá a realizar la siembra correspondiente en el mesón de trabajo, para lo cual se debe dar un baño de alcohol al mesón, a las fundas y a la caja petri que contiene el inóculo, realizar un leve flameado por el mechero de bunce antes de abrir.

Para la siembra de las matrices que serán las madres se debe realizar un pequeño corte en el medio de cultivo de *Trichoderma* y colocarlos en las fundas o botellas, realizar un flameado sellarlo y etiquetarlos. Se preparara tres botellas o fundas madres para cada cepa.

Pasado un periodo de 8 a 15 días estas fundas o botellas están completamente pobladas por colonias de *Trichoderma*, que se las reconocerá por su coloración verde y su olor característico a coco, lo cual se va observando a medida que pasan los días y si existe contaminación estas deben ser desechadas y realizadas otra vez hasta obtener un producto puro.

Una vez obtenido las matrices madres, se procederá a obtener matrices hijas para lo cual se debe realizar el mismo proceso anterior, se tomara una pequeña cantidad de producto de la madre y se lo colocará en la botella o funda que corresponderá a ser hijas las mismas que serán cuatro de cada una.

Pasado los 8 a 15 días estas estarán listas para ser multiplicadas a nietas y luego pasado el mismo periodo a bisnietas y fundas de producción en la cual obtendremos ya el producto final para realizar la cosecha y la formulación del producto obtenido de manera artesanal. El esquema de multiplicación se detalla en el siguiente gráfico.

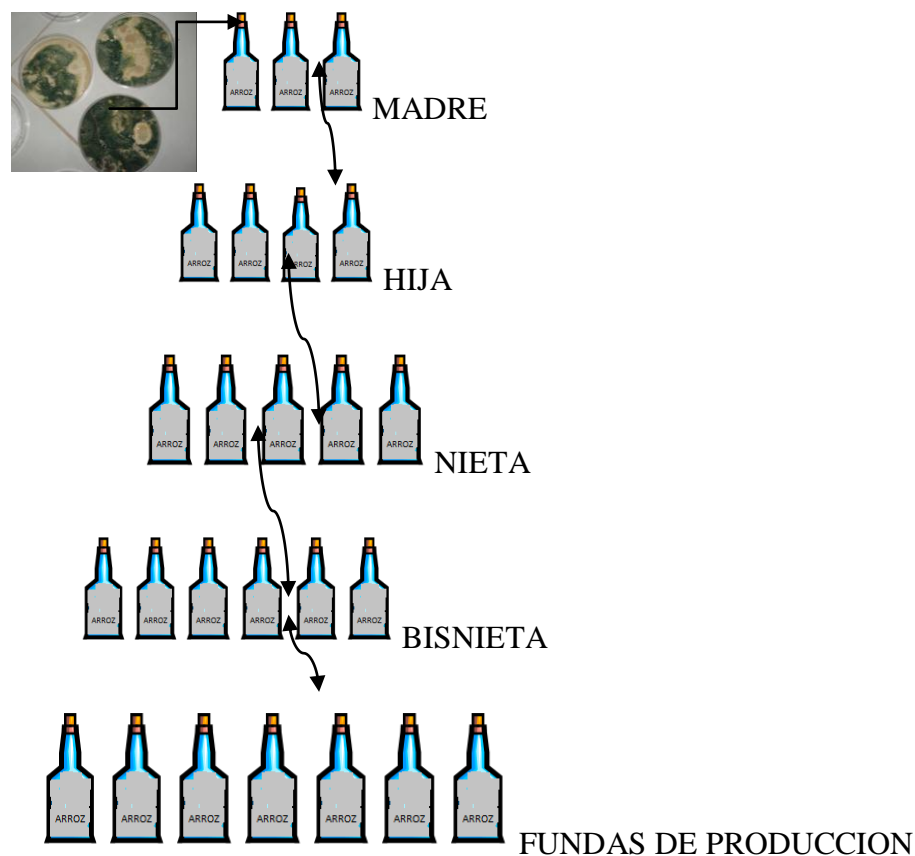


Grafico 39. Procesos de multiplicación y producción de *Trichoderma*

6.7.1.4. Cosecha de fundas de producción.

Para esto se debe observar que las fundas estén totalmente colonizadas por colonias de *Trichoderma*, lo cual se verifica por su coloración verde y su olor agradable a coco, estas están totalmente puras. Se realizara un flameado de la funda o botella, se tomara 1 g de arroz colonizado y se lo diluirá en 100 ml, se procede a realizar las placas para su observación y conteo a nivel del microscopio, esto se lo realiza con la finalidad de al final poder determinar la dosificación del producto comercial.

En cada funda o botella de producción se agregara agua destilada en una proporción de 1litro se da movimientos suaves hasta que el sustrato este totalmente libre de esporas, luego se procede a colar y envasar el producto en botellas autoclavadas se sella, etiqueta y guarda en un ambiente entre los 10 a 14° .C o a su vez en el refrigerador hasta cuando se realice la formulación comercial.

6.7.1.5. Formulación y dosificación.

Al producto obtenido se debe agregar 20ml de aceite agrícola cosechador de *Trichoderma* por cada litro con esto logramos que las esporas no se resequen y pierdan su viabilidad sino que se encapsulen y conserven todas sus características de agente biocontrolador.

Para determinar su dosificación se debe realizar el conteo de esporas realizando las diluciones correspondientes para lo cual se toma 1 ml de producto cosechado y se lo coloca en 9 ml de agua destilada la cual será la solución madre, de la cual se tomando 1ml y se lo colocara a un segundo tubo de este a un tercer tubo de ensayo y así sucesivamente hasta obtener una dilución que nos permita contar el número total de esporas contenidas en 1 ml. el proceso es el siguiente.

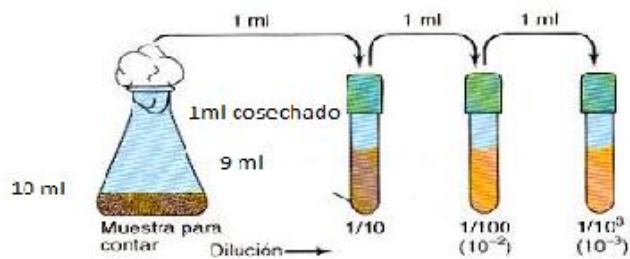


Grafico 40. Diluciones para conteo de esporas

Realizado el conteo con la ayuda de la cámara de Neubauer se procede aplicar la formula

$$\text{nt. conidios} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Superficie recontada (mm}^2\text{) x profundidad de la cámara (mm) x dilución}}$$

Con el número total de esporas contenidos en 1 ml, de cada una de las cepas procedo a realizar el litro comercial la cual estará lista para ser aplicado en camp.

Es decir.

En 1 ml 264000 conidios

X 3.4×10^{10} conidios

X = 128.7 ml

Entonces yo requiero de 128.7 ml de concentrado para un litro comercial.

6.8. Administración.

La presente propuesta está bajo la administración de la Asociación de Productores Agropecuarios y Comercialización María del Pilar en coordinación, supervisión y asistencia técnica del MAGAP - Bolívar, la misma que se convertirá en un campo demostrativo de las diversas tecnologías de producción sanas en cuanto a la generación de bioinsumos a base de microorganismos en el control de plagas y enfermedades de los diversos cultivos de la zona. Además será un centro donde pueden visitar e intercambiar experiencias estudiantes y agricultores de nuestro país.

6.9. Previsión de la evaluación

Con el producto de bioinsumos a base de *Trichoderma* se realizaran las aplicaciones a nivel del campo en la cual se irá registrando los comportamientos de los cultivos, en cuanto a su sanidad y desarrollo vegetativo, se realizara aplicaciones a las raíces y en la desinfección de semillas para observar su efectividad. Se utilizara para el control de plagas especialmente de suelo como son nematodos, cutzo, entre otros.

Así se registrarán los datos para realizar las debidas comparaciones en cuanto al rendimiento y calidad al usar productos biológicos vs, químicos y cuál es el costo de producción al utilizar dicha tecnología.

El seguimiento y monitoreo de todas las actividades tanto en producción de bioinsumos como las aplicaciones de campo estarán supervisadas por el técnico responsable del MAGAP y el promotor capacitado de la Asociación.

MATERIAL DE REFERENCIA

Agamez, R. Et al. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. X No. 2 Diciembre 2008 pp, 23-34.

Agosin, E.; et al . 1997. Effect of culture conditions and spore shelf life of the biocontrolagent *Trichoderma harzianum*. World J Microbiol Biotechnol 13, 225-232.

Arcia, A. 2006. Control de calidad de los productos usados en el control biológico de plagas y enfermedades y regulaciones de tipo legal. VII Feria de las Flores en Mérida. Estado Mérida, Venezuela, 2006.

Asero J. et al. 2007. Evaluación de *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp. en el control de “oídio”(Sphaeroteca pannosa) en rosas (*Rosa* sp.) variedad Aalsmer gold. Ascázubi, pichincha, Ecuador.

Baker, R. et al. 1997. Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens (pp. 153-182). Boca Ratón, Florida: CRC Press.

Benítez T, Rincón A. 2004. Mecanismos de biocontrol de *Trichoderma*.

Boletín Técnico de Producción N° 30, 2003, Centro de Desarrollo de agro negocios. México

Campell. 1989. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos, Dpto. Biología y Sanidad Vegetal, Universidad Agraria de La Habana.

Castro, A.; Rivillas, Carlos. 2003. Manejo sostenible de la llaga macana en cafetales renovados por zoca. Avances técnicos Cenicafé 312, 2-7.

Cobos, G. 2010. Trabajo de investigación “Evaluación de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. para el control de Sigatoka Negra (*Paracercospora fijiensis* m.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio” Escuela Politécnica del Ejercito, departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias.

Chet I. et al. 1987. *Trichoderma*, modo de acción y potencial como un agente de control biológico de hongos patógenos de la planta. pp. 137-159. Wiley, New York.

Claro, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) Ciudad de La Habana. 98 pdf.

Constitución del 2008 de la república del Ecuador.

Dubos et al. 1983. Manual de Control biológico de fitopatógenos de plantas.

Domínguez, T. 1994. Evaluación de nuevas cepas de *Trichoderma* spp. Como antagonistas de *Botrytis cinerea* y *Phytophthora* spp. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Chile, Santiago. 37pp

Elad, Y.et, al. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alteration with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*,42, 324-332

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

Falconí, C. et al. 2007. Publicación Científico Técnica, Validación de biopesticidas para el control de la moliniasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador.

Falconí C., 1998, “Fitopatología Práctica”, EDIESPE, Sangolquí – Ecuador, p. 119.

Falconí C. 1997. El Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Primera Edición. Quito. Ecuador. 200 pp.

Fernández, O.; Vega L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario, revista manejo integrado de plagas. Costa Rica. 62, p. 96- 100.

Gams W, Bissett J. 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma* . Francia

García, et al. 2005. Producción de biocontroladores. Curso Control biológico: herramienta básica en una agricultura sostenible.

Guigón, C. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. México

Harman, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma Harzianum*. pp. 84.

Harman G. et al. 1998. “El *Trichoderma* spp. Deuteromycetes, Moniliales (el sistema de la clasificación asexual).

Howell, et al, 2002. Aplicación de *Trichoderma*, modo de acción y potencial como un agente de control biológico de hongos patógenos de la planta.

Manual de producción y Utilización de *Trichoderma* sp, 2004, Centro de Educación y Tecnología, Fundación para la Innovación Agraria, Chile.

Manual de ODM. 2006. Objetivos de desarrollo del Milenio, Estado de situación para Bolívar.

Papavizas, G.C. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology*, 71,121-125.

Papavizas et al. 1982. Mejores medio de cultivo para el aislamiento de *Trichoderma* spp.

Papavizas, G.C. 1985. Manual de Biología, ecología y formas de actuación como un potencial controlador biológico

Papavizas, G.C. et. als . 1988. Fungi in biological control systems. En M.N. Bunge (Ed.). *The use of fungi in integrated control of plant diseases* (pp. 235-253). Manchester University Press.

Philon et al, 1997. Análisis de la acción de *Trichoderma* en el control de enfermedades fitopatógenas.

Rifai, M.A. 1969. Revision of the genus *Trichoderma* . *Mycological Papers*, 116, 1-56.

Rodríguez, E., et al. 2002. Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Termofílicas Aeróbicas, con Actividad Proteolítica, a partir de Pilas de Compost en Fase Termofílica.

Singh C, et al. 2007, análisis a nivel de los sistemas de los efectos de la calidad de la luz sobre el metabolismo de una cianobacterias.

Stefanova N. 1999. “Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos”. Instituto de Sanidad vegetal. La Habana. Cuba.

Tovar J, 2008. Evaluación de la capacidad antagonica de “in vivo” del aislamiento de *trichoderma* spp, frente al hongo fitopatógeno *rizhoctonia solani*, colomnnia 2008.

Villegas M. 2005. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Pp.659

Yedidia I. et al. 2000, Induction and accumulation of PR, proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* estain T- 203 . Plant phisiol Biochem.

Yumbay M. 2011. Tesis de Grado. Evaluación de Cepas de *Trichoderma* spp. en el control de botrytis cinérea en el cultivo de rosas

Controladores biológicos Ltda., 2006, característica de *Trichoderma* en fermentación solida. Chile.

www.agrupacionorganica.cl/quienes_somos/directorio/insumos.htm>

www.biocontroladores.cl/Prod/Trichoderma.htm

www.oriusbiotecnologia.com/tecnica/128-trichoderma-pers-caracteristicas-y-su-potencial-biologico-en-la-agricultura-sostenible

Anexos

Anexo 1. Promedios de colonización de *Trichoderma* en cada sustrato

UBICACIÓN		SUSTRATOS	NUMERO DE DIAS			Σ	x
GUARANDA	EL TUSO BAJO	ARROZ	5	9	8	22	7
		QUINUA	4	6	5	15	5
		CEBADA	7	7	12	26	9
SAM MIGUEL	SAN VICENTE	ARROZ	6	7	9	22	7
		QUINUA	3	3	5	11	4
		CEBADA	9	12	12	33	11
CHILLANES	SAN JUAN PAMBA	ARROZ	5	8	6	19	6
		QUINUA	3	5	5	13	4
		CEBADA	7	7	10	24	8

Anexo 2. Promedios de esporas contadas para cálculo de biomasa medio de cultivo MDA, TDA y PDA, de Chillanes. Guaranda y San Miguel

CONTEO DE ESPORAS EN MEDIO DE PURIFICACION PDA. LENTE 10X DILUSION 10³ PARA DETERMMINAR BIOMASA											
CEBADA MDA CHILLANES			CEBADA MDA GUARANDA			CEBADA MDA SAN MIGUEL					
35	25	30	28	31	30	35	37	36			
35	36	36	27	26	27	31	31	31			
28	31	30	28	33	31	35	33	34			
QUINUA MDA CHILLANES			QUINUA MDA GUARANDA			QUINUA MDA SAN MIGUEL					
32	19	26	15	18	17	21	22	21,5			
18	14	16	36	23	30	17	16	16,5			
25	25	25	13	16	15	15	15	15			
ARROZ MDA CHILLANES			ARROZ MDA GUARANDA			ARROZ MDA SAN MIGUEL					
38	31	35	23	21	22	24	21	22,5			
31	37	34	28	17	23	23	27	25			
34	23	29	19	25	22	23	24	23,5			
ARROZ TDA CHILLANES			ARROZ TDA GUARANDA			ARROZ TDA SAN MIGUEL					
32	33	33	30	31	31	37	37	37			
35	33	34	31	32	32	30	39	35			
34	36	35	39	27	33	45	41	43			
CEBADA TDA CHILLANES			CEBADA TDA GUARANDA			CEBADA TDA SAN MIGUEL					
32	34	33	23	19	21	27	14	21			
28	30	29	25	28	27	13	18	16			
26	28	27	22	26	24	23	30	27			
QUINUA TDA CHILLANES			QUINUA TDA GUARANDA			QUINUA TDA SAN MIGUEL					
31	32	32	25	16	21	20	22	21			
26	25	26	23	21	22	21	23	22			
6	6	6	16	15	16	21	20	21			
CEBADA PDA CHILLANES			CEBADA PDA GUARANDA			CEBADA PDA SAN MIGUEL					
34	32	33	16	19	18	38	18	28			
28	32	30	25	24	25	25	17	21			
31	32	32	22	25	24	17	28	23			
ARROZ PDA CHILLANES			ARROZ PDA GUARANDA			ARROZ PDA SAN MIGUEL					
35	25	30									
32	27	30	56	57	57	23	26	25			
18	22	20	77	66	72	26	24	25			
		80	77	62	70	17	25	21			
QUINUA PDA CHILLANES			QUINUA PDA GUARANDA			QUINUA PDA SAN MIGUEL					
23	21	22	25	21	23	28	23	26			
26	22	24	22	18	20	15	29	22			
18	17	18	24	28	26	27	26	27			

Anexo 3. Promedios para tasa de crecimiento de San Miguel en los diferentes medios de cultivo

TASA DE CRECIMIENTO DIARIO: SAN MIGUEL												
ARROZ	TDA			CEBADA	TDA			QUINUA	TDA			
	mm	mm	mm		mm	mm	mm		mm	Mm	mm	
	0	0	0		0	0	0		0	0	0	0
	0	0	0		0	0	0		0	0	0	0
	14,32	9,21	9,74		7,7	10,85	0		13,96	10,15	9,97	
	28,32	16,67	16,27		19,21	24,49	0		16,15	14,86	15,15	
	31,3	19,22	29,98		27,62	34,89	10,49		23,14	22,84	24,88	
	33,65	35,61	32,41		29,13	36,38	17,36		25,52	22,84	29,59	
	37,47	35,95	28,8		32,15	39,55	23,38		36,85	36,19	34,56	
	29,012	23,332	23,44		23,162	29,232	10,246		23,124	21,376	22,83	
	MDA				MDA				MDA			
	mm	mm	mm		mm	mm	mm		mm	Mm	mm	
	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
	4,93	7,72	11,98		0	0	0			0	0	
	12,6	14,95	21,33		7,025	0	0		11,99	4,59	7,79	
	16,32	15,45	26,34		9,23	16,33	9,68		13,12	8,88	12,4	
	19,55	21,9	24,18		11,11	19,77	10,43		16,99	20,43	26,58	
	20,53	21,91	24,85		13,35	21,13	16,35		30,77	37,66	33,6	
	14,786	16,386	21,736		8,143	11,446	7,292		18,2175	14,312	16,074	
	PDA				PDA				PDA			
	mm	mm	mm		mm	mm	mm		mm	Mm	mm	
	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
	9,24	17,67	9,63		11,9	0	0		15,14	20,15	6,47	
	28,83	31,37	23,24		17,05	0	0		25,28	30,64	22,025	
	32,21	38,46	39,04		25,3	7,63	10,085		34,39	37,04	30,75	
35,4	43	40,1	32,44	22,34	23,69	37,15	38,61	33,25				
39,66	43	43	39,19	32,44	41,27	41,56	40	36,54				
29,068	34,7	31,002	25,176	12,482	15,009	30,704	33,288	25,807				

Anexo 4. Promedios para tasa de crecimiento Chillanes en los diferentes medios de cultivo

TASA DE CRECIMIENTO DIARIOS: CHILLANES														
ARROZ	TDA			CEBADA	TDA			QUINUA	TDA					
	mm	mm	mm		mm	mm	mm		mm	mm	mm			
	0	0	0		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00		
	0	0	0		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00		
	7,24	7,225	7,525		0,00	0,00	0,00		7,71	0,00	0,00	0,00		
	14,555	7,325	7,6		7,20	6,70	47,45		7,71	6,86	0,00	0,00		
	25,81	19,97	21,55		7,20	6,89	47,50		9,06	7,36	12,46	12,46		
	26,06	20,47	22,3		17,12	16,96	39,99		12,77	15,38	19,32	19,32		
	26,06	20,47	22,3		17,12	16,96	39,99		12,77	15,38	19,32	19,32		
	19,945	15,092	16,255		9,727	9,501	34,983		10,003	8,993	10,219	10,219		
	26,31	20,97	23,05		27,05	27,04	32,48		16,48	23,40	26,19	26,19		
	42,51	42,75	24,55		35,73	27,20	32,48		16,52	23,05	26,19	26,19		
	MDA				MDA				MDA			MDA		
	mm	mm	mm		mm	mm	mm		mm	mm	mm	mm	mm	
	0	0	0		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	0	0	0		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	0	0	0		0,00	10,34	8,13		7,72	0,00	8,04	8,04	8,04	
	15,09	8,35	17,26		13,93	10,34	8,13		7,72	7,01	8,04	8,04	8,04	
	42,28	26,08	42,46		28,21	25,35	16,34		32,51	22,38	24,30	24,30	24,30	
	42,35	26,85	42,49		28,86	25,52	22,33		32,76	22,38	24,41	24,41	24,41	
	42,35	26,85	42,49		28,86	25,52	22,33		32,76	22,38	24,41	24,41	24,41	
	42,41	27,63	42,52		29,51	25,68	28,33		33,01	22,38	24,51	24,51	24,51	
	36,89	23,15	37,44		25,87	22,48	19,49		27,75	19,30	21,13	21,13	21,13	
	PDA				PDA				PDA			PDA		
	mm	mm	mm		mm	mm	mm		mm	mm	mm	mm	mm	
	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	7,13	6,86	15,31		15,45	6,87	0,00		8,96	10,64	9,77	9,77	9,77	
9,08	26,15	19,95	25,07	16,11	9,97	18,99	16,85	21,33	21,33	21,33				
19,20	37,22	24,98	34,70	27,84	13,60	33,77	30,15	36,07	36,07	36,07				
19,20	37,22	24,98	34,70	27,84	13,60	33,77	30,15	36,07	36,07	36,07				
30,20	37,22	29,18	39,67	36,95	17,27	33,77	30,15	36,07	36,07	36,07				
16,96	28,93	22,88	23,12	23,12	10,88	25,85	23,59	27,86	27,86	27,86				

Anexo 5. Promedios para tasa de crecimiento de Guaranda en los diferentes medios de cultivo

TASA DE CRECIMIENTO DIARIO: GUARANDA									
TDA			TDA			TDA			
mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7,84	12,39	15,21	11,015	17,51	11,9	0	0	0	
17,92	21,62	12,59	17,08	20,81	24,82	9,84	14,58	29,61	
23,1	23,69	16,36	27,89	31,9	33,91	22,73	23,48	35,98	
25,69	24,72	18,25	30,05	37,45	38,045	28,65	31,47	37,48	
28,29	25,76	20,14	38,7	43	43	31,61	35,47	38,19	
20,568	21,636	16,51	24,947	30,134	30,335	18,566	21	28,252	
ARROZ	MDA			MDA			MDA		
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7,94	9,84	9,29	0	0	0	0	0	0
	9,29	17,91	15,77	11,38	18,36	12,68	8,33	13,99	8,76
	19,21	21,48	20,05	28,6	24,42	23,25	26,61	21	23,9
	24,17	24,76	22,19	34,62	29,93	29,8	34,8	32	33,9
	29,13	28,05	24,33	37,063	32,69	33,07	38,9	40,5	38,45
	17,948	20,408	18,326	22,333	21,08	19,76	21,728	21,498	21,002
	PDA			PDA			PDA		
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14,085	6,48	0	8,07	11,91	6,67	0	0	0	
29,62	17,01	15,54	21,63	17,78	25,37	12,18	12,04	29,61	
24,85	18,91	21,016	36,49	24,91	32,75	22,73	23,48	37,48	
32,79	24,4	26,71	38,9	25,73	34,29	33,65	35,83	37,83	
36,76	26,94	29,56	40,11	27,64	35,05	34,11	37,65	38,01	
27,621	18,748	18,565	29,04	21,594	26,826	20,534	21,8	28,586	
CEBADA	MDA			MDA			MDA		
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7,94	9,84	9,29	0	0	0	0	0	0
	9,29	17,91	15,77	11,38	18,36	12,68	8,33	13,99	8,76
	19,21	21,48	20,05	28,6	24,42	23,25	26,61	21	23,9
	24,17	24,76	22,19	34,62	29,93	29,8	34,8	32	33,9
	29,13	28,05	24,33	37,063	32,69	33,07	38,9	40,5	38,45
	17,948	20,408	18,326	22,333	21,08	19,76	21,728	21,498	21,002
	PDA			PDA			PDA		
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14,085	6,48	0	8,07	11,91	6,67	0	0	0	
29,62	17,01	15,54	21,63	17,78	25,37	12,18	12,04	29,61	
24,85	18,91	21,016	36,49	24,91	32,75	22,73	23,48	37,48	
32,79	24,4	26,71	38,9	25,73	34,29	33,65	35,83	37,83	
36,76	26,94	29,56	40,11	27,64	35,05	34,11	37,65	38,01	
27,621	18,748	18,565	29,04	21,594	26,826	20,534	21,8	28,586	
QUINUA	MDA			MDA			MDA		
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7,94	9,84	9,29	0	0	0	0	0	0
	9,29	17,91	15,77	11,38	18,36	12,68	8,33	13,99	8,76
	19,21	21,48	20,05	28,6	24,42	23,25	26,61	21	23,9
	24,17	24,76	22,19	34,62	29,93	29,8	34,8	32	33,9
	29,13	28,05	24,33	37,063	32,69	33,07	38,9	40,5	38,45
	17,948	20,408	18,326	22,333	21,08	19,76	21,728	21,498	21,002
	PDA			PDA			PDA		
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	Mm
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14,085	6,48	0	8,07	11,91	6,67	0	0	0	
29,62	17,01	15,54	21,63	17,78	25,37	12,18	12,04	29,61	
24,85	18,91	21,016	36,49	24,91	32,75	22,73	23,48	37,48	
32,79	24,4	26,71	38,9	25,73	34,29	33,65	35,83	37,83	
36,76	26,94	29,56	40,11	27,64	35,05	34,11	37,65	38,01	
27,621	18,748	18,565	29,04	21,594	26,826	20,534	21,8	28,586	

Anexo 6. Fotografías del proceso de investigación.

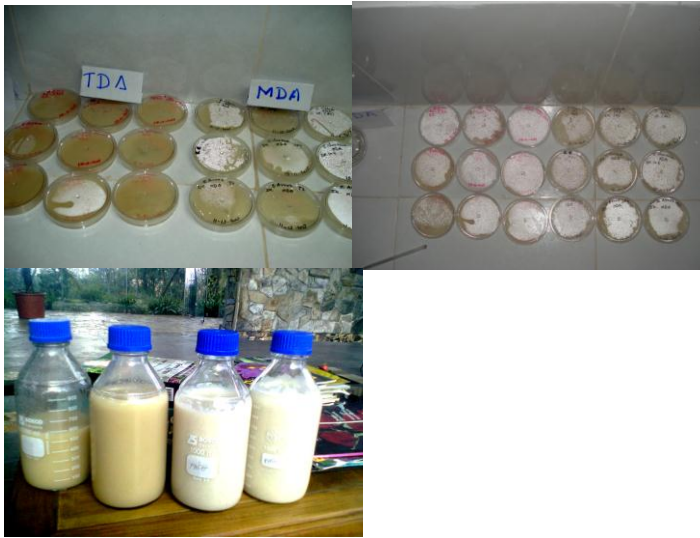
Preparación de sustratos o trampas nutricionales y Colocación de trampas nutricionales en cultivo de papa



Recolección de trampas nutricionales colonizadas con cepas de *Trichoderma*



Medios de cultivo para aislamiento de *Trichoderma*



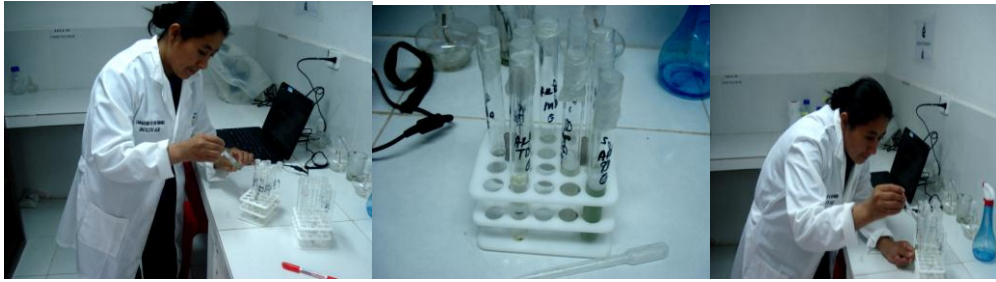
Inoculación de cepas de *Trichoderma* en los diferentes medios de cultivo



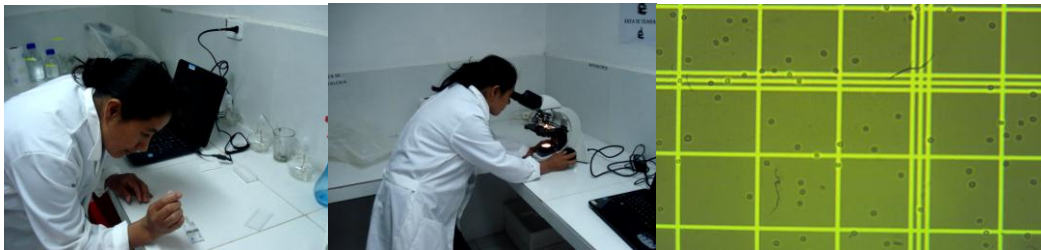
Medición de los halos de crecimiento diario



Preparación de diluciones para conteo de esporas



Preparación de placas para el conteo de esporas en la cámara de Neubauer,



Preparación de placas para identificación y caracterización

