



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EFFECTO DE *Trichoderma* spp. EN EL CULTIVO DE MORA DE CASTILLA
(*Rubus glaucus*) PLANTADO EN DIFERENTES CONDICIONES
AMBIENTALES DE LA GRANJA EXPERIMENTAL DE NONO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos.

Profesor guía

Ing. Wilson Arturo Vásquez Castillo Ph.D

Autor

Melissa Ivonne Rivadeneira Rivadeneira

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el (los) estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Wilson Arturo Vásquez Castillo
Doctor en Plant Physiology
CI: 1001186210

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Melissa Ivonne Rivadeneira R.

CI: 1718656430

AGRADECIMIENTOS

A la organización de investigación AgResearch de Nueva Zelanda, a la empresa ecuatoriana Ecuabiológica, al Dpto. de Protección Vegetal y Fruticultura del INIAP y a los profesionales involucrados por permitir el desarrollo del presente estudio mediante sus respectivas aportaciones.

DEDICATORIA

A Dios por sus infinitas bendiciones, a mis padres Oswaldo y Ma. Augusta, a mi hermana Pamela y abuelita Galuth por su amor, dedicación, apoyo y ejemplo; a mi buen compañero Esteban y a cada uno de mis amigos por los grandes momentos que compartimos.

RESUMEN

El presente estudio se realizó en la Granja Experimental de la Universidad de las Américas ubicada en la parroquia de Nono del cantón Quito, a una altitud de 2724 msnm y 18°C de temperatura. Los objetivos del estudio fueron: 1) evaluar el establecimiento y sobrevivencia *Trichoderma* de dos productos comercial y 2) evaluar el vigor y rendimiento de la mora de castilla por un periodo de 120 días, en dos condiciones ambientales (Invernadero y campo abierto). La evaluación estadística se realizó utilizando un diseño de parcela dividida con 4 repeticiones. A nivel de laboratorio los dos productos fueron de calidad ya que las cantidades obtenidas eran similares a las indicadas en la etiqueta. Sin embargo Trikofun® fue el producto con mayor calidad en base a la cantidad y viabilidad de las esporas ($3,3 \times 10^9$; 42,45% - Trichoeb®: $1,4 \times 10^9$; 25,9%). Cuando se evaluó el establecimiento de *Trichoderma* spp. a nivel de campo, se comprobó que Trichoeb® tuvo mayor sobrevivencia ya que se pudo llegar a obtener hasta $1,78 \times 10^4$ UFC g⁻¹ (120 días) en invernadero y $1,4 \times 10^5$ UFC g⁻¹ (90 días) en campo, valores cercanos a la dosis inoculada (1×10^4 UFC g⁻¹), mientras que Trikofun® presentó un 72,06% y 95,02% menos comparado con el establecimiento en invernadero y campo respectivamente. Además, Trichoeb® tuvo un mayor efecto en el vigor y rendimiento de las plantas de mora. El ambiente tuvo un efecto positivo y significativo en el rendimiento de las plantas, siendo las condiciones del invernadero más favorables que las de campo abierto, sin embargo, la interacción A x T marcó diferencias significativas entre los tratamientos, colocando a Trichoeb® en primer lugar con una media de $1,2 \times 10^4$ UFC g⁻¹, seguido de Trikofun® con media de $2,5 \times 10^3$ UFC g⁻¹ y por último el testigo con media de $4,1 \times 10^1$ UFC g⁻¹. Del estudio se puede concluir que el utilizar *Trichoderma* en la producción agrícola favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas y mejora el rendimiento. Adicionalmente, se determinó la existencia de *Trichoderma* nativa, misma que deberá ser estudiada para conocer su eficiencia y ser utilizada en el futuro como controlador biológico.

ABSTRACT

The current study was conducted at the Experimental Farm of Universidad de las Americas located in the parish of Nono in Quito, at an altitude of 2724 meters above sea level and 18 °C of temperature. The purpose of the study was to 1) evaluate the establishment and survival of two commercial products based on *Trichoderma* 2) evaluate the vigor and yield of Andean blackberry in a period of 120 days, in two environmental conditions (greenhouse and open field). The statistical evaluation was performed using a split-plot design with 4 replications. In the laboratory both products were catalogued as high quality products because the quantities of the analysis were similar to the ones reported on the label. However, Trikofun® was the product with higher quality based on the quantity and viability of spores ($3,3 \times 10^9$; 42,45% - Trichoeb®: $1,4 \times 10^9$; 25,9%). But, when the establishment of *Trichoderma* spp. was evaluated at field level, it was found that Trichoeb® had greater survival, since the values in greenhouse reached $1,78 \times 10^4$ CFU g⁻¹ (120 days) and values in open field reached $1,4 \times 10^5$ CFU g⁻¹ (90 days), these values were near the inoculated dose (1×10^4), while Trikofun® had lower establishment values, 72,06% and 95,02% less in greenhouse and open field respectively. Also, Trichoeb® had a greater effect on the vigor and yield of blackberries. The environment had a positive and significant effect in yield of plants, where greenhouse effect was the most significant, however, the interaction A x T marked the difference between treatments, placing Trichoeb® first with an average of $1,2 \times 10^4$ CFU g⁻¹, followed by Trikofun® with an average of $2,5 \times 10^3$ CFU g⁻¹ and finally the witness with an average of $4,1 \times 10^1$ CFU g⁻¹. From the study it can be concluded that using *Trichoderma* spp. in an agricultural production, promotes the growth and development of plants that improves performance. In addition, native strains of *Trichoderma* were found in the field, they should be studied to know its effectiveness to be used in the future as biological control.

Índice

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general.....	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
1.2 Hipótesis	5
2. Capítulo II. Revisión de literatura	6
2.1 Generalidades sobre el cultivo de mora (<i>Rubus glaucus</i>)	6
2.1.1 Clasificación taxonómica de la mora.....	7
2.1.2 Características morfológicas.....	8
2.1.3 Fenología del cultivo.....	8
2.1.4 Requerimientos climáticos y nutricionales.....	9
2.1.5 Situación del cultivo de mora en el Ecuador	10
2.1.6 Enfermedades en el cultivo de mora y plagas causantes	11
2.1.6.2 Plagas y enfermedades del suelo	12
2.2 Controladores biológicos	12
2.2 Características de <i>Trichoderma</i> spp.	15
2.3.1 Clasificación género <i>Trichoderma</i> spp.....	15
2.3.2 Factores que influyen en su desarrollo	16
2.3.3 Estructuras morfológicas del hongo.....	16
2.3.4 Especies.....	17
2.3.5 Efectos de <i>Trichoderma</i> spp. en la agricultura	18
2.3.6 Simbiosis entre <i>Trichoderma</i> – planta.....	19
2.3.7 Simbiosis entre <i>Trichoderma</i> y bacterias rizosféricas	20
2.3.8 Uso de <i>Trichoderma</i> spp. como controlador biológico: mecanismos de acción frente a microorganismos patógenos	20
2.3.9 Otros usos de <i>Trichoderma</i> spp.....	22

3. Capítulo III. Materiales y Métodos	24
3.1 Materiales y Equipos	24
3.1.1 Material biológico.....	24
3.1.2 Material de campo	24
3.1.3 Equipos	24
3.1.4 Sustancias.....	24
3.1.5 Material de cristalería y otros	25
3.2 Metodología	26
3.2.1 Ubicación.....	26
3.2.1 Fases de la investigación	26
3.2.2 Diseño experimental	27
3.2.3 Manejo del experimento	29
3.2.3.1 Fase de laboratorio 1: Prospección de <i>Trichoderma</i> de los dos ambientes.....	29
3.2.3.4 Fase de campo.....	30
4. Capítulo IV. Resultados y Discusión	32
4.1 Control de calidad de productos	32
4.2 Establecimiento de <i>Trichoderma</i> spp	33
4.3 Vigor de las plantas de mora de castilla.....	37
4.4 Rendimiento de plantas de mora (g planta ⁻¹)	39
5. Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones	44
5.1 Conclusiones	44
5.2 Recomendaciones.....	45
Referencias.....	46
Anexos	54

Índice de figuras

Figura 1. Vigor de planta de mora en función a la inoculación de <i>Trichoderma</i> a los 120 días de la primera inoculación. Elaboración propia. Programa Infostat.....	38
Figura 2. Distribución total de plantas de mora en la finca experimental de la granja experimental en Nono	57
Figura 3. Distribución de tratamientos aleatorios en la parte superior del campo.....	57
Figura 4. Distribución de tratamientos aleatorios en la parte inferior del campo.....	58
Figura 5. Distribución de tratamientos aleatorios en la parte izquierda del invernadero.....	58
Figura 6. Distribución de tratamientos aleatorios en la parte derecha del invernadero.....	58
Figura 7. Análisis suelo inicial. Análisis previo a inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. en el suelo del cultivo de mora en la Granja Experimental UDLA	72
Figura 8. Análisis suelo 4. Análisis de suelo al cuarto mes de la primera inoculación en el suelo del cultivo de mora en la Granja Experimental UDLA.	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica.....	7
Tabla 2. Guía para interpretación del análisis de suelo en mora de castilla	9
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp.	15
Tabla 4. Ubicación de lugares donde se realizó el estudio.	26
Tabla 5. Factores a evaluar con sus respectivos niveles	27
Tabla 6. Descripción de los tratamientos a evaluados	27
Tabla 7. Esquema ADEVA.....	28
Tabla 8. Resultados del control de calidad de los productos comerciales Trichoeb® y Trikofun® en el laboratorio de control biológico. Santa Catalina - INIAP 2016.	32
Tabla 9. Análisis de varianza del establecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en cuatro épocas de inoculación en mora de castilla. Nono 2016.	34
Tabla 10. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del establecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en mora de castilla inoculada en 4 épocas. Nono 2016.....	35
Tabla 11. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del establecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en dos ambientes. Nono 2016.....	35
Tabla 12. Análisis de varianza del vigor de plantas en cuatro meses. Nono 2016.....	37
Tabla 13. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto de los ambientes en el vigor de las plantas de mora. Nono 2016.....	38
Tabla 14. Análisis de varianza del rendimiento (g parcela ⁻¹) de mora de castilla durante cuatro meses. Nono 2016	40
Tabla 15. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto del ambiente en el rendimiento de mora de castilla, Nono 2016.....	42
Tabla 16. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. en el rendimiento de plantas de mora de castilla, Nono 2016.	42
Tabla 17. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. en el rendimiento de las plantas de mora de castilla en los dos ambientes, Nono 2016.	42
Tabla 18. UPA's, hectáreas, superficie en unidad productiva, superficie cosechada, producción y ventas del cultivo de mora en Ecuador.	56
Tabla 19. Manejo agronómico del cultivo de mora (Tratamientos, actividades y fertilización)	66
Tabla 20. Manejo agronómico (riego, poda, control de arvenses, cosecha)....	71
Tabla 21. Composición nutricional de la mora de castilla en 100g.....	72
Tabla 22. Población de <i>Trichoderma</i> spp. en los análisis de suelo a los 0,30,60,90 y 120 días de estudio.	75

1. Capítulo I. Introducción

Desde la antigüedad se han utilizado enfoques empíricos para control de plagas y enfermedades utilizando mezclas de compuestos químicos que dejan residuos en los alimentos, generando desconfianza en los consumidores. Por esto es importante controlar las enfermedades de los cultivos con métodos no convencionales, con bajo impacto al ambiente y la salud. En Ecuador, el Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) junto con AgResearch de Nueva Zelanda están ejecutando el proyecto “Biocontrol for Sustainable Farming Systems” siendo este estudio parte del mismo (MAGAP, 2013; Tripathi, Tripathi y Sharma, 2010).

Para el cultivo de mora (*Rubus glaucus*) las pérdidas por factores bióticos en pre y postcosecha son de alrededor del 40% de la producción, siendo las enfermedades del fruto las de mayor importancia como el moho gris (*Botrytis cinerea*) y la marchitez descendente (*Fusarium* spp.) que afecta a las raíces causando la muerte total de la planta (Leiva, 2011).

La mora de castilla es un cultivo de importancia económica en el Ecuador, debido a la gran aceptación de los consumidores tanto en el mercado nacional e internacional; también debido a las condiciones tanto de clima como de suelo y a los altos rendimientos potenciales. La superficie de este cultivo en Ecuador es de 4046 ha en monocultivo y 1201 ha en forma asociada (Calero, 2010; CICO-CORPEI, 2009).

Uno de los objetivos de la agricultura es la producción de alimentos seguros, asequibles y de calidad. El interés de una producción sostenible es creciente en el mundo, para esto se busca el uso de biofertilizantes y biocontroladores para producir productos de calidad y asegurar la inocuidad, rentabilidad del cultivo, protección de la salud humana y ambiental. Los productos biológicos son parte de tecnologías limpias que ayudan a dar solución a varios problemas del suelo como plagas y enfermedades con pequeño impacto al ecosistema (Bécquer, Lazarovits y Lalin, 2013; Roveda, Cabra y Ramírez, 2008).

La agricultura limpia ha permitido avanzar en investigaciones sobre agentes microbianos benéficos que pueden ayudar en la agricultura y farmacéutica. Uno de estos son los hongos del género de *Trichoderma*. Este género se encuentran en un diverso grupo de plantas y sus estructuras, lo que le permite tener un amplio rango de acción, tanto en las raíces como en la parte aérea (Stewart, *et al.*, 2010).

La presente investigación tuvo el fin de conocer el establecimiento y la viabilidad de *Trichoderma* spp. del suelo cultivado con mora de castilla; y prevenir enfermedades futuras en las plantas de mora (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2008).

El uso del hongo *Trichoderma* frente al uso de compuestos sistémicos no presentaron diferencias en el control de un patógeno (Hernández, 2001), sin embargo se debe recalcar los beneficios que conllevan el uso de un controlador biológico, entre los que se destacan la no presencia de residuos químicos en el suelo o en el fruto. El hongo benéfico puede crecer en el suelo de tal forma que induce resistencia por acción de enzimas proteolíticas, ayuda a la producción, manejo agronómico y crecimiento vegetal sin afectar al ecosistema que rodea al cultivo (Bécquer, Lazarovits y Lalin, 2013).

Según un análisis elaborado en el laboratorio de control biológico del INIAP (2014), se determinó la calidad de varios controladores biológicos que se comercializan en el país, siendo Trichoeb® de Ecuabiológica y Trikofun® de la ESPOCH los que tienen las mejores características, razón por la cual se optó por usar estos productos en el presente trabajo (Báez, Castillo y Oña, 2012).

Uno de los limitantes actuales para el cultivo de mora es la incidencia de factores bióticos y abióticos, entre estos, las plagas y enfermedades que afectan al rendimiento de cultivos y dependiendo del manejo pueden ocasionar incluso la muerte de las plantas. Los productores de mora en los valles y zonas altas de la sierra del Ecuador están limitados por estos problemas (Vasquez, *et al.*, 2014). Entre las enfermedades radiculares se encuentra la marchitez descendente de

la mora, se caracteriza por la pudrición de las raíces debido a la infección de hongos fitopatógenos que viven en el suelo como *Verticillium* sp, *Fusarium* sp, *Rosellinia* sp, *Cilindrocarpus* entre otros. Estos patógenos generan un amarillento de la planta, la misma que se marchita empezando con un doblamiento de las ramas y finalmente empieza a secarse y muere (Espín, 2012; ICA, 2011). Insectos plagas como *Frankliniella occidentalis* y *Phyllophaga* sp. habitan en el suelo y producen daños mecánicos graves al sistema radicular, siendo la puerta de ingreso de hongos y transmisión de virus (Montalvo, 2010; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016).

Además, la mayor demanda de frutales obliga al productor a utilizar pesticidas de origen sintético, lo que afecta al ser humano, el ambiente, contamina el agua y suelo, destruyendo microorganismos beneficios, e incrementando la posibilidad de proliferación de microorganismos patogénicos que vuelven más susceptible al cultivo y a los polinizadores (Ratnam, 2014). Este problema está presente porque los agricultores dudan de la calidad o no tienen información de los biocontroladores que ayudan a evitar y/o combatir enfermedades como la marchitez descendente. Respondiendo a las prioridades de los productores se ha incorporado en los protocolos de uso de microorganismos benéficos en el manejo integrado de plagas (MIP) para que puedan ser adoptados por los productores de mora (Vasquez, *et al.*, 2014)

Los organismos benéficos contribuyen a mantener un ecosistema sostenible, a través del equilibrio. Por otra parte la disminución de la biodiversidad esta dado por la producción agrícola de monocultivos, uso excesivos de pesticidas sintéticos y malas prácticas agrícolas, por eso es necesario el uso del control biológico como parte del manejo integrado del cultivo (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2008).

Debido a la creciente demanda de la mora de castilla, la superficie de siembra se ha incrementado (MAGAP, 2012). Sin embargo se mantienen prácticas convencionales y tradicionales para el control de plagas y enfermedades a través del uso exclusivo de productos de origen sintético y en forma indiscriminada que afectan el ambiente, el suelo y que pueden a causar problemas a la salud

humana por la residualidad y manipuleo de los pesticidas, además de un daño a la microfauna. Según MAGAP (2013) la Organización mundial de la Salud (OMS) y la FAO han llamado a que se proponga nuevas formas de control de plagas. En Ecuador, el Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) junto con AgResearch de Nueva Zelanda están ejecutando el proyecto “Biocontrol for Sustainable Farming Systems” para generar conocimiento y desarrollar tecnologías que mejore la producción del cultivo de mora en forma amigable con el ambiente (MAGAP, 2013). La presente investigación permitió conocer el establecimiento de los microorganismos benéficos; considerando diferentes condiciones de clima y de suelo una vez inoculado en el suelo y su efecto como controlador biológico de enfermedades en las plantas de mora (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2008).

1.1 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. en el cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*) plantado en dos condiciones ambientales de la granja Experimental de Nono.

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el establecimiento y sobrevivencia de dos cepas de *Trichoderma* spp. en plantas de mora de castilla cultivadas en invernadero y en campo abierto.
- Evaluar el vigor y el rendimiento de las plantas de mora de castilla cultivadas en distintas condiciones ambientales.

1.2 Hipótesis

Ha1. Existen diferencias en el establecimiento de *Trichoderma* spp. en el cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus*) plantado en dos condiciones ambientales de la granja Experimental de Nono.

Ha2: Existe efecto del hongo *Trichoderma* spp. en el vigor y rendimiento de la mora de castilla (*Rubus glaucus*) cultivada en distintas condiciones ambientales

2. Capítulo II. Revisión de literatura

2.1 Generalidades sobre el cultivo de mora (*Rubus glaucus*)

Las moras probablemente fueron parte de la dieta humana desde los inicios de la humanidad ya que son encontradas en todo el hemisferio norte. Hay estudios en los que la mora fue utilizada como vallas protectoras para mantener alejado a las fuerzas invasoras hace ya dos milenios y fueron mencionadas en libros de plantas desde los años 1600 (Clark, 2007).

El género *Rubus* es uno de los que contiene mayor número de especies dentro del reino vegetal, más de 700 especies que se encuentran distribuidas a lo largo de todo el mundo exceptuando zonas de desiertos (Roveda, Cabra y Ramírez, 2008). La región andina es el hábitat de gran variedad de especies, dentro de estas el subgénero *Rubus*, *Idaeobatus* y *Orbatus*, siendo el último originario de América Latina y el subgénero *Idaeobatus* introducido desde las regiones templadas del hemisferio norte (Garrido, 2009). Este género tiene una importancia comercial significativa, como es el caso de frambuesas y moras (Cárdenas, 2013).

Rubus glaucus es conocida generalmente como mora, un frutal que tiene su origen en los Andes, especialmente de regiones templadas de América del Norte y además en Europa y Asia. En Europa la mora es silvestre; algunas de estas variedades fueron introducidas a Estados Unidos y a Centroamérica donde tuvieron una excelente adaptación junto con las especies locales (Baraona y Sancho, 1998). La mora se cultiva comercialmente en Ecuador, Estados Unidos, México, Guatemala, Colombia, Perú y Chile por lo general en regiones de los valles de la Cordillera de los Andes (Garrido, 2009; Paz y Ruiz, 1999).

Los frutos de mora de castilla son bajos en calorías con propiedades antioxidantes, ricas en Vitamina C, taninos (acción astringente), aportan fibra, hierro y calcio (González, 2010; Martínez, *et al.*, 2013). Las hojas también pueden ser utilizadas como fuente de potasio, que ayuda a la generación y transmisión de impulsos nerviosos (Villaroel, 2009).

La planta de mora tiene propiedades medicinales, las hojas pueden ser fuente de potasio, en infusión presentan altos contenidos de antioxidantes, cantidad inferior a la de los vinos rojos e infusión de té, pero mayor capacidad que los vinos blancos y bebidas de frutas (Buřičová, *et al.*, 2011). Además investigaciones han concluido que la ingesta de bayas, entre estas la mora, tiene un impacto positivo en la salud humana (Seeram, 2008). Contienen variedad de antioxidantes entre ellos flavonoides, estilbenos, taninos y ácidos fenólicos, los cuales son fuentes exógenas proporcionadas por la dieta que ayudan a solucionar problemas cardiovasculares, inflamaciones y diabetes (Paredes, Cervantes, Vigna y Hernández, 2010). La cantidad de antocianinas y flavonoides es 1143,9 – 241,.4 y 102,0 – 160.2 mg/kg, comparando con vino rojo 380,9–7904,7 y 21,0–32,2 mg/kg (Cho, Howard, Prior y Clark, 2004) La composición nutricional de la mora se puede ver en Anexo7.

2.1.1 Clasificación taxonómica de la mora

A continuación se presenta la tabla con la información taxonómica de la mora de castilla.

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Reino	Vegetal
División	Antofita
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Arquiclamidea
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Rubus</i>
Subgéneros	<i>Eubatus (Rubus glaucus Benth)</i> (presente en Ecuador) <i>Idaeobatus</i> (presente en Ecuador) <i>Orobatus</i> (presente en Ecuador) y 9 Subgéneros más.
Especies (presentes en Ecuador)	<i>R. loxensis</i> , <i>R. azuayensis</i> , <i>R. acanthophyllos</i> , <i>R. coriaceus</i> <i>R. laegaardii</i> , <i>R. glabratus</i> , <i>R. roseus</i> <i>R. nubigenus</i> , <i>R. compactus</i> , <i>R. ellipticus</i> , <i>R. niveus</i> , <i>R. glaucus</i> , <i>R. megalpococcus</i> , <i>R. adenothallus</i> , <i>R. peruvianus</i> , <i>R. bogotensis</i> , <i>R. adenotrichos</i> , <i>R. killipii</i> , <i>R. floribundus</i> , <i>R. boliviensis</i> , <i>R. urticifolius</i>

Tomado de (Mejía, 2011).

2.1.2 Características morfológicas

La mora es una planta perenne y rastrera, por lo general con espinas pero puede encontrarse también variedades sin espinas realizadas bajo procedimientos de fitomejoramiento (Baraona y Sancho, 1998; Mejía, 2011). Las raíces son superficiales y ramificadas sin forma definida. Las raíces se forman a partir del cuello cicatrizal o de los acodos (Baraona y Sancho, 1998; Paz y Ruiz, 1999).

Los tallos nacen desde la base y forman un macollo, que dan origen a ramas primarias. Estas se bifurcan y generan las secundarias que dan origen a las ramas terciarias que darán el fruto, también hay ramas que no producen conocida como látigo (Baraona y Sancho, 1998; Paz y Ruiz, 1999).

Sus hojas por lo general son trifoliadas, compuestas, estipuladas, pecioladas y de bordes dentados con vellosidades en el envés (Baraona y Sancho, 1998; León, 2000; Monasterio-Huelin, 1992).

Las flores son terminales o axilares formando la inflorescencias como un racimo o panículas. Las flores varían de colores blanco a rosado (Monasterio-Huelin, 1992).

El fruto es una polidrupa, el número y tamaño de las drupeólas es variable de color rojo a negro brillante. Contiene semillas diminutas, de sabor dulce (Monasterio-Huelin, 1992; León, 2000).

2.1.3 Fenología del cultivo

La fenología de un cultivo comprende las etapas que se dan durante el desarrollo y crecimiento de la planta (Yanez, 1993), que se describe a continuación.

Se puede dividir a las etapas del cultivo de la siguiente manera:

- Crecimiento vegetativo. Empieza una vez que se siembra la planta en el lugar definitivo, dura aproximadamente 8 meses (Cerón, 2012 y Cárdenas, 2013)
- Etapa productiva. Inicia a partir de los 8 meses del transplante. La producción se va incrementando hasta que se estabiliza a los 18 meses. Las épocas de

mayor producción es en la etapa de lluvias. Se realizan cosechas semanales y después de cada cosecha se poda las ramas que hayan sido cosechadas con el fin de estimular el crecimiento de ramas laterales (Cárdenas, 2013; Cerón, 2012; Mejía, 2011).

2.1.4 Requerimientos climáticos y nutricionales

El cultivo de mora se adapta a suelos con buen drenaje (areno-arcilloso, franco-arcilloso y franco-arenoso), pH entre 5,6 a 6,7, siendo el óptimo 5,7, con un mínimo de 5 % de materia orgánica (Calero, 2010). La temperatura fluctúa entre 14 y 25°C. Se cultiva entre los 1800 a 3000 msnm de altitud y requiere de 1500 a 2500 mm al año de precipitación (Astudillo y Ochoa, 2007; Calero, 2010; Casaca, s.f; Zapata, 2014).

Los requerimientos nutricionales dependen de la zona y tipo de suelo. Es importante un análisis de suelo previo a la siembra para conocer la fertilidad del suelo y contrastar con los requerimientos del cultivo. INIAP ha desarrollado un programa de manejo nutricional para la mora de castilla. La aplicación de nutrientes según las fases de crecimiento se puede observar en el Anexo 1. (Martínez, *et al.*, 2013)

Tabla 2. Guía para interpretación del análisis de suelo en mora de castilla

		Óptimo
Meq/100ml	pH	5,5 – 6,5
	Al	0,3
	Ca	4 -20
	Mg	1 -10
	K	0,2 – 1,5
ug/ml	P	10 – 40
	Mn	5 - 50
	Zn	3 - 15
	Cu	1 - 20
	Fe	10 -50

Nota: ug = microgramos; meq = miliequivalentes. Tomado de: (MAG*, 2014)
*Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica.

2.1.5 Situación del cultivo de mora en el Ecuador

Ecuador cuenta con diversos microclimas que facilitan la producción de varios cultivos, entre estos cultivos los frutales andinos sobresalen por sus cualidades y calidad. Además, por su posición geográfica cuenta con variedad de frutas, entre las cuales está la mora dentro de la oferta exportable (PRO ECUADOR, 2012) que es cultivada por pequeños agricultores en los valles del callejón interandino (CICO-CORPEI, 2009). La superficie de este cultivo es de 4046 ha en monocultivo y 1201 ha asociadas con otros cultivos. La provincia de Tungurahua tiene el 41 % de producción y 32 % del total de la superficie cultivada y un rendimiento promedio de 4,75 t ha⁻¹. Le sigue la provincia de Bolívar con el 25 % de producción, 36 % de superficie cosechada y un rendimiento promedio de 1,82 t ha⁻¹, en tercer lugar Cotopaxi con 19 % de producción, 18 % de superficie cosechada y rendimiento de 2,87 t ha⁻¹. Las provincias de Chimborazo, Pichincha e Imbabura con 8,5 y 2 % de la superficie, respectivamente (Anexo 2). El manejo poscosecha de la fruta es muy delicado por ser un fruto no climatérico y tener alta perecibilidad (Calero, 2010; CICO-CORPEI, 2009). En el país, el 80% de las producciones en monocultivo y el 60% de producciones asociadas de mora utilizaban químicos en su cultivo, según el III Censo Agropecuario realizado en el 2003 (Mariño, 2005).

Actualmente existen algunas limitantes para la producción de la mora que están afectando la producción de la misma, relacionadas con la incidencia de factores abióticos (climáticas, suelo, fertilización, cantidad y calidad del agua). Sin embargo, otros factores que alteran la producción, son los bióticos, que ocasionan problemas fitosanitarios. Además, factores bióticos como las plagas ocasionan daños o enfermedades que disminuyen la producción de fruto. Además, al ser un cultivo susceptible a plagas y enfermedades, los productores han optado por utilizar plaguicidas para mantener una rentabilidad aceptable (Vásquez, Jackson, Viera, Viteri y Villares, 2014).

Por esta razón en la última década se ha llamado a la concientización del uso de plaguicidas en los cultivos. Instituciones como la Organización mundial de la Salud (OMS), la FAO e INIAP en el Ecuador han generado tecnologías con el

fin de aumentar la producción y rentabilidad de los cultivos reduciendo el uso de agroquímicos (MAGAP, 2013).

2.1.6 Enfermedades en el cultivo de mora y plagas causantes

Las plagas en el cultivo de mora causan diversas enfermedades que se detallarán a continuación:

2.1.6.1 Plagas y enfermedades aéreas

Phytophthora cryptogea, causante de la podredumbre del tallo, se debe detectar en laboratorio ya que en campo los síntomas son similares a otras especies de *Phytophthora* spp. (Agrocalidad, 2013; Pasquel, Gallo, Mullo y Silva, 2016).

Pernospora sp., afecta a flores, tallos, pedúnculo y frutos. Conocido también como mildiu veloso. Las flores toman un color amarillento y se secan. En el tallo se evidencia colores morados con blanco. Los frutos se deforman y su maduración no es uniforme, pierden brillo y turgencia. El pedúnculo se seca desde la parte superior hasta la inferior (Castellanos, Botero y Castrillón, 2003; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016; Tamayo, 2001)

Botrytis cinérea, causante de la pudrición del fruto conocida como moho gris, ataca a los frutos maduros, aunque también puede afectar a frutos verdes. Adicionalmente afecta a las flores y hojas, creando manchas grandes en los bordes (Castellanos, Botero y Castrillón, 2003; Delgado, 2012; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016; Hincapié, 2010).

Colletotrichum gloeosporioides, causante de la antracnosis del fruto, una vez infectado toma un color negro. Ataca a las ramas y tallos produciendo manchas oscuras (Delgado, 2012; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016; Hincapié, 2010).

Oidium sp., conocido como mildiu polvoso, el cual afecta a hojas jóvenes deformando su estructura donde se presenta la lesión. En el haz de la hoja se evidencia manchas cloróticas y en el envés un polvo blanco. Las ramas, flores y frutos se debilitan (Castellanos, Botero y Castrillón, 2003; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016).

Anastrepha sp., conocida como la mosca de la fruta, el daño causado es por la larva, que se alimenta dentro del fruto ocasionando su pudrición y desprendimiento (Montalvo, 2010; Delgado, 2012; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016).

Frankliniella sp., conocido como trips, un insecto chupador que aspira alimento de la planta, producen caída de las flores, una mal formación del fruto y transmisiones de virus (Montalvo, 2010; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016).

2.1.6.2 Plagas y enfermedades del suelo

Fusarium sp.*, *Rosellinia sp. Causantes de la marchitez y pudrición de raíces. Afectan a la nutrición de la planta, produce amarillento en las hojas y manchas negras en el tallo. (Castellanos, Botero y Castrillón, 2003; Delgado, 2012; Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016; Hincapié, 2010)

Phyllophaga sp., conocido como cutzo, son larvas que habitan en el suelo y destruyen las raíces (Gallo, Mullo, Pasquel y Silva, 2016; Iniap, 1995; Martínez, *et al.*, s.f).

2.2 Controladores biológicos

Un agente de control biológico es un “enemigo natural, antagonista o competidor, utilizado para el control de plagas y o enfermedades” (NIMF, 2005).

Para que un producto pueda ser utilizado como biocontrolador, este debe tener la capacidad de reducir la población de un inóculo patogénico y/o del motivo de la enfermedad de forma natural (Tripathi, Tripathi y Sharma, 2010).

Los agentes de control biológico pueden ser bacterias, virus, hongos, nematodos, protozoarios e inclusive insectos. Estos pueden ser potencialmente utilizados como agentes de control contra algún insecto plaga o enfermedad en particular ya que existe especificidad, lo cual significa que uno o varios actúan específicamente contra una plaga. De ahí la importancia de evaluar cada organismo en particular y su modo de acción contra plagas (Gutiérrez, Robles, Santillán, Ortiz y Cambero, 2013).

Cada cultivo es un ecosistema en el que habitan varios tipos de microorganismos, tanto benéficos como patogénicos. Según González, Molina, Sanfuentes y Zaldúa (2006), para aumentar la posibilidad de éxito entre la relación planta-antagonista se puede aislar cepas encontradas en la planta o ambiente obtenidos de los tallos, hojas o suelo. De esta forma existe mayor probabilidad de que estas cepas sean compatibles con el huésped y puedan proliferar con facilidad. Penga y Suttona (2009) utilizaron la misma técnica, aislando hongos y bacterias antagonistas de plantas de fresa para usarlas en el mismo cultivo y controlar para *B. cinerea*. Igualmente Martínez, Infante y Reyes (2013) concluyeron que la capacidad antagónica de las cepas es más efectiva si son nativas.

Otro de los parámetros para determinar el éxito que tendrá un antagonista es el número de unidades formadoras de colonia (UFC) presentes, naturalmente la cantidad de esporas/g de suelo es baja, por lo que su población es baja para controlar efectivamente un patógeno; sin embargo, una vez que se aísla el antagonista y se multiplica en laboratorio se puede llegar a aplicar dosis de 10^7 esporas de hongos/mL, concentración recomendada por los autores (González, Molina, Sanfuentes y Zaldúa, 2006; Penga y Suttona, 2009). Se debe tomar en cuenta que la capacidad de actuar como agente de control biológico depende de la especificidad de la cepa y el modo de acción de la misma, lo que significa que una cepa puede ser más eficiente que otra para el control de un

patógeno. Por tanto para alcanzar un control efectivo se requiere seleccionar adecuadamente el microorganismo dependiendo de las condiciones del lugar (Martínez, Infante y Reyes, 2013).

Se puede mencionar algunas características que los agentes de control biológico comparten para ser efectivos, según Cano (2011) y Nicholls (2008):

- Alta capacidad de reproducción in-vitro.
- Adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales.
- Alto grado de establecimiento.
- Alto grado de especificidad y sincronización con el hospedero y/o a plaga a controlar, para mantenerse viable a lo largo del ciclo de vida de la plaga.
- Alta tasa de crecimiento respecto a huésped y/o plaga.
- Capacidad de sobrevivir, pese a no tener presente a la plaga y alta capacidad de búsqueda para localizar a la plaga.
- Demostrar dependencia, modificando su acción en función de su densidad.
- Asequible para el agricultor.

El establecimiento de un agente de control biológico es esencial para lograr el éxito en una acción determinada, para esto se debe evaluar ciertas condiciones que requiere el microorganismo para sobrevivir. Según NIMF (2005) el establecimiento es la “perpetuación, para el futuro previsible, de un agente de control biológico, dentro de un área después de su entrada”.

Un caso de éxito de agente de biocontrol se demostró hace más de 70 años, es el caso de las cepas de *Trichoderma* spp. que tienen alta capacidad antagónica frente a varios patógenos de cultivos (Tripathi, Tripathi y Sharma, 2010).

2.2 Características de *Trichoderma* spp.

Trichoderma son hongos de vida libre, saprófitos que tienen alta tasa de interacción con la raíz, el suelo y el área foliar. Son hongos filamentosos anamórficos, heterótrofos, anaerobios facultativos, que se encuentran en forma natural en suelos con buena cantidad de materia orgánica. Componen el 3% de la población total de hongos en bosques y el 1,5% de la población total de hongos en los demás suelos (Tripathi, Tripathi y Sharma, 2010). No poseen una fase sexual determinada, representan más de 30 especies las cuales todas han tenido efectos benéficos sobretodo en agricultura. Estas especies actúan como controlador biológico por su rápido crecimiento y desarrollo, además por su capacidad de tolerar condiciones extremas (Cholango, 2009; Espín, 2012; Guilcapi, 2009). *Trichoderma* spp. Adicionalmente de su uso en la agricultura, este género es utilizado en la industria textil, de papel y de biocombustible (Studholme, *et al.*, 2013)

Los hongos de este género degradan materiales orgánicos en descomposición, por lo que suelos con alta cantidad de materia orgánica y/o en compostaje favorecen su crecimiento. Requiere de humedad para germinar y establecerse en el suelo. Su velocidad de crecimiento le permite parasitar microorganismos fitopatógenos que atacan los cultivos (Guilcapi, 2009).

2.3.1 Clasificación género *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp.

Dominio	Eucarya
Reino	Fungi
División	Mycota
Subdivisión	Eucomycota
Clase	Deuteromicetes
Orden	Moniliales
Familia	Monilia
Género	<i>Trichoderma</i>
Especies	<i>T. harzianum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. viridescens</i> , entre otros

Nota: Tomado de (Cholango, 2009; Sanchez y Rebolledo, 2010).

2.3.2 Factores que influyen en su desarrollo

Crece naturalmente en el suelo y también puede encontrarse en el agua. Los factores que influyen en el desarrollo del hongo son la temperatura, humedad, aireación, pH y exposición a la luz. En presencia de luz esporula rápidamente; en períodos alternados de luz y oscuridad su colonización se ve favorecida. Es capaz de utilizar varias fuentes de carbono y nitrógeno, degrada sustratos como almidón, pectina, celulosa y ácidos orgánicos para obtener carbono y aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Cholango, 2009).

La temperatura es un factor que influye notablemente en la germinación de los conidios, el crecimiento y formación del hongo. El rango de temperatura de crecimiento de *Trichoderma* está entre 10 y 40°C siendo el óptimo de 25 a 30°C. En temperaturas extremas no existe crecimiento sin embargo los conidios se mantienen viables para cuando las condiciones sean favorables (Poalacin, 2015).

La humedad del medio es importante para la actividad metabólica del hongo, influye en el crecimiento, biosíntesis y secreción de metabolitos. Si el hongo se encuentra con un medio de humedad limitada, tiene poca capacidad de difusión de nutrientes y degradación de sustrato, por lo tanto un bajo crecimiento. La cantidad de humedad óptima es del 60 a 70% (Martínez, Infante y Reyes, 2013; Poalacin, 2015). La aireación es importante, requieren de oxígeno y dióxido de carbono pero se debe verificar que no exista altas concentraciones de dióxido de carbono pues este inhibe el crecimiento del hongo (Poalacin, 2015).

Trichoderma spp. tolera un rango amplio de pH del suelo, entre 2.0 y 9.0, siendo el óptimo de 4 a 7. En pH ácido la asimilación de glucosa favorece el crecimiento y esporulación del hongo (Poalacin, 2015).

2.3.3 Estructuras morfológicas del hongo

Las colonias flojas o compactas del hongo, están en función de la estructura de los conidióforos (Guilcapi, 2009). El micelio está constituido por hifas hialinas,

septadas con paredes lisas y muchas ramificaciones (Guilcapi, 2009). Las clamidosporas son intercalares, ocasionalmente terminales o pueden desarrollarse sobre ramificaciones laterales de una hifa corta, de forma de globo o elipse y de pared lisa. Tiene olor a moho o humedad, color amarillo o verdoso de 6 – 15 μm de diámetro (Cholango, 2009; Guilcapi, 2009).

Los conidióforos son cónicos o piramidales de estructura compleja, caracterizada por su gran ramificación lateral corta, pueden encontrarse en grupos de tres (Guilcapi, 2009).

Las esporas son fialosporas que se producen individualmente o sucesivamente se acumulan en el ápice de las fialides, conformando una cabeza de esporas de diámetro menor a 15 μm . Pueden ser lisas o rugosas, hialinas, verde amarillentas a verde oscuro (Guilcapi, 2009). Las fialides están dispuestos por lo general en forma de verticilos, en parejas o irregulares (Cholango, 2009). Las hifas son anchas y rectas o pueden ser angostas y flexibles (Cholango, 2009).

2.3.4 Especies

Trichoderma harzianum, hongo mico-parasítico con conidios unicelulares de color verdoso de 3 a 6 μm de diámetro, ramificado en hifas de 3 a 12 μm , se reproduce asexualmente. Es eficaz contra pudriciones de raíz (*Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Phythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, entre otras). Sus métodos de acción son por competencia de nutrientes, antibiosis, micoparasitismo e inducción de defensa a la planta (Espín, 2012; Guilcapi, 2009).

Trichoderma viride, es efectivo para tratamiento en semillas y suelo. Aplicado a las semillas se multiplica de tal forma que mata a los patógenos y una vez sembradas brinda protección al suelo. Es eficaz contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. (Guilcapi, 2009).

Trichoderma reesei, se utiliza para la producción de enzimas que son aplicables en las industrias de papel, comida y textiles (Seiboth, Ivanova y Seidl-Seiboth, 2011). *Trichoderma hamatum*, promueve el crecimiento de la planta, induce resistencia foliar en arroz, produce varios metabolitos importantes en la

agricultura para tratar patógenos antes y después de la siembra (Studholme, *et al.*, 2013).

Trichoderma longibrachiatum, son productores de enzimas que hidrolizan celulosa, generalmente crecen en PDA, esporula a los 35°C y presenta color amarillento (Samuels, *et al.*, 2012).

Existen muchas más especies de *Trichoderma* entre ellas *T. aethiopicum*, *T. capillare*, *T. citrinoviride*, *T. effusum*, *T. flagellatum*, *T. gillesii*, *T. gracile*, *T. konilangbra*, *T. orientalis*, *T. parareesei*, *T. pinnatum*, *T. satunisporopsis*, *T. solani*. Todas las cepas estudiadas brindan beneficios en distintas áreas; agropecuaria, farmacéutica, bioremediación, entre otras, por lo que este género se considera benéfico en todos los aspectos (Samuels, *et al.*, 2012).

2.3.5 Efectos de *Trichoderma* spp. en la agricultura

Promueve el crecimiento de las plantas. Las enzimas y sustancias que producen las distintas especies del género *Trichoderma* actúan para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este hongo produce sustancias que actúan como catalizadores en los tejidos de las plantas especialmente en tejidos primarios lo que permite acelerar la reproducción celular para promover el desarrollo a diferencia de las plantas sin *Trichoderma*. Se reportan beneficios previos a la siembra ya que permitirá controlar los patógenos que se encuentran en el suelo en estado latente que podría afectar la siguiente cosecha (Espín, 2012).

Protección de semillas. Una vez que las semillas de una producción son almacenadas, estas son susceptibles a contaminación por hongos que afectan el potencial germinativo y productivo. Si se aplica *Trichoderma* a las semillas, el hongo coloniza las mismas, protegiendo de los patógenos favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Espín, 2012; Guilcapi, 2009).

Como parte de la preparación del suelo antes y durante el desarrollo del cultivo las aplicaciones con *Trichoderma* ayudan a eliminar patógenos del suelo que provocan enfermedades. Además se pueden utilizar en la remediación de suelos

y para ayudar a descomponer la materia orgánica del suelo. Aplicando *Trichoderma* ayuda a la descomposición de materia orgánica y así mantener los nutrientes disponibles para el cultivo y facilitar la absorción, además degrada compuestos como fosfatos para que sean asimilados por el cultivo. Su asociación con micorrizas ayuda a la rizósfera permitiendo que la planta pueda extraer más nutrientes (Espín, 2012; Guilcapi, 2009; Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña, 2009).

2.3.6 Simbiosis entre *Trichoderma* – planta

La asociación del género *Trichoderma* con las plantas genera una relación simbiótica beneficiosa. Las etapas de esta simbiosis son asociación y posteriormente el reconocimiento del hongo con la planta hospedera a través de la atracción, unión y penetración en la planta (Estrada, 2014).

Mediante la expresión de proteínas de varios genes, el género *Trichoderma* asegura la colonización tanto en la parte aérea como en la raíz, según Estrada (2014) las proteínas TasHyd1 y Qid74 son las que generan la colonización y adherencia del hongo a las raíces de las plantas, así también swolenina TasSwo y endopoligalacturonasa ThPG1 actúan para facilitar el ingreso a la raíz.

Como resultado de la colonización de *Trichoderma* favorece el crecimiento de la planta ya que el hongo sintetiza fitohormonas, solubiliza y aumenta la absorción de nutrientes e incrementa el desarrollo de la raíz. La planta presenta mayor tolerancia a condiciones desfavorables como: estrés hídrico, salino y térmico, también presenta mayor resistencia a patógenos del suelo y del área foliar (Estrada, 2014).

Las moléculas secretadas por *Trichoderma* activan el sistema de defensa de la planta y ayudan a su crecimiento. Según Estrada (2014) estas moléculas pueden ser las proteínas, péptidos, metabolitos y compuestos volátiles. Los hongos de este género presentan dos vías de inducción de la resistencia: 1) la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) la cual es mediada por el ácido salicílico y 2) Resistencia Sistémica Inducida mediada por la cantidad de ácido jasmónico y etileno (Díaz, 2012; Estrada, 2014).

2.3.7 Simbiosis entre *Trichoderma* y bacterias rizosféricas

Se conoce ampliamente que las bacterias rizosféricas son microorganismos benéficos para el cultivo. Dentro de los beneficios está la estimulación de crecimiento de la planta por mecanismos como producción de fitohormonas y fijación de nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de la planta y reducción de nitratos para volverlos más disponibles para la absorción por la raíz. Sin embargo se debe conocer el efecto que se presenta ante la inoculación de *Trichoderma* y de bacterias rizosféricas en el mismo suelo, o a su vez inoculación de *Trichoderma* en suelos que se encuentran gran cantidad de las bacterias en cuestión. Según Bécquer, Lazarovits y Lalin (2013), en el estudio de interacción de estos dos microorganismos se concluyó que entre *Trichoderma harzianum* y *Sinorhizobium meliloti* existió un efecto neutro, en la que las bacterias inhibieron parcialmente el crecimiento del hongo, pero los dos microorganismos continuaron viables lo que nos establece que se puede considerar bacterias pertenecientes a *Sinorhizobium* para prácticas agrícolas con *Trichoderma* spp.

2.3.8 Uso de *Trichoderma* spp. como controlador biológico: mecanismos de acción frente a microorganismos patógenos

Se han encontrado 104 especies y muchas de ellas se utilizan como agentes de control biológico por sus atributos beneficiosos, potencial biológico y sus múltiples modos de acción: micoparasitismo, antibiosis, competencia e inducción de resistencia a la planta (Stewart, *et al.*, 2010).

Dentro de los mecanismos de acción está el micoparasitismo, el cual consiste en que las hifas del *Trichoderma* entran en las estructuras del patógeno, se enrollan dentro del hospedero y puede atravesar la pared y membrana celular provocando la muerte del patógeno. También hay estudios según Rubio y Fereres (2005), donde el hongo provoca la muerte del patógeno sin necesidad de penetrar la pared celular. Los aislados de este microorganismo benéfico producen quitinasas y glucanasas en el cultivo, las cuales degradan los componentes de la pared celular en un microorganismo patogénico.

El modo de acción mediante antibiosis consiste en la producción de antibióticos o metabolitos que resultan tóxicos para el microorganismo patogénico. Aislados de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que impiden el desarrollo de otros microorganismos a su contacto. Entre los antibióticos que produce están la alameticina, dermadina, trichodermina, trichotecenos, trichorzianina y suzukacilina (Infante, Martínez, González y Reyes, 2009).

Otro mecanismo es la acción por competencia, es el comportamiento desigual de dos o varios microorganismos frente a un solo requerimiento, que puede ser un sustrato o nutrientes (Infante *et al.*, 2009). Este mecanismo es favorecido por el crecimiento y desarrollo más rápido debido a factores como el tipo de suelo, temperatura, pH y humedad. En la competencia por alimento, el microorganismo que pueda absorberlo mejor y que posea enzimas más activas, es el que obtiene más nutrientes y por lo tanto se desarrolla y crece más rápido. Este mecanismo se caracteriza por competencia de carbono y nitrógeno, pero también por oxígeno, hierro y en algunos casos por luz (Infante *et al.*, 2009). *Trichoderma* spp. es un género que puede sobrevivir en condiciones adversas, además tiene un rápido desarrollo y crecimiento, forma gran cantidad de esporas y sobrevive en varios sustratos. Estas características lo convierten en un saprófito de excelencia, además de un gran agente de control biológico (Rubio y Fereres, 2005).

Por el mecanismo de inducción de resistencia a la planta, el agente biocontrolador induce un sistema de defensa que le da posibilidad de combatir al patógeno. Esta resistencia a la planta se da a través de la expresión de una serie de genes que traducen las proteínas en refuerzo a estructuras proteicas (PR) (Candela, Ezziyyani y Maria Requena, 2005). *Trichoderma* tiene la capacidad de generar esta resistencia en respuesta a un mayor crecimiento de raíces y/o mejorar la disponibilidad de nutrientes. Además crear un ambiente beneficioso para la formación y crecimiento de toda planta, incrementa la productividad y aumenta la tolerancia de la planta al estrés por sequía (Infante *et al.*, 2009; Mukherjee, Horwitz, Singh y Schmoll, 2013; Rubio y Fereres, 2005).

Además se evidencian otros mecanismos de acción de *Trichoderma*, como el crecimiento quimiotrófico debido al estímulo químico; reconocimiento que se realiza mediante interacciones lectinas-carbohidratos, adhesión y enrollamiento de las hifas del microorganismo para unirse al hospedero y formar estructuras como ganchos con actividad lítica. La producción de enzimas líticas sirven para degradar estructuras del hospedero y facilitar la inserción de hifas del antagonista (Infante *et al.*, 2009).

2.3.9 Otros usos de *Trichoderma* spp.

Los microorganismos tienen la capacidad de remediar problemas ambientales transformando la biomasa de un sustrato en biocombustibles o reemplazar agroquímicos por controles biológicos (Hakansson, Sundh, Shoug, Nilsson y Jhonson, 2010, pp 1-10). Además previenen que componentes tóxicos contaminen el ambiente mediante bioprofilaxis. Esto se puede lograr mediante el aislamiento y domesticación de microorganismos específicos que tienen poder metabólico para proporcionar beneficios. La importancia se centra en obtener productos estables que sean de alta efectividad para resolver problemas, preservar el ambiente, cuidar la salud de las personas y además tenga la capacidad de generar ingresos económicos. Para formular un producto a partir de microorganismos es necesario tener en cuenta la viabilidad del hongo y una forma práctica para su uso. Existen nuevas técnicas como la encapsulación en biomateriales mediante geles inorgánicos a partir de óxidos de metales, métodos de secado que pueden mantener viable el producto por más de un año sin pérdidas significativas (Hakansson *et al.*, 2010, pp 1-10; Stewart, Ohkura y McLean, 2010).

En el ámbito agrícola no puede esperarse un reemplazo completo de químicos sintéticos por biocontroladores, sin embargo los controles biológicos como *Trichoderma* puede ser superior a los controles sintéticos en diversas áreas (Bokand y Kuykendall, 1998).

Las especies del género *Trichoderma* son capaces de sintetizar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilinasas y quitinasas (Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña, 2009). Este género es el que más produce celulasas, enzimas capaces de

degradar la pared celular de células, por esto la aplicación como preservantes en alimentos es una idea interesante ya que tiene efectos anti fúngicos y antibacterianos (Gupta *et al.*, 2014). Se utiliza también en la industria alimentaria para la elaboración de aromatizante, el hongo produce un metabolito llamado 6-pentil- α pirona que se percibe como olor a coco (Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña, 2009).

Además estas enzimas son usadas en la industria textil para suavizar el algodón y acabados en pantalones. La industria de detergentes utiliza las celulasas para cuidar el color de las prendas, ayuda a la limpieza y la anti redeposición para los detergentes en polvo. Las industrias productoras de pulpa y papel usan las celulasas en el proceso de blanqueamiento de papel, evitando así el uso de cloro. Se usa también para mejorar la digestión de alimentos para animales (Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña, 2009).

En la medicina, enzimas como mutanasa puede hidrolizar el polisacárido α -1,3-glucano (mutan), que es el agente que causa las caries dentales (Shimotsuura, Kigawa, Ohdera, Kuramitsu y Nakashima, 2008). Esta enzima puede ser aplicada en la pasta dental y así evitar la acumulación en la placa dental (Gupta, *et al.*, 2014). Las enzimas de *Trichoderma* sintetizan varias clases de péptidos, sus células producen antibióticos polipépticos (peptaibióticos) usados en la medicina para diversas infecciones (Gupta *et al.*, 2014; Schlecht y Bruno, 2015).

Para la industria de bioremediación, *Trichoderma* contiene una estructura celular compuesta de polisacáridos que ayudan en la absorción de metales, lo que le permite actuar como biosorbente. Este hongo puede ser una buena opción de bajo costo para la absorción de cromo (VI) de efluentes industriales (Gupta *et al.*, 2014). Plaguicidas organoclorados como el DDT, dieldrín y endosulfán pueden ser degradados por especies de *Trichoderma* mediante su sistema enzimático oxidativo. Colorantes químicos e hidrocarburos saturados presentes en aceites de combustibles también son degradados, además suelos contaminados con explosivos TNT pueden ser bioremediados con este hongo (Argumedo, Alarcón, Ferrera y Peña, 2009).

3. Capítulo III. Materiales y Métodos

3.1 Materiales y Equipos

3.1.1 Material biológico

- Trichoeb®
- Trikofun®

3.1.2 Material de campo

- Barreno
- Fundas resellables
- Palas
- Baldes 10 kg
- Bidón 200 kg
- Identificadores de colores

3.1.3 Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Esterilizador
- Incubadora
- Ultracongelador
- Microscopio óptico
- Balanza electrónica
- Medidor de actividad de agua
- Vórtex
- Agitador magnético
- Cámara de Neubauer

3.1.4 Sustancias

- Agua desionizada estéril 1 L
- Alcohol antiséptico 1L
- Medio de cultivo semiselectivo PDA + Captan

- Agua salinizada con Silwet L77 al 0.015%
- Medio de cultivo PDA + antibiótico (Ac. Láctico) + Triton
- Ácido láctico
- Tritón

3.1.5 Material de cristalería y otros

- Asas de inoculación
- Mechero
- Placas porta y cubre objetos
- Vasos de precipitación de 250 ml
- Matraz Erlenmeyer 500 ml
- Varilla de vidrio
- Cajas Petri estériles o desechables
- Algodón estéril
- Micropipetas
- Guantes quirúrgicos
- Mascarilla
- Tubos de ensayo

3.2 Metodología

3.2.1 Ubicación

La fase de campo se realizó en la finca experimental de la Universidad de las Américas ubicada al noroccidente de Quito, en la parroquia de Nono. La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de Control Biológico de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en Cutuglagua y laboratorios de microbiología de la Universidad de las Américas. Las localidades se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Ubicación de lugares donde se realizó el estudio.

Provincia	Pichincha	Pichincha
Cantón	Mejía	Quito
Parroquia	Cutuglagua	Nono
Sitio	EESC	Granja Experimental UDLA
Altitud	3064 msnm	2,724 msnm
Latitud UTM	9959382 m S	-0.064848
Longitud UTM	17M 0772618 m O	W 78° 45' / W 78° 30'

Nota: Tomado de Estación Meteorológica Izobamba, ubicada en la EESC-INIAP, 2016; Estacion metereológica finca UDLA

3.2.1 Fases de la investigación

El presente estudio se realizó en dos fases:

1) Fase de laboratorio.

Análisis de calidad del producto comercial Trichoeb® de la empresa Equabiológica y el producto Trikofun® de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Análisis de suelo (UFC g⁻¹) de los dos ambientes de la Granja de Nono (invernadero y campo abierto) donde está cultivada la mora, para conocer la presencia de *Trichoderma* y el contenido de materia orgánica.

2) Fase de campo: En la granja experimental de Nono en las parcelas de mora se inoculó Trichoeb® y Trikofun® de acuerdo a lo descrito en los tratamientos (Tabla 6), con base en los resultados del Laboratorio de Control Biológico del INIAP.

3.2.2 Diseño experimental

La investigación se realizó a través de un diseño de parcela dividida, en arreglo factorial 2 x 3 y 4 repeticiones.

3.2.2.1 Factores

Tabla 5. Factores a evaluar con sus respectivos niveles

Factor	Nombre	Niveles
1	Producto biológico a base de <i>Trichoderma spp.</i>	Producto A (Trichoeb®) 1x10 ⁴
		Producto B (Trikofun®) 1x10 ⁴
		Sin <i>Trichoderma</i> (testigo)
2	Ambiente	Invernadero
		Campo abierto

3.2.2.2 Tratamientos

Producto de la interacción de los factores se evaluó 6 tratamientos indicados en la tabla 6.

Tabla 6. Descripción de los tratamientos a evaluados

Tratamiento	Descripción
T1	Trichoeb® + Invernadero
T2	Trichoeb® + Campo abierto
T3	Trikofun® + Invernadero
T4	Trikofun® + Campo abierto
T5	Sin <i>Inoculación</i> + Invernadero
T6	Sin <i>Inoculación</i> + Campo abierto

Nota: La parcela estará formada por 3 plantas de mora

La distribución de los tratamientos y el orden las unidades experimentales se detallan en Anexo 3.

3.2.2.3 Modelo matemático

Se realizó un modelo matemático de diseño de Parcela Dividida con 4 repeticiones. El esquema se presenta a continuación:

Tabla 7. Esquema ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	23
Parcela principal	7
Repeticiones	3
Ambiente (A)	1
Error experimental A	3
<i>Trichoderma</i> (T)	2
A*T	2
Error experimental B	12
CV (%)	

3.2.2.4 Análisis funcional

Al presentarse diferencias estadísticas en los tratamientos evaluados se realizó pruebas de separación de medias con Tukey al 5%.

Variables

- Establecimiento de *Trichoderma* spp. (UFC/g de suelo): Se tomó una muestra de suelo de cada unidad experimental (300 g) de los primeros 30cm. Después de recoger la muestra de suelo se inoculó 1×10^4 UFC, lo que corresponde según el análisis de dosis (Anexo 4.1.3) a $0,73 \text{ g planta}^{-1}$ de Trichoeb® y $0,19 \text{ g planta}^{-1}$ de Trikofun®. Las evaluaciones se realizaron cada mes durante 4 meses consecutivos, los detalles se indican en el anexo 4.1.4.

- Vigor de la planta: Se evaluó a través de una escala desarrollada por INIAP (Anexo 5), esta escala presenta valores del 1 al 5; donde 1 son las más débiles y 5 las plantas más vigorosas. Esto se lo realizará al inicio y al final del experimento (4 meses).
- Rendimiento de fruta (g planta^{-1}): Se registró los datos de la cosecha de fruta semanalmente de cada una de las parcelas. Se pesó cada cosecha y se reportó mensualmente.

3.2.3 Manejo del experimento

3.2.3.1 Fase de laboratorio 1: Prospección de *Trichoderma* de los dos ambientes

Se recolectaron 3 muestras de suelo de cada ambiente (invernadero y campo abierto) con el fin de determinar la población inicial de *Trichoderma*, además para realizar un análisis suelo (Ver fase de campo 1). La metodología se describe en el Anexo 4.

3.2.3.2 Fase de laboratorio 2: Análisis de calidad de los productos biológicos Trichoeb® y Trikofun®

Para esto se siguió el procedimiento establecido por el Laboratorio de Control Biológico del INIAP, (Ver Anexo 4.2.1) donde se consideran las siguientes variables de calidad:

- Concentración del microorganismo expresado en esporas/gramo del producto (Ver anexo 4.1.2.1)
- Viabilidad del microorganismo expresado en UFC/gramo del producto (Ver anexo 4.1.2.2)
- Pureza del producto expresado en porcentaje (Ver anexo 4.1.2.3)
- Actividad de agua del producto (A_w) (Ver anexo 4.1.2.4)

3.2.3.3 Fase de laboratorio 3: Dosis de aplicada de *Trichoderma*

Mediante los resultados de análisis de la fase de laboratorio 2 (3.2.3.2) se definió la dosis a aplicar para cada producto, mediante la fórmula descrita en Anexo 4 (4.1.3).

3.2.3.4 Fase de campo

Se tomó 3 muestras de suelo de cada ambiente para la fase de laboratorio 1 (3.2.3.1), esta muestra es aleatoria, tomando así 3 muestras de invernadero y 3 muestras de campo abierto.

- Obtención muestra de suelo de la planta, del centro de cada unidad experimental con la ayuda de un barreno. Tomando en cuenta los primeros 30 cm de suelo.
- Se colocó en fundas resellables y etiquetar correctamente
- Identificación con la letra "I" si proviene de invernadero o con la letra "C" si proviene de campo abierto.
- Se identificó a cada tratamiento (del 1 al 6). Los números impares (1,3,5) son para invernadero y los números pares (2,4,6) son para campo.

Para el análisis de establecimiento del hongo, se tomó muestras de suelo provenientes de la planta del centro de las tres que conforman la unidad experimental siguiendo los siguientes pasos:

- Se recogió con la ayuda de un barreno 4 muestras en cruz del suelo de la planta seleccionada hasta conseguir una muestra de aproximadamente 300 g.
- Se etiquetó cada muestra de la siguiente manera: T_xR_x, el primer número junto a la T representa el número de tratamiento (del 1 al 6) y el segundo número junto a la R representa el número de repetición (del 1 al 4).

Se seleccionó 36 plantas de mora de castilla en invernadero y 36 en campo abierto, a las que se les inoculó *Trichoderma* spp. de acuerdo a lo establecido en la tabla de tratamientos (Ver anexo 2). La evaluación está en base a lo descrito en las variables. El manejo agronómico del

experimento en lo que respecta a fertilización, control de arvenses, riegos, podas y cosecha, está en base al programa de manejo del huerto de la granja de Nono de la Universidad. (Anexo 6.)

El monitoreo en campo se realizó según lo descrito en el cronograma, con el fin de observar una posible incidencia de plagas y tomar los datos necesarios.

El análisis de resultados se realizó estadísticamente mediante programas de computadora, con análisis Tukey 5% para pruebas significativas. Se utilizó el programa InfoStat versión estudiantil para analizar los datos.

4. Capítulo IV. Resultados y Discusión

Los resultados están organizados según las variables consideradas en el estudio. Se presentan los análisis de varianza y los cuadros de separación de medias para las variables que presentaron diferencias estadísticas, utilizando la prueba de Tukey al 5%. Los valores originales del establecimiento de *Trichoderma* spp. fueron transformados utilizando $\sqrt{x + 2}$ en vista que no tenían una distribución normal, además se presentaron valores con "0".

4.1 Control de calidad de productos

Con el fin de conocer la calidad de los productos comerciales se realizó un análisis de 6 parámetros de calidad en el laboratorio, mismo que se presentan en la tabla 8. Se puede concluir que Trichoeb®, que está formado por dos cepas de *Trichoderma* spp (*T. harzianum* y *T. viride*) y Trikofun® que está formado exclusivamente por *T. harzianum*, son dos productos con buena calidad respecto a los parámetros analizados. Respecto a la mayor cantidad de esporas y de colonias Trikofun® fue el de mayor valor (contaje), siendo éste producto de mejor calidad *in vitro* que Trichoeb®

Los datos presentados en la tabla 8 se utilizaron para la determinación de la cantidad de producto requerido (gramos) para alcanzar la dosis que se propuso (1×10^4 UFC g⁻¹).

Tabla 8. Resultados del control de calidad de los productos comerciales Trichoeb® y Trikofun® en el laboratorio de control biológico. Santa Catalina - INIAP 2016.

Parámetro	Trichoeb®	Trikofun®
Número de esporas (UFC/g)	1,44 x 10 ⁹	3,34 x 10 ⁹
Número de colonias (UFC/g)	3,71 x 10 ⁸	1,40 x 10 ⁹
Viabilidad = # colonias / # esporas. (%)	25,89	42,45
Contaminantes (unidad)	0	0
Pureza (%)	100	100
Actividad de agua (Aw)	0,44	0,48

4.2 Establecimiento de *Trichoderma* spp

Al realizar el análisis estadístico para el establecimiento de *Trichoderma* spp. (T) se observó diferencias estadísticas entre las cepas inoculadas y el testigo (sin aplicación) durante los períodos (30 d, 60 d, 90 d y 120 d) de aplicación. Mientras que para la interacción Ambiente x *Trichoderma* (A*T) únicamente existieron diferencias a los 90 y 120 días. Sin embargo, para ambientes (A) no se presentaron diferencias estadísticas (Tabla 9).

Respecto al establecimiento de *Trichoderma* spp. en el suelo después de la inoculación durante cuatro períodos de tiempo, los resultados demuestran que las cepas de Trichoeb® presentaron mayor establecimiento en invernadero durante los 120 días del estudio, superando en algunos casos hasta en 10 veces más a la cepa de Trikofun®, que fue el otro producto inoculado. Más aún si se compara con el testigo, en el que no se realizó inoculación. Respecto a la cantidad de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC g⁻¹), en general se pudo observar que Trichoeb® tiene una tendencia a incrementar la cantidad del inóculo conforme pasa el tiempo, es decir a los 30 días se observó 7233,7 UFC g⁻¹ mientras que a los 120 días llegó a 11254,6 UFC g⁻¹. Esta misma tendencia se observó con Trikofun® pero en menor cantidad, registrando a los 30 días 250,1 UFC g⁻¹ y alcanzando 3608,4 UFC g⁻¹ a los 120 días (Tabla 10). Respecto al testigo, se observó que las cantidades de *Trichoderma* spp. presentes en el suelo son muy bajas y la cantidad que se registró a través del tiempo no tiene un patrón definido y tampoco es estable (420,7 a 41,6 UFC g⁻¹). Al analizar la información obtenida entre Trikofun® y el Testigo, se determinó la existencia de diferencias aritméticas, sin embargo estas fueron estadísticamente iguales ya que comparten el mismo rango (b). Por otra parte, la ausencia de diferencias estadísticas entre ambientes (campo e invernadero), quiere decir que las condiciones de clima y suelo no tuvieron un efecto en el establecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 9. Análisis de varianza del establecimiento de *Trichoderma* spp. en cuatro épocas de inoculación en mora de castilla. Nono 2016.

		Establecimiento <i>Trichoderma</i> spp. (UFC g ⁻¹)							
		30 d		60 d		90 d		120 d	
F.V.	gl	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM
Total	23	302,37		70,76		2577,95		261,07	
Repetición	3	2,86	0,95	1,07	0,36	90,71	30,24	16,72	5,57
Ambiente (A)	1	20,72	20,72 ns	1	1 ns	178,76	178,76 ns	2,47	2,47 ns
Error Exp. (a)	3	35,47	11,82	4,59	1,53	128,02	42,67	12,76	4,25
Trichoderma (T)	2	159,93	79,97 *	54,6	27,3 **	1317,18	658,59 **	62,77	31,39 *
A x T	2	17,53	8,77 ns	1,46	0,73 ns	516,14	258,07 *	116,08	58,04 **
Error Exp. (b)	12	65,86	10,97	8,03	1,33	347,15	57,86	50,26	8,38
CV (%)		79,8		31,77		62,28		54,11	

Nota: F.V = Fuentes de variación; gl = grados de libertad; SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrados medios; ns = no significativo; *significativo (<5%), **altamente significativo (<1%)

Tabla 10. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del establecimiento de *Trichoderma* spp. en mora de castilla inoculada en 4 épocas. Nono 2016

		Establecimiento <i>Trichoderma</i> spp. (UFC g⁻¹)			
<i>Trichoderma</i>		30 d	60 d	90 d	120 d
1	Trichoeb®	7233,7 ± 6251,6 a	4316,2 ± 1066,5 a	78020,4 ± 87353,4 a	11254,6 ± 8308,5 a
2	Trikofun®	250,1 ± 206,2 b	462,4 ± 154,1 b	3174,5 ± 3775,6 b	3608,4 ± 6340,5 b
3	Testigo	191,8 ± 19,8 b	229,1 ± 131,7 b	420,7 ± 306,4 b	41,6 ± 110,2 b

Nota: Se observó diferencias significativas a los 30 días ($p=0,013$) y 120 días ($p=0,0073$); y diferencias altamente significativas en las otras mediciones: 60 días ($p=0,0011$), 90 días ($p=0,0017$).

*Los valores con igual letra no representan diferencia significativa.

Tabla 11. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del establecimiento de *Trichoderma* spp. en dos ambientes. Nono 2016

		Establecimiento <i>Trichoderma</i> spp. (UFC g⁻¹)	
Tratamientos		90d	120d
Invernadero	Trichoeb®	16282,5 ± 9927,2 b	17775 ± 5731,9 a
Campo abierto	Trikofun®	1383,3 ± 2897,2 b	6950 ± 4526,9 ab
Campo abierto	Trichoeb®	139758,3 ± 4656,3 a	4734,3 ± 187,1 b
Invernadero	Trikofun®	4965,8 ± 236,1 b	266,8 ± 144,3 b
Invernadero	-	324,9 ± 640,1 b	83,3 ± 7618,2 b
Campo abierto	-	516,5 ± 337,1 b	0 b

Nota: 90 días ($p=0,017$); 120 días ($p=0,0032$)

*Los valores con igual letra no representan diferencia significativa.

Probablemente la diferencia de establecimiento de los productos se dio porque Trichoeb® está compuesto por *T. viride* y *T. harzianum*, mientras que Trikofun® que está compuesto solamente por *T. harzianum*; lo que según Verde (2005) genera una simbiosis que ayuda a la sobrevivencia. Esta simbiosis se da al unir dos comportamientos efectivos de las cepas; el mismo autor señala que *T. harzianum* presentó un comportamiento antagonista agresivo ante el patógeno por lo que disminuye la velocidad de crecimiento, mientras que *T. viride* presenta alta competencia de nutrientes por lo que se reproduce rápidamente y puede llegar a obligar a la plaga a entrar en estado de latencia por falta de nutrientes. Adicionalmente ambas cepas presentan alta adaptación a diferentes condiciones de clima y suelo, resultados que concuerdan con lo reportado por Vásquez (2010).

En la tabla 9, se evidenció diferencias estadísticas para el establecimiento de *Trichoderma* spp en los diferentes ambientes. La interacción entre A x T a los 90 días es significativa y a los 120 días es altamente significativa (Tabla 11), los mayores valores de establecimiento de Trichoeb® se encuentra ($1,39 \times 10^5$ UFC g⁻¹) a los 90 días en campo abierto, mientras que, la mayor población en invernadero ($1,7 \times 10^4$ UFC g⁻¹) fue a los 120 días también con el producto Trichoeb®, siendo este el producto que generó mayor simbiosis entre las cepas con el cultivo en los dos ambiente, resultados que concuerdan con lo reportado por Vásquez (2010).

Con estos resultados se puede inferir que los dos productos comerciales se establecieron mejor en invernadero que en campo abierto; esto puede deberse a las condiciones favorables que genera un ambiente controlado como lo es el invernadero. Según Vásquez (2010) el establecimiento y desarrollo de *Trichoderma* está determinado por varios factores, uno de ellos es la temperatura, valores cercanos a 25°C genera condiciones favorables para el crecimiento. Comparando este factor con las condiciones climáticas de la granja experimental de la Udla en Nono, se evidenció que la temperatura del invernadero llegó a los 23 °C durante el día, mientras que la temperatura promedio máxima en campo abierto fue de 15 °C, lo cual pudo influir favorablemente en el establecimiento de *Trichoderma* spp. Además las

condiciones de suelo pudieron beneficiar también al establecimiento de *Trichoderma* spp. ya que según Calero (2010) el porcentaje de materia orgánica mínimo para un desarrollo óptimo es de 5%, valores cercanos a los que se encontraron en los dos ambientes de la granja (campo abierto=5,4% y 4.6 en invernadero) Ver análisis de suelo en Anexo 9.

4.3 Vigor de las plantas de mora de castilla

Esta variable se registró a los 0 días (inicial) y 120 días (final) y al realizar el análisis de varianza se observó que existieron solamente diferencias significativas entre ambientes sobre el vigor de las plantas, esto permitió inferir que existe un efecto de las condiciones tanto climáticas como de suelo, en el invernadero como de campo abierto. Por otra parte no existió efecto de *Trichoderma* spp. ni de la interacción A x T en el vigor de las plantas. (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de varianza del vigor de plantas en cuatro meses. Nono 2016.

F.V.	gl	Vigor de la planta			
		0 d (inicial)		120 d (final)	
		SC	CM	SC	CM
Total	23	4548,9		6745,8	
Repetición	3	311,5	103,8	470,8	156,9
Ambiente (A)	1	1584,4	1584,3 ^{ns}	3750,0	3750,0 [*]
Error Experimental (a)	3	1769,8	589,9	725,0	241,7
<i>Trichoderma</i> (T)	2	102,1	51,04 ^{ns}	452,1	226,0 ^{ns}
A*T	2	193,8	96,9 ^{ns}	568,8	284,4 ^{ns}
Error Experimental (b)	12	587,5	97,9	779,2	129,9

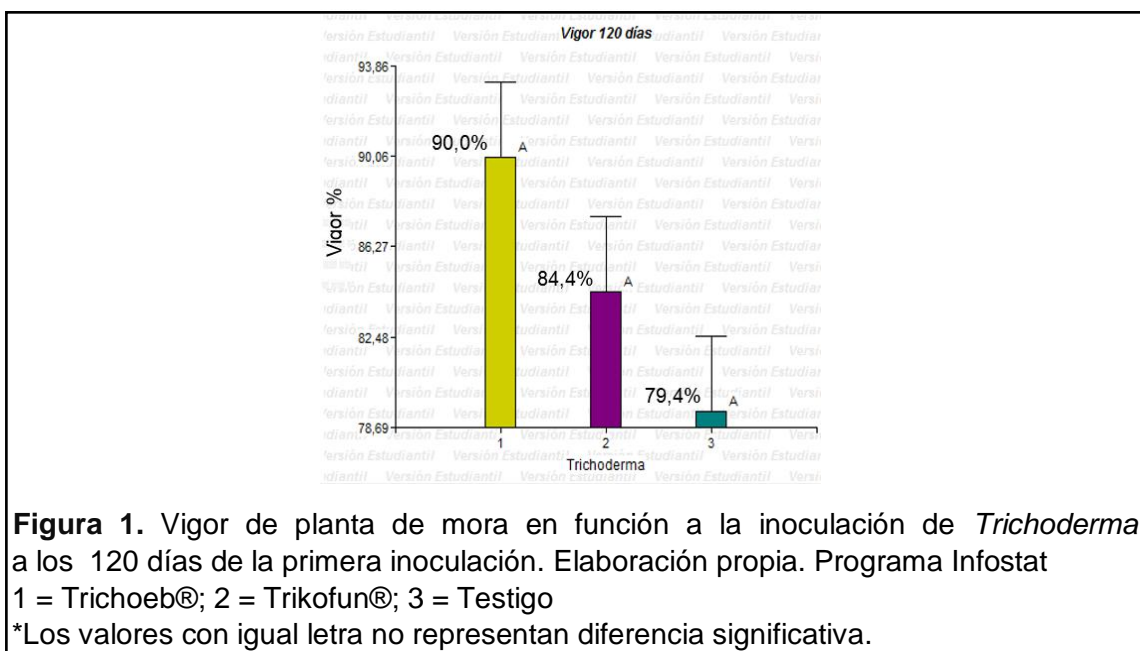
CV (%)

10,25

10,59

Nota: ns = no significativo; *significativo al 5%

En la figura 1 se muestra el efecto de *Trichoderma* en el vigor de las plantas, que a pesar de tener diferencias aritméticas, estadísticamente son iguales. Sin embargo Trichoeb® supera en un 6 % a Trikofun® y en un 10 % al testigo.



Al evaluar el vigor de las plantas dentro y fuera del invernadero (ambiente), se observó diferencias significativas al final del estudio (120 días). Se evidenció que todas las plantas de mora de castilla en el invernadero tuvieron un mayor vigor (desarrollo) ubicándose según la escala en 5, el valor más alto calificándose como muy vigoroso, mientras que en campo abierto el vigor alcanzo a la categoría de vigoroso en el número 4 (Tabla 13).

El vigor de una planta se debe comparar con una imagen de referencia como se realizó en el presente estudio utilizando las fotografías de la escala de vigor (Anexo 5). Fariña y Lorenzini (2003) sugieren que la disponibilidad de agua, nutrientes, temperatura, luminosidad, control de plagas entre otros son factores influyentes en el vigor de una planta; es decir el manejo agronómico es parte importante para que una planta tenga el vigor adecuado, así como una planta en estrés por cualquiera de estos factores presentaría bajo vigor.

Tabla 13. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto de los ambientes en el vigor de las plantas de mora. Nono 2016

Ambiente	Vigor de planta (escala)	
	120d	
Invernadero	97,08 ± 3,8	a
Campo Abierto	72,08 ± 15,33	b

Adicionalmente al tener un ambiente controlado se evita cambios fuertes de temperatura cuando existe un descenso en el número de horas luz al día ya que estos cambios son los que generan plantas débiles por falta de la luminosidad necesaria. Además la cantidad de agua que requiere cada planta se puede controlar dentro del invernadero, a diferencia de campo abierto que el agua puede ser escasa o a su vez abundante y puede causar enfermedades (Marlow, 2008). También se puede inferir que la cantidad de nutrientes y materia orgánica del suelo es muy parecida en ambos ambientes, según los resultados de los análisis de suelo, se concluyó respecto a materia orgánica invernadero cuenta con 4,6% y campo con 5,4% (anexo 9), cercano a la cantidad de materia orgánica mínima requerida que reporta Calero (2010), lo que favoreció al buen desarrollo de las plantas de mora.

4.4 Rendimiento de plantas de mora (g planta⁻¹)

Del análisis de varianza realizado se observa que existieron diferencias estadísticas del efecto del ambiente en el rendimiento por planta. Las diferencias estadísticas se presentaron a los 60, 90 y 120 días. El efecto de *Trichoderma* spp. en el rendimiento se evidenció únicamente a los 90 y 120 días. Mientras que para la interacción Ambiente x *Trichoderma* (A x T) existieron diferencias en rendimiento solamente a los 90 días (Tabla 14).

Respecto al efecto que causó *Trichoderma* spp. en el rendimiento, los resultados sugieren que existen diferencias entre los productos y también frente al testigo. Por tanto se acepta la hipótesis alternativa, ya que existe un efecto positivo de *Trichoderma* spp. en el rendimiento de la planta. Este mismo patrón se pudo encontrar para la interacción A x T, lo que sugiere que existe un efecto positivo de las condiciones de clima y suelo del invernadero frente a las condiciones de campo abierto.

Tabla 14. Análisis de varianza del rendimiento (g parcela⁻¹) de mora de castilla durante cuatro meses. Nono 2016

		Rendimiento (g planta ⁻¹)							
		30 d		60 d		90 d		120 d	
F.V.	gl	SC	CM	SC	CM	SC	CM	SC	CM
Total	23	149202,2		228223,9		745080,0		936825,4	
Repetición	3	17010,9	5670,3	40049,8	13349,9	44744,4	14914,8	92845,5	30948,5
Ambiente (A)	1	36356,0	36355,9 ns	102638,8	102638,8 *	465373,5	465373,5 *	556930,7	556930,7 *
Error Exp. (a)	3	22278,4	7426,1	14888,5	4962,8	70845,6	23615,2	99878,9	33293,0
<i>Trichoderma</i> (T)	2	6664,7	3332,4 ns	1501,8	750,9 ns	57296,7	28648,3 *	65728,9	32864,4 *
A x T	2	23705,0	11852,5 ns	11317,3	5658,6 ns	44975,8	22487,9 *	43196,4	21598,2 ns
Error Exp. (b)	12	43187,3	7197,9	57827,8	9638,0	61844,0	10307,3	78245,1	13040,9
CV (%)		36,5		41,5		36,3		42,6	

Nota: ns = no significativo; *significativo al 5%

El rendimiento de las plantas en invernadero fue muy superior al de campo abierto, durante todo el período estudiado. En el caso del invernadero el rendimiento se incrementó en un 24,3 % en un mes (de 60 a 90 días), mismo que siguió incrementando hasta los 120 d, pero en menor intensidad pasando de 317,2 a 329,4 g planta⁻¹. Mientras que el rendimiento de las plantas de campo abierto tuvo un descenso de producción de los 60 a los 120 d, siendo el más intenso entre los 60 a 90 días con un 70,8%. Además se pudo evidenciar que en invernadero el aumento de producción se extiende hasta los 120 días, lo contrario sucede en campo abierto donde el rendimiento decae hasta el final del estudio (Tabla 15).

El efecto de *Trichoderma* en el rendimiento de mora es significativo a los 90 y 120 días, donde se observó que el producto Trichoeb® generó un aumento del rendimiento en un 4,5% entre los 90 a 120 días. Mientras que el rendimiento de mora en las parcelas donde se inoculó Trikofun® y donde se encontró el testigo, se evidenció en general una disminución del rendimiento entre el 4,4 % y 3,4 % respectivamente (Tabla 16).

En la interacción A x T, se evidenció claramente que el rendimiento de las plantas del invernadero en combinación con la aplicación de *Trichoderma* y el testigo fueron superiores a los rendimientos registrados en campo abierto. El mejor registro de rendimiento se presentó en la interacción Invernadero x Trichoeb® con 382,38 g planta⁻¹ entre los 90 a 120 días, ocupando el primer rango (a), mientras que el menor rendimiento se obtuvo en campo abierto x testigo (sin aplicación) y campo abierto x Trikofun®, ya que produjeron 30,9 y 29,1 g planta⁻¹ respectivamente, ocupando el rango b. Sin embargo la desviación estándar para campo abierto x Trikofun® fue mayor comparando con el testigo (Tabla 17).

Tabla 15. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto del ambiente en el rendimiento de mora de castilla, Nono 2016.

Ambiente	Rendimiento (g planta ⁻¹)		
	60 d	90 d	120 d
Invernadero	255,2 ± 79,5 a	317,2 ± 150,7 a	329,4 ± 177,3 a
Campo Abierto	124,4 ± 64,3 b	38,8 ± 24,6 b	24,8 ± 14,6 b

Nota: 60 días ($p=0,019$); 90 días ($p=0,021$); 120 días ($p=0,026$)

*Los valores con igual letra no representan diferencia significativa.

Tabla 16. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto de *Trichoderma* spp. en el rendimiento de plantas de mora de castilla, Nono 2016.

Trichoderma		Rendimiento (g planta ⁻¹)	
		90 d	120 d
1	Trichoeb®	219,31 ± 190,9 a	229,33 ± 197,7 a
2	Trikofun®	205,31 ± 205,9 ab	196,36 ± 235,5 ab
3	Testigo	109,38 ± 84,6 b	105,56 ± 119,8 b

Nota: 60 días ($p=0,019$); 90 días ($p=0,028$); 120 días ($p=0,04$)

*Los valores con igual letra no representan diferencia significativa.

Tabla 17. Promedios, desviación estándar y prueba de Tukey ($\leq 0,05$) del efecto de *Trichoderma* spp. en el rendimiento de las plantas de mora de castilla en los dos ambientes, Nono 2016.

Tratamientos		Rendimiento (g planta ⁻¹)	
		90d	
Invernadero	Trichoeb®	382,38 ± 137,3	a
Invernadero	Trikofun®	381,5 ± 150,4	a
Invernadero	-	187,88 ± 39,1	b
Campo abierto	Trichoeb®	56,25 ± 28,5	b
Campo abierto	-	30,88 ± 9,2	b
Campo abierto	Trikofun®	29,13 ± 21,3	b

Nota: 90 días ($p=0,046$)

*Los valores con igual letra no representan diferencia significativa.

Se evidenciaron diferencias significativas del efecto del ambiente sobre el rendimiento de las plantas de mora. Según (Castaño, Morales y Obando, 2008) el cultivo de mora en condiciones de invernadero el desarrollo es más rápido que en campo abierto, además al tener un ambiente controlado se puede obtener

beneficios de las condiciones ambientales como temperatura, humedad y disminuir la incidencia de plagas (MAGRAMA , 2003).

Adicionalmente *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de degradar hongos y material orgánico, lo que favorece a la planta en el crecimiento, desarrollo y producción de fruto por la mayor disponibilidad de nutrientes (Espín, 2012). Además Andrade (2012) sugiere que este hongo benéfico es una alternativa para reducir el uso de fertilizantes sintéticos, ya que se puede lograr una mejor productividad mediante el efecto que tiene *Trichoderma* spp. en la solubilidad de fosfatos, que no son solubles de forma natural, facilitando la absorción de estos compuestos por la planta.

Entre la interacción de A*T el efecto en el rendimiento de las plantas se evidenció diferencias solamente a los 90 días, este periodo corresponde al mes de mayo en el que se obtuvo valores de productividad más altos. De acuerdo con lo observado en el presente trabajo, en el mes de mayo registró un aumento de temperatura y menos variación (Abril 2016 max: 20,2 °C - min: 7 °C; Junio 2016 max: 27 °C - min: 16 °C)

5. Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

El análisis *in vitro* de calidad de los productos comerciales en base a *Trichoderma* spp, determinaron diferencias entre ellos, siendo Trikofun® el de mejor calidad en base al número y viabilidad de esporas ($3,3 \times 10^9$; 42,45%) en comparación con Trichoeb® ($1,4 \times 10^9$; 25,9%). Es importante mencionar que Trichoeb® está formado por *T. harzianum* y *T. viride*, mientras que Trikofun® está compuesto únicamente por *T. harzianum*.

Trichoeb® fue el producto con mejor establecimiento (UFC g⁻¹) durante todo el período de estudio, tanto en invernadero como en campo abierto ($1,2 \times 10^4$ UFC g⁻¹) frente a Trikofun® ($3,6 \times 10^3$ UFC g⁻¹).

En la prospección inicial realizada en la granja de Nono se determinó la existencia de *Trichoderma* spp. nativo en poblaciones bajas (máximo $5,6 \times 10^2$ UFC g⁻¹).

El vigor de las plantas de mora fue mayor en el invernadero (97,1%) que en campo abierto (72,1%).

Debido a la mayor población de las cepas de *Trichoderma* en el suelo producto de la inoculación tanto en invernadero como en campo, el aumento de rendimiento de fruta de mora se vio favorecido. El efecto de Trichoeb® superó Trikofun® en un 16,8% y Trichoeb® al tratamiento testigo en 117,2%.

El rendimiento promedio de frutos de mora fue mayor en el invernadero ($329,4$ g planta⁻¹) que en campo abierto ($24,8$ g planta⁻¹).

El mayor rendimiento de fruta se obtuvo en plantas de mora de castilla inoculadas con Trichoeb® ($229,3$ g planta⁻¹), seguida de Trikofun® ($196,4$ g planta⁻¹) y el testigo ($105,5$ g planta⁻¹).

5.2 Recomendaciones

Aislamiento, identificación, multiplicación *in vitro* de las cepas nativas de *Trichoderma* encontradas en la granja experimental de Nono.

Evaluación en campo del establecimiento y multiplicación de la cepa nativa en base a características agronómicas.

Realizar las pruebas *in vitro* de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* frente a un patógeno conocido que afecte el sistema radicular de la mora.

Formar un cepario de microorganismos benéficos con el fin de usarlos a nivel de pre o post cosecha en diferentes cultivos.

Referencias

- Agrocalidad. (2013). *Guía de las principales plagas cuaternarias*. Recuperado el 3 de Junio del 2016, de Sanidad Vegeta: <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/09/Guia%20de%20plagas%20cuaternarias%202013.pdf>
- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R., y Peña, J. (2009). El genero fungico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental* , 257-269.
- Artunduaga, B. (2010). *Efecto de la fertilizacion en dos ecotipos de mora (Rupos sp) y su relacion con el rendimiento en andisoles (Tesis de maestría)*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Astudillo, F., y Ochoa, A. (2007). *Uso de la materia orgánica a nivel de finca (tesis de pregrado)*. Cuenca: Universidad de Cuenca. Obtenido de Universidad de Cuenca.
- Báez, F., Castillo, C., y Oña, M. (2012). *Control de calidad de productos biológicos ecuatorianos disponibles en el mercado*. Quito: INIAP.
- Baraona, M., y Sancho, E. (1998). *Fruticultura especial. Manzana, melocotón, fresa y mora*. San Jose: EUNED.
- Bécquer, C., Lazarovits, G., y Lalin, I. (2013). Interacción in vitro entre *Trichoderma harzianum* y bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 97-102.
- Bokand, G., y Kuykendall, D. (1998). *Plant-microbe interactions and biological control*. [Versión electrónica] Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=kMA3CGxhjLgC&pg=PA448&lpg=PA448&dq=Bokand++Kuykendall+%5C+Plant-microbe+interactions+and+biological+control.&source=bl&ots=tstpA1MwVx&sig=KnRkrUO8aWCVe6WHlf6wW7ezp9o&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjWk5qvhPbOAhXI6iYKHehjBfMQ6AEIJTAC#v=onepage&q=Bokand%20%20Kuykendall%20%5C%20Plant-microbe%20interactions%20and%20biological%20control.&f=false>
- Bolda, M. (2007). *Nutrición mineral de la fresa y mora*. Condado de Sant CRUZ: University of California Cooperative Extension.
- Buřičová, L., Andjelkovic, M., Čermáková, A., Réblová, Z., Jurček, O., Kolehmainen, E., Kvasnička, F. (2011). Antioxidant Capacity and Antioxidants of Strawberry,. *Czech J. Food Sci, Vol 29*, 181-189.

- Calero, V. (2010). *Estudio de prefactibilidad para la producción de mora (Rubus lanciniatus) variedad brazos en Atuntaqui-Imabura*. (tesis de pregrado) Quito: USFQ
- Candela, M., Ezziyyani, M., y Maria Requena. (2005). Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*, 143-153. Recuperado de: <http://revistas.um.es/analesbio/article/view/29941>
- Cárdenas, Y. (2013). *Evaluación agronomica y fenología de dos clones de mora sin espinas para determinar su potencial comercial, Tumbaco - Ecuador*. (tesis de pregrado). Quito: UCE.
- Casaca, A. (s.f). *El Cultivo de la Mora (Parte II)*. Recuperado el 2 de febrero de 2016, de INFOAGRO: http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_mora__parte_ii_.asp
- Castano, C., Morales, C., y Obando, F. (2010). *Evaluación de las deficiencias nutricionales en el cultivo de la mora (Rubus glaucus) en condiciones controladas para bosque montano bajo*. *Agonomia* (16) 1, 75 - 88
- Castellanos, P., Botero, R., y Castrillón, C. (2003). *Manejo integrado de enfermedades y plagas en Mora y tutores vivos en un sistema agroforestal*. [versión electrónica] Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=EmyQ6UT6p1AC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=Castellanos,+Botero,+y+Castrill%C3%B3n.+Manejo+integrado+de+enfermedades+y+plagas+en&source=bl&ots=VgNN9Jtdq&sig=jlj5uKKwuaGh7kz4o-4syQgk8qc&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjL3_jqi_bOAhXH4iYKHRgbAiMQ6AEIGjAA#v=onepage&q=Castellanos%2C%20Botero%2C%20y%20Castrill%C3%B3n.%20Manejo%20integrado%20de%20enfermedades%20y%20plagas%20en&f=false
- Cerón, F. (2012). *Evaluación agro-pomologica de 8 accesiones clonadas, seleccionadas de mora (Rubus glaucus Benth) en yanahurco, provincia de Tungurahua*. (Tesis de pregrado). Riobamba: ESPOCH.
- Cho, M. J., Howard, L., Prior, R., y Clark, J. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1771-1782.
- Cholango, L. (2009). *Selección de cepas de Trichoderma sp. in vitro para el control de problemas radiculares en flores de verano*. (tesis de pregrado). Quito: ESPE-IASA.

- CICO-CORPEI. (2009). *Perfil de Mora*. Centro de información e inteligencia comercial. Recuperado el 26 de mayo del 2016 de: <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/mora.pdf>
- Clark, J. (2007). Blackberry breeding and genetics. [versión electrónica] Recuperado de: http://barleyworld.org/sites/default/files/blackberry_breeding_and_genetics_plt._breed_rev_29_clark_et_al_2007.pdf
- Delgado, F. (2012). *Manejo orgánico del cultivo de mora (Rubus sp.) (Tesis de pregrado)*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Díaz, L. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 257-267. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1692-35612012000200030&lng=es
- Espín, M. (2012). *Validación de los componentes tecnológicos limpio u orgánico, con y sin Trichoderma para el manejo de cultivo de mora de castilla en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua (tesis de pregrado)*. Riobamba: Escuela de Ingeniería Agronómica.
- Estrada, M. (2014). *Transcriptómica de la interacción simbiótica Trichoderma virens-Arabidopsis thaliana y generación de mutantes en genes regulados diferencialmente en el hongo (tesis de maestra)*. San Luis Potosí: Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica IPICYT.
- Fariña, J., y Lorenzini, R. (2003). *Vigor de la planta de algodón (Gossypium hirsutum L)*. Santa Fé: Estación Experimental Agropecuaria RECONQUISTA. Recuperado de: <http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/05/EL-VIGOR-DE-LA-PLANTA-DE-ALGOD%C3%93N-GOSSYPIUM-HIRSUTUM.pdf>
- Gallo, M., Mullo, C., Pasquel, M., y Silva, A. (24 de Junio de 2016). Plagas presentes en el cultivo de mora - Agrocalidad. (M. Rivadeneira, Entrevistador)
- Garrido, P. (2009). *Evaluación de la diversidad genética de la mora cultivada (Rubus glaucus benth) y especies emparentadas en zonas productivas del Ecuador mediante marcadores moleculares RAPDs, ISSRs y AFLPs (Tesis pregrado)*. Quito: ESPE.
- Geilfus, F. (1994). *El Arbol. Manual de agrodoresteria para el desarrollo rural*. Turrialba: Enda-Caribe. [Versión electrónica] Recuperado de: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A4035E/A403502E.PDF>

- González, M. (2010). *Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (Tesis de pregrado)*. Riobamba: Universidad Politecnica de Chimborazo.
- Guilcapi, E. (2009). *Efecto de Trichoderma harzianum y Trichoderma viridae, en la producción de plantas de café (coffea arabiga) variedad caturra a nivel de vivero (tesis de pregrado)*. Riobamba: ESPOCH.
- Gupta, V., Schmoll, M., Herrera, A., Upadhyay, R., Druzhinina, I., y Tuohy, M. (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Poland: Elsevier. [versión electrónica] Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=GbxCAgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Biotechnology+and+biology+of+Trichoderma.&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjU1KWuj_bOAhXCUiYKHlBbgQ6AEIHTAA#v=onepage&q=Biotechnology%20and%20biology%20of%20Trichoderma.&f=false
- Hakansson, S., Sundh, I., Shoug, A., Nilsson, A., y Jhonson, M. (2010). DOM - domestication of micro-organism to solve environmental problems. En *Microbial products: exploiting microbial diversity for sustainable plant production* (págs. 1-10). Christchurch: S.M Zydenbos y T.A Jackson.
- Hernández, J. (2001). *Trichoderma en el Control Biológico de Enfermedades de Plantas Comparación del Control Químico y el Control Biológico*. Universidad del Zulia. Recuperado el 12 de mayo del 2016 de: <http://www.oocities.org/ecologia/luz/trichoderma12.htm>
- Hincapié, O. (2010). *Evaluación de alternativas para el manejo integrado de enfermedades en el cultivo de la mora en Rionegro Antioquia (tesis de pregrado)*. Medellín: Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.
- Hoyos-Carvajal, L., Duque, G., y Orduz, S. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 76-86. Recuperado de: http://agris.fao.org/agris-search/search.do?request_locale=es&recordID=CO201000099&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=
- ICA. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de mora (Rubus glaucus)*. Recuperado el 04 de septiembre del 2015 de <http://www.ica.gov.co/getattachment/b7e061eb-ebd3-4f80-9518-c771712405eb/-nbsp;Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-la-mora.aspx>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal v.24 n.1 La Habana*. Recuperado de:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

- Iniap. (1995). *El "Orozco" Phyllophaga spp. y su control*. Quito: Estacion Experimental Pichilingue. [versión electrónica] Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1547/1/Bolet%C3%ADn%20divulgativo%20N%C2%BA%20252.PDF>
- Leiva, L. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de la mora*. ICA. Recuperado el 02 de mayo del 2016 de: <http://www.ica.gov.co/getattachment/b7e061eb-ebd3-4f80-9518-c771712405eb/-nbsp%3BManejo-fitosanitario-del-cultivo-de-la-mora.aspx>
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. San José: Editorial Agroamérica [versión electrónica] Recuperado de: https://books.google.es/books/about/Bot%C3%A1nica_de_los_cultivos_tropicales.html?id=ZbiZ8Y-IlbwC&hl=es
- MAG. (2014). *Ministerio de Agricultura y Ganadería. Mora (Rubus spp.) Cultivo y Manejo poscosecha*. Recuperado el 02 de Febrero de 2016, de: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_mora_indice.html
- MAGAP. (2012). *Reporte de Resultados del Censo Provincial Completo en excel (Todas las Provincias)*. Recuperado el 20 de abril del 2016 de: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/resultados-provinciales>
- MAGAP. (2013). *INIAP inauguró laboratorio de Control Biológico e informó resultados de investigación sobre plagas*. Recuperado el 04 de septiembre del 2015 de: <http://www.agricultura.gob.ec/iniap-inauguro-laboratorio-de-control-biologico-e-informo-resultados-de-investigacion-sobre-plagas/>
- MAGRAMA (2003). Ministerio de Agricultura, alimentación y medio ambiente. La estabilidad de las frutas y hortalizas del poniente se tambalea. *Vida Rural*, 27-31.
- Mariño, D. (2005). *Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en el cultivo de mora en dos cantones de la provincia de tungurahua. (Tesis de pregrado)*. Quito: ESPE - IASA.
- Marlow, D. (2008). *Estrategia de invierno en invernadero*. Recuperado el 10 de mayo del 2016 de: <http://www.hortalizas.com/miscelaneos/estrategia-de-invierno-en-invernadero/>
- Martínez, A., Octavio Beltrán, G. V., Ayala, G., Jácome, R., Yáñez, W., y Valle, E. (2007). *Manual del cultivo de la mora de castilla*. Ambato: V&P publicidad.








- Martínez, A., Valverde, F., Villares, M., Ayala, G., Jácome, R., Viteri, P., y Vásquez, W. (2013). *Programa de manejo nutricional para mora de castilla (Rubus glaucus Benth)*. Quito: INIAP.
- Martínez, A., Vásquez, W., Ochoa, J., Villares, M., Jácome, R., y Ayala, G. (s.f). *Manejo de enfermedades e insectos plaga de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth)*. Recuperado el 03 de junio del 2016 de: <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Enfermedades%20e%20insectos%20de%20la%20mora%20de%20castilla.pdf>
- Martínez, B., Infante, D., y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista Protección Vegetal*. Recuperado de : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001
- Mejía, P. (2011). *Caracterización morfoagronómica de genotipos de mora (rubus glaucus benth) en la Granja Experimental Tumbaco - Iniap (Tesis pregrado)*. Quito: Espe.
- Monasterio-Huelin, E. (1992). *Revision taxonomica del genero Rubus L en la peninsula iberica e islas baleares (Tesis doctoral)*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Montalvo, D. (2010). *Evaluación de la calidad de poscosecha de las accesiones seleccionadas de mora de castilla provenientes de las provincias de Tungurahua y Bolívar (Tesis de pregrado)*. Quito: EPN
- Mukherjee, P., Horwitz, B., Singh, U., y Schmoll, M. (2013). *Trichoderma: Biology and Applications*. London: Cab international.
- NIMF. (2005). *Glosario de términos fitosanitarios*. Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria.
- Ospina, M. (2007). *Algunas consideraciones para la nutrición del cultivo de mora*. Recuperado el 02 de febrero de 2016 de: <http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/facultades/agroindustria/memoriasSeminarioMora/charlaBARPEN.pdf>
- Paredes, O., Cervantes, M., Vigna, M., y Hernández, T. (2010). Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life— A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 209-308. Recuperado de: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11130-010-0177-1>
- Paz, F., y Ruiz, L. (1999). *Estudio de la cadena productiva de la mora (Tesis de pregrado)*. Quito: UDLA.
- Poalacin, J. (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma harzianum y Trichodema hamatum en sustrato sólido (tesis de pregrado)*. Quito: Universidad Central del Ecuador.

- PRO ECUADOR. (2012). *Analisis sectorial de frutas no tradicionales*. Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones. Recuperado el 22 de junio del 2016 de: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/PROEC_AS2012_FRUTAS.pdf
- Proyecto Biocomercio Andino. (2014). *Biocomercio Colombia, Guia practica de tintes naturales y fieltro de lana*. Recuperado el 04 de febrero de 2016, de: http://biocomerciocolombia.com/docs/biocomercio_andino/Guia%20tintes%20y%20lanas.pdf
- Ratnam, R. (2014). *Trichoderma: Screening of Potential Bio-control Agent*. Omniscryptum GmbH & Company .
- Rotta, D. I. (2001). *Blackberry and Raspberry (Rubus spp.)*. Nueva York: Editorial Routledge.
- Roveda, G., Cabra, L., y Ramírez, M. (2008). *Uso de Microorganismos Con Potencial Como Biofertilizantes en El Cultivo de Mora*. Tabaitatá: Produmedios.
- Rubio, V., y Fereres, A. (2005). *Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Recuperado el 09 de febrero de 2016, de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Fereres%2c%202005.pdf>
- Samuels, G., Ismaiel, A., Mulaw, T., Szakaes, G., Druzhinina, I., Kubicek, C., y Jaklitsch, W. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity*, 77-108. Recuperado de: <http://link.springer.com/article/10.1007/s13225-012-0152-2>
- Sanchez, V., y Rebolledo, O. (2010). Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con Agave tequilana en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. *Revista Mexicana de microbiología*, 11-18.
- Schlecht, H., y Bruno, C. (2015). *Polypeptide Antibiotics: Bacitracin, Colistin, Polymyxin B*. Recuperado el 09 de febrero de 2016 de: <http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/polypeptide-antibiotics,-c,-bacitracin,-colistin,-polymyxin-b>
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2008). *La biodiversidad y la agricultura*. Recuperado el 23 de abril de: <https://www.cbd.int/doc/bioday/2008/ibd-2008-booklet-es.pdf>
- Seeram, N. (2008). Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *J. Agric. Food Chem*, 627-629.

- Seiboth, B., Ivanova, C., y Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels, Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. (D. M. Bernardes, Ed.) Recuperado el 7 de Febrero de 2015 de: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/20066.pdf>
- Shimotsuura, I., Kigawa, H., Ohdera, M., Kuramitsu, H., y Nakashima, S. (2008). Biochemical and Molecular Characterization of a Novel Type of Mutanase from *Paenibacillus* sp. Strain RM1: Identification of Its Mutan-Binding Domain, Essential for Degradation of *Streptococcus mutans* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2750-2765.
- Stewart, A., Ohkura, M., y McLean, K. (2010). Targeted screening for microbial bioactivity. En *Microbial products: exploring microbial diversity for sustainable plant production* (págs. 11-19). Christchurch: S.M Zydenbos y T.A Jackson.
- Studholme, D., Harris, B., Cocq, K. L., Winsbury, R., Perera, V., Ryder, L., . . . Grant, M. (2013). *Investigating the beneficial traits of Trichoderma hamatum GD12 for sustainable agriculture insights from genomics*. Recuperado el 07 de febrero de 2016 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726867/citedby/>
- Tamayo, P. (2001). *Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia*.
- Tripathi, A., Tripathi, N., y Sharma, N. (2010). Biological Control of Plant Diseases: An Overview and the *Trichoderma* System as Biocontrol Agents. En A. Arya, & A. Perelló, *Management of fungal plant pathogens*. Wallingford (págs. 122-134). Wallingford: CABI.
- Vásquez, J. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en un cultivo artesanal. (Tesis de pregrado)*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Vásquez, W., Jackson, T., Viera, W., Viteri, P., y Villares, M. (2014). *Integrated Andean blackberry (Rubus glaucus) crop management using beneficial microorganisms by small farmers in the Ecuadorian Andes*. XVIII International Plant Protection Congress. Abstracts.
- Villaroel, V. (2009). *Evaluación nutritiva y nutracéutica de la mora de castilla deshidratada a tres potencias por el método de microondas (Tesis de pregrado)*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Yanez, Z. (1993). *Estudio de la fenología de cinco variedades de papa en dos épocas de siembra (Tesis de pregrado)*. Riobamba: ESPOCH.
- Zapata, C. (2014). *Evaluación de la producción de explantes de mora sin espina en la fase de multiplicación en un sistema de inmersión temporal. (tesis de pregrado)* Quito: ESPE.




Anexos




Anexo 1. Programa de manejo nutricional para mora de castilla - INIAP

P	CV	D1	B2	D1	E	E
Después de poda	Crecimiento vegetativo	Inicio de floración	Plena Floración	Inicio fructificación	Desarrollo de fruto	Cosecha
						
Requerimiento N-P	Requerimiento N-P-K	Requerimiento de P-Boro	Requerimiento P-Fe-Zn	Requerimiento N	Requerimiento N-K-Ca	Requerimiento N-P-K-Mg-Ca

REQUERIMIENTOS DE MACRO Y MICRO NUTRIENTES DE ACUERDO A LAS FASES FENOLÓGICAS DE MORA

ALTERNATIVAS DE MANEJO NUTRICIONAL

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES/ha						
Macronutrientes (Suelo): N = 330Kg , P = 60 Kg , K = 300 Kg						
Micronutrientes (Quelatos a hojas): Boro, Hierro, Zinc, Calcio, Magnesio al 0,1%						
TECNOLOGIA INIAP (MANEJO LIMPIO)						
NITROGENO Urea	52 lgr /planta cada dos meses durante todo el año					
FOSFORO Super Fosfato Triple , 18-46-00	75 g/planta cada 4 meses					
POTASIO 0-0- 60 Sulpomag	75 g/planta Muriato de K cada 2 meses en desarrollo de frutos + 100g/planta Sulpomag 2/veces/año					
Microelementos Quelatos de B,Zn+Fe,Mg Ca.	QUELATOS EN CADA FASE FENOLÓGICA AL FOLLAJE 0,1 %	Quelato Boro 0,1% hinchamiento yema Quelatos Fe+Zn 0,1%cu amarre frutos (2) Quelatos Ca=0,1% desarrollo fruto Quelatos Ca=0,1% enlongación fruto Quelato Boro 0,1% hinchamiento yema				
Materia orgánica Compost 2Kg/plta Bioway= 2Kg/planta	MO + Bioway Dos veces por año		Bioway=2kg/pta MO 2 kg/pta	Pachamama 0,15% en drench, 2 l/pta		Pachamama 0,15% en drench, 2 l/pta
MANEJO ORGANICO						
Materia orgánica 4 kg/pta Bioway 2kg/pta	MO + Bioway Tres veces año		Bioway=2Kg/plt + 4 kg MO/planta	Pachamama = 0,15% en Drench, 2 ltr/plt	Bioway=2Kg/plt + 4 kg MO/planta	Pachamama = 0,15% en Drench, 2 ltr/plt
Microelementos Quelatos organicos de B,Zn+Fe,Mg Ca.	Quelatos en cada fase fenológico follaje 0,1 %	Quelato Boro 0,1% hinchamiento yema Quelatos Fe+Zn 0,1%cu amarre frutos (2) Quelatos Ca=0,1% desarrollo fruto Quelatos Ca=0,1% enlongación fruto Quelato Boro 0,1% hinchamiento yema				

Tomado de (Martínez, et al., 2013)

Anexo 2. Situación del cultivo de mora en Ecuador

Tabla 18. UPA's, hectáreas, superficie en unidad productiva, superficie cosechada, producción y ventas del cultivo de mora en Ecuador.

Provincia	Tipo de cultivo	UPAs	Ha.	Superficie en edad productiva (Hectáreas)	Superficie cosechada (Hectáreas)	PRODUCCIÓN (Tm.)	VENTAS (Tm.)
Azuay	permanentes monocultivo	208	69	67	65	114	110
	Asociados	625	123	122	121	152	150
Bolívar	permanentes monocultivo	1.217	1.098	nd	nd	12	*
	Asociados	9	*				
Chimborazo	permanentes monocultivo	261	90	64	58	79	78
	Asociados	82	42	38	31	12	12
Cotopaxi	permanentes monocultivo	1.852	1.360	1.332	1.325	5.072	5.025
	Asociados	36	*	*	*	*	*
Imbabura	permanentes monocultivo	376	79	62	58	67	61
	Asociados	82	21	*	*	*	*
Pichincha	permanentes monocultivo	239	62	45	41	75	65
	Asociados	102	*	*	*	*	*
Tungurahua	permanentes monocultivo	6.696	1.255	1.191	1.076	3.710	3.610
	Asociados	2.681	968	894	637	1.005	949
TOTAL	permanentes monocultivo	10.909	4.046	3.779	3.636	10.490	10.283
	Asociados	3.637	1.201	1.115	848	1.287	1.211

Nota: * Dato oculto en salvaguarda de la confidencialidad individual y confiabilidad estadísticas. Tomado de: (MAGAP, 2012) III Censo Nacional Agropecuario

Anexo 3. Mapa de tratamientos en la granja experimental de Nono de la UDLA

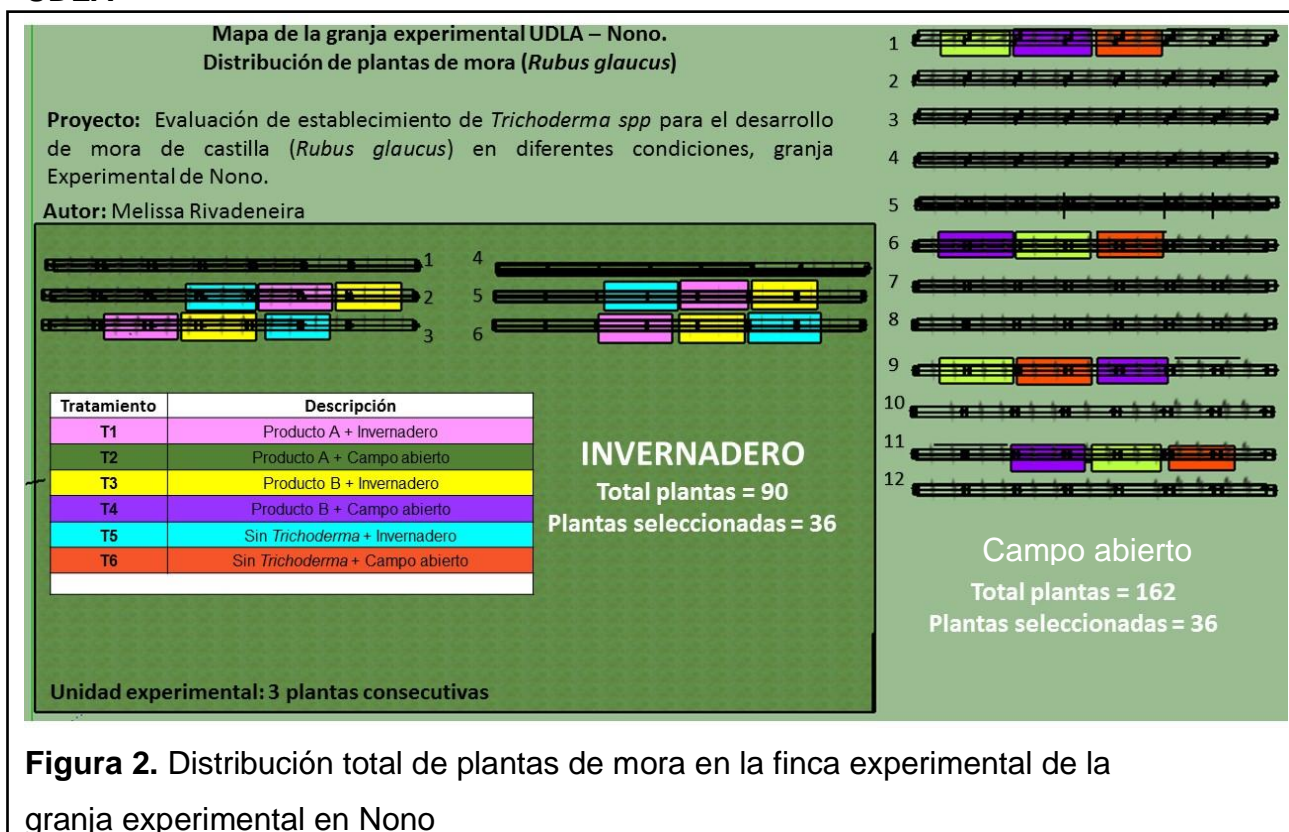
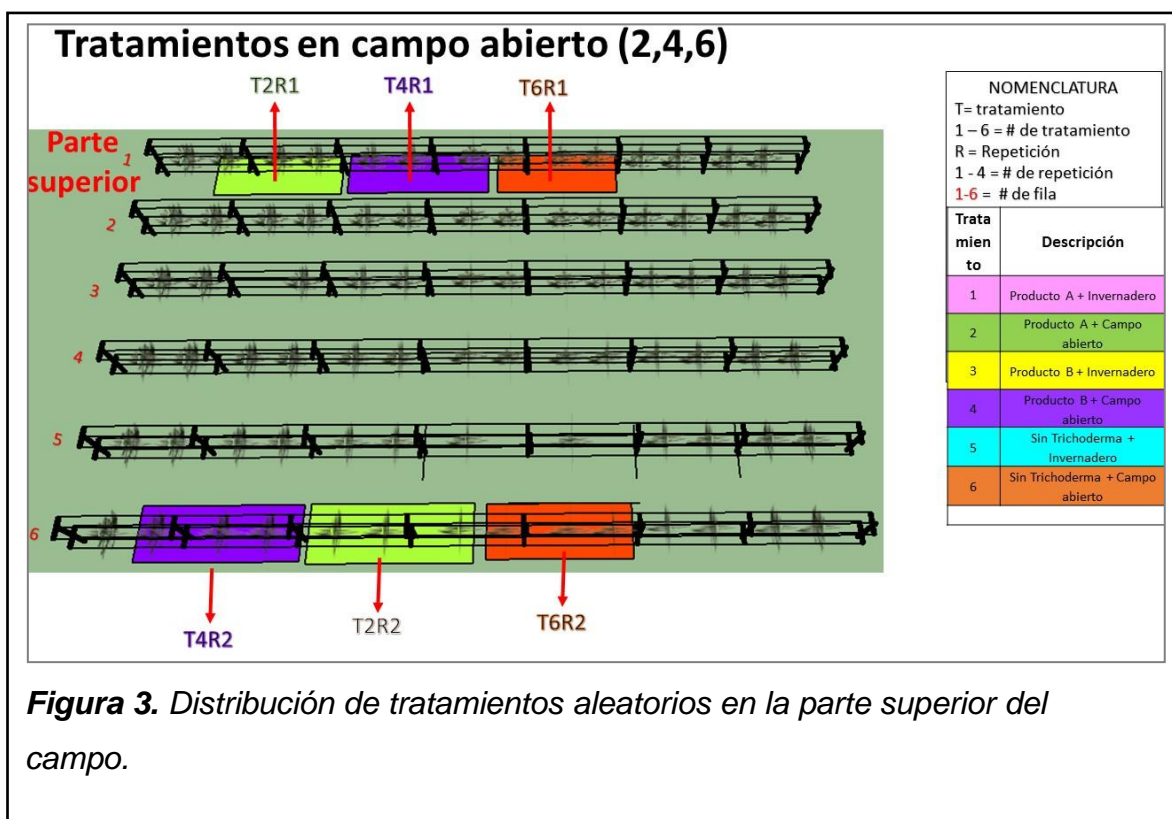
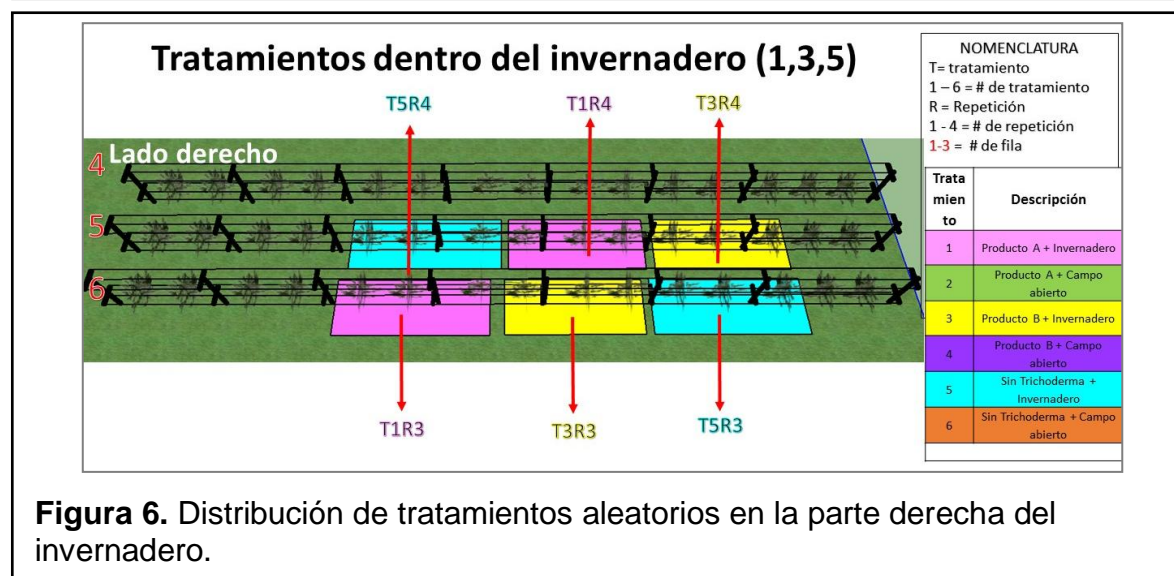
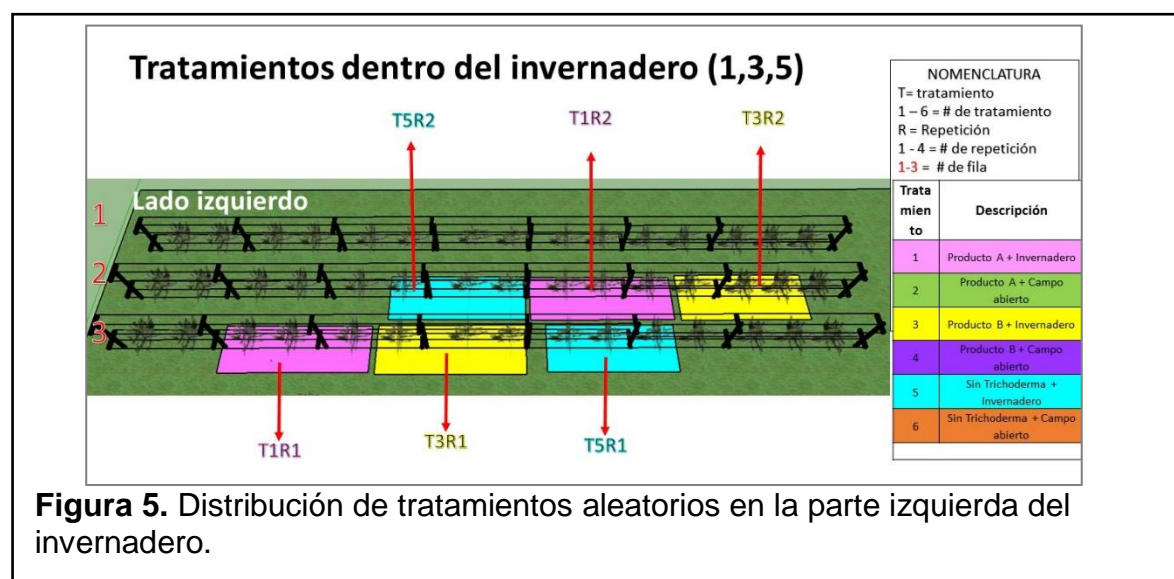
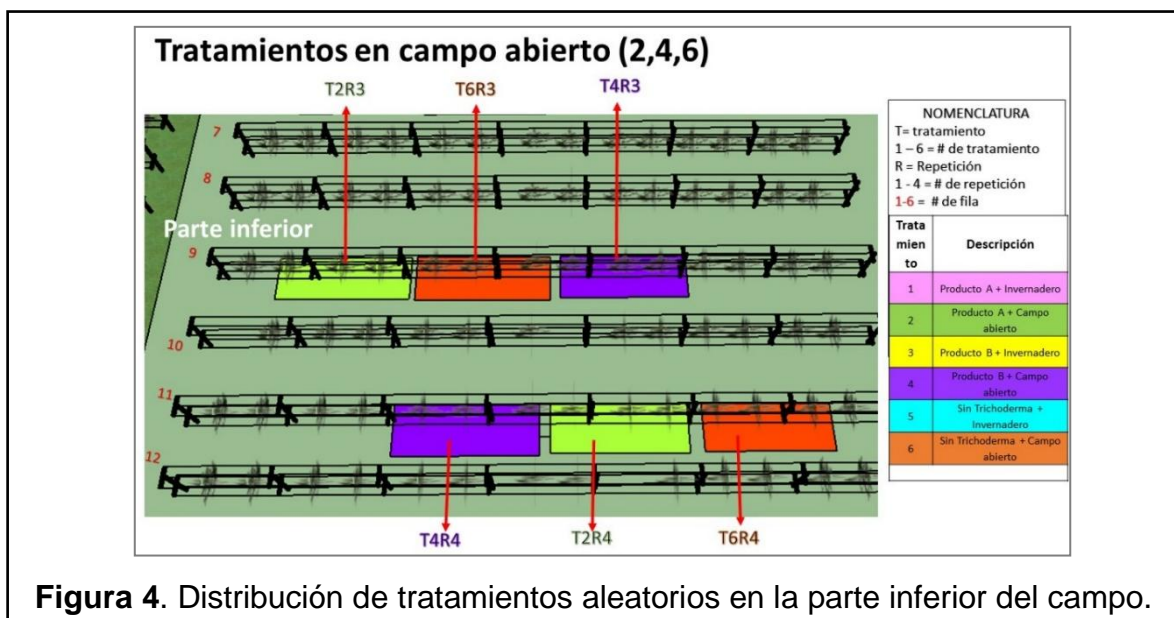


Figura 2. Distribución total de plantas de mora en la finca experimental de la granja experimental en Nono





Anexo 4. Protocolos

4.1 Protocolos de fase de laboratorio

4.1.1. Prospección de *Trichoderma* proveniente de los dos ambientes.

1. A cada muestra se debe romper terrones, retirar especímenes de insectos, piedras y materiales extraños.
2. Homogeneizar la muestra
3. Medir 20 cm³ de suelo en un frasco esterilizado y limpio. Registrar peso.
4. Agregar 180 ml de solución de agua salinizada con Silwet al 0,015% al frasco, registrar peso. Colocar el suelo y agitar para mezclar.
5. Colocar en el incubador orbital por aproximadamente 30 minutos a 130 rpm a temperatura ambiente. Si el incubador orbital no puede girar mejor usar un agitador.
6. En la cámara de flujo laminar, poner los tubos que contienen 9 ml de la solución con Silwet L77 al 0.015%. Pipetear 1 ml de la solución del suelo del frasco usando un tip nuevo y esterilizado. Agitar para mezclar. Este tubo es la dilución 10-2. Nota: la solución en el frasco es 10-1.
7. Preparar el medio de cultivo selectivo para cada género de hongo a evaluarse; en el caso de *Trichoderma* utilizar PDA + 3 ml de Silwet L77/ litro de medio de cultivo + 1 gramo del producto Captan
8. Rotular las cajas con medio + antibiótico, tres por dilución. Usando un tip esterilizado, transferir 100 µl desde la dilución 10-2 a cada caja. Asperjar con un asa de drisalky esterilizada. Repetir para la solución del frasco 10-1.
9. Incubar las cajas invertidas a entre 21 a 24°C por 7 – 10 días.
10. Contar las colonias y calcular con referencia a SOP INIAP – 1.
11. Registrar datos.

4.1.2 Análisis de calidad del producto biológico comercial Trichoeb® y Trikofun®

4.1.2.1 Concentración del microorganismo expresado en esporas/gramo del producto

Procedimiento:

1. Colocar 9ml de agua con Tritón al 0,001%.
2. Pegar 1 g de la formulación y colocar en un tubo de ensayo.
3. Dejar reposar la muestra por 1 minuto.
4. Agitar en el vortex a velocidad máxima por 1 minuto.
5. Colocar 300 ul de agua destilada en el vaso de precipitación y transferir la mezcla.
6. Agitar la mezcla del vaso de precipitación por 1 minuto.
7. Transferir una alícuota de 20µl a uno de los lados de la cámara de Neubauer y dejar que se llene por acción capilar. Repetir este procedimiento en el lado opuesto de la cámara. Dejar reposar la muestra por 1 minuto.
8. Observar en el microscopio con lente 40x y contar esporas.
9. Realizar el conteo de esporas en los 5 cuadrantes de cada placa. Realizar 20 observaciones.
10. Calcular la concentración de la mezcla con los valores que se ajustan a la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\# \text{ total de esporas en 20 celdas}}{20} \times \text{Factor de Neubauer} \times \text{Factor de dilución}$$

Ecuación 1. Concentración del microorganismo.

4.1.2.2 Viabilidad del microorganismo expresado en UFC/gramo del producto

Procedimiento:

1. Pesar 1 g de la formulación.
2. Agregar 9ml de agua esterilizada a la muestra.
3. Agitar el Vortex por 1 minuto.
4. Realizar diluciones y siembras de 10^{-4} a 10^{-9} dentro de la cámara de flujo laminar.
5. Transferir 100 ul de cada tubo de dilución a cajas Petri. Con dos repeticiones.
6. Incubar a 24°C por 5 días.
7. Contar las colonias en caja con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{g} = \# \text{ de colonias en caja Petri} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Factor de ajuste}$$

Ecuación 2. Viabilidad del microorganismo

8. Registrar datos.

4.1.2.3 Pureza del producto expresado en porcentaje (%)

Procedimiento:

1. Contabilizar el número de colonias de contaminantes existentes en cada una de las Caja Petri sembradas.
2. Calcular en relación al número de colonias del hongo benéfico, el porcentaje de contaminación.
3. Registrar el dato expresado en porcentaje (%).

4.1.2.4 Actividad de agua del producto (A_w)

Procedimiento:

1. Encender el medidor de actividad de agua 2 minutos antes de utilizar el equipo.
2. Desinfectar y secar los recipientes antes de ser utilizados.

3. Colocar la muestra en el recipiente cubriendo la superficie (capa delgada).
4. Cerrar la cámara y permitir que la muestra se estabilice en el medidor de actividad de agua.
5. Registrar el valor que aparece en el visor.
6. Abrir cámara de lectura, desechar la muestra evaluada y desinfectar el recipiente receptor.

4.1.3 Definición de dosis de aplicación del producto biológico analizado.

Se realizó el siguiente cálculo para calcular la cantidad de producto a aplicar por planta:

$$\frac{(\text{Espacio de la planta (cm}^3) \times \text{dosis teórica a aplicar (UFC)}}{\text{Concentración del producto}} = \text{gramos a aplicar}$$

Ecuación 3. Gramos de producto a ser aplicados

Trichoeb®:

En base a la ecuación 3.

$$\text{gramos a aplicar (Trichoeb)} = \frac{27000^* \times 10000^{**}}{3,71 \times 10^8}$$

$$\text{gramos a aplicar (Trichoeb)} = 0,73 \text{ g/planta}$$

*Cantidad de suelo en los primeros 30 cm de suelo de cada planta (30cmx30cmx30cm) = 27000 cm³, asumiendo que 1 gramo de suelo ocupa 1 cm³ de volumen.

** Aplicación teórica de producto = 10⁴ = 10000

Trikofun®:

En base a la ecuación 3.

$$\text{gramos a aplicar (Trikofun)} = \frac{27000 * x \ 10000^{**}}{1,40 \times 10^9}$$

$$\text{gramos a aplicar (Trikofun)} = 0,19 \text{ g/planta}$$

*Cantidad de suelo en los primeros 30 cm de suelo de cada planta (30cmx30cmx30cm) = 27000 cm³, asumiendo que 1 gramo de suelo ocupa 1 cm³ de volumen.







** Aplicación teórica de producto = 10⁴ = 10000

4.1.4 Evaluación de sobrevivencia y establecimiento del hongo***Trichoderma spp***

1. A cada muestra se debe romper terrones, retirar especímenes de insectos, piedras y materiales extraños.
2. Homogeneizar bien la muestra.
3. Medir 20 cm³ de suelo en un frasco esterilizado y limpio. Registrar peso.
4. Agregar 180 ml de solución de agua salinizada con Silwet al 0,015% al frasco, registrar peso. Colocar el suelo y agitar para mezclar.
5. Colocar en el incubador orbital por aproximadamente 30 minutos a 130 rpm a temperatura ambiente. Si el incubador orbital no puede girar mejor usar un agitador.
6. En la cámara de flujo laminar, poner los tubos que contienen 9 ml de la solución con Silwet L77 al 0.015%. Pipetear 1 ml de la solución del suelo del frasco usando un tip nuevo y esterilizado. Agitar para mezclar. Este tubo es la dilución 10-2. Nota: la solución en el frasco es 10-1.
7. Preparar el medio de cultivo selectivo para cada género de hongo a evaluarse; en el caso de *Trichoderma* utilizar PDA + 3 ml de Silwet L77/ litro de medio de cultivo + 1 gramo del producto Captan.

8. Rotular las cajas con medio + antibiótico, tres por dilución. Usando un tip esterilizado, transferir 100 μ l desde la dilución 10⁻² a cada caja. Asperjar con un asa de drisalky esterilizada. Repetir para la solución del frasco 10⁻¹.
9. Incubar las cajas invertidas a entre 21 a 24°C por 7 – 10 días.
10. Contar las colonias y calcular con referencia a SOP INIAP – 1.
11. Registrar datos.

Anexo 5. Escala de vigor

ESCALA	VIGOR	
<p data-bbox="357 510 544 577">1= 1-20%</p>	 <p data-bbox="759 421 995 483">Muy Débil</p>	
<p data-bbox="341 801 592 869">2= 21-40%</p>	<p data-bbox="759 725 919 792">Débil</p>	
<p data-bbox="336 1039 592 1106">3= 41-60%</p>	<p data-bbox="687 978 995 1046">Levemente</p>	
<p data-bbox="341 1359 539 1426">4= 61-80%</p>	<p data-bbox="687 1299 919 1366">Vigorosa</p>	
<p data-bbox="341 1659 544 1727">5= 81-99%</p>	<p data-bbox="687 1688 970 1756">Muy Vigorosa</p>	

Fuente: Instituto Nacional Autónomo De Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Estación Experimental SANTA CATALINA. Programa nacional de fruticultura

Anexo 6. Manejo agronómico del cultivo de mora

Tabla 19. Manejo agronómico del cultivo de mora (Tratamientos, actividades y fertilización)

Fecha	I	C	Tratamiento/ actividad	I	C	Fertilización	Observaciones
29/01/2016	x		Fumigación contra ácaros. Megan 240/tanque				Foliar
02/02/2016			Regulex 20g/tanque para lancha				Foliar
09/02/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
09/02/2016		x	Jabón 400cc/tanque para ácaros, cistal 40/tanque, regulex 20/tanque				Foliar
10/02/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
11/02/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
12/02/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
16/02/2016						Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
17/02/2016						Nitrato de calcio	Fertirriego
18/02/2016						Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
10/09/2016						Nitrato de calcio	Fertirriego

23/02/2016		x	Atalón 700/tanque, Mancoceb 700/tanque, biocime 100/tanque				Foliar
23/02/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
24/02/2016				x	X	Nitrato de calcio	Fertirriego
25/02/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
26/02/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
01/03/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
02/03/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
04/03/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
07/03/2016	x		Ciper 300cc/tanque para mosca blanca				Foliar
07/03/2016		x	Atalón 700cc/100 l, 20 regulex				Foliar
08/03/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
08/03/2016		x	Kfol 400cc/200 L				Foliar
15/03/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
16/03/2016				x	X	Nitrato de calcio	Fertirriego
17/03/2016				X	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
18/03/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego

18/03/2016		x	Atalón 700/tanque, biocime 100/tanque				Foliar
22/03/2016	x		Jabón 400cc/tanque contra ácaros. Fungidor 700g/tanque				Foliar
22/03/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
23/03/2016	x	x	Trampa para insectos				Foliar
24/03/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
28/03/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de calcio	Fertirriego
30/03/2016						Nitrato de calcio	Fertirriego
31/03/2016				X	x	Fosfato monopotásico, nitrato de calcio	Fertirriego
01/04/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
05/04/2016				X	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
06/04/2016				x		Nitrato de calcio	Fertirriego
07/04/2016				X	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
08/04/2016				x		Nitrato de calcio	Fertirriego
24/04/2016	x		Detergente 400cc/tanque				Foliar
24/04/2016		x	Thiofanato 100g/200 l				Foliar

26/04/2016		x	Patrón para lancha				Foliar
26/04/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
27/04/2016				x	X	Nitrato de calcio	Fertirriego
28/04/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
29/04/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
03/05/2016		x	Trisiman 400/tanque para lancha				Foliar
03/05/2016	x		Milbeknock para ácaros				Foliar
03/05/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
04/05/2016				x	X	Nitrato de calcio	Fertirriego
05/05/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
06/05/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
10/05/2016		x	Curso para 200g/200 l botritis				Foliar
10/05/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
11/05/2016				X	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
12/05/2016				x	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
13/05/2016				X	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
17/05/2016				X	X	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio	Fertirriego
18/05/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato	Fertirriego

						de potasio, nitrato de calcio	
20/05/2016				x	x	nitrato de calcio	Fertirriego
20/05/2016	x		Biosolar 100/tanque				Foliar
20/05/2016		x	Nitrofosfatasa				Foliar
24/05/2016		x	Trsisiman 400/100 L para lancha, Fungidor para mildiu velloso				Foliar
31/05/2016		x	Curso 200g/200 l para botritis				Foliar
31/05/2016	x		Biosolar 200g				Foliar
07/06/2016		x	Curso 200g Poliquel 200cc Ecuafix	x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio, nitrato de potasio	Fertirriego
07/06/2016	x		Lavado con ajo y aji 100g,				Foliar
08/06/201				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
09/06/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio, nitrato de potasio	Fertirriego
10/06/201				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
14/06/2016	x		Curso 200g + ecuafix				Foliar
14/06/2016		x	Comfidor insecticida 200cc + poliquel + ecuafix 100 g				Foliar
14/06/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio, nitrato de potasio	Fertirriego

15/06/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
16/06/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio, nitrato de potasio	Fertirriego
17/06/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
21/06/2016		x	Trisiman 400g + bioclim 250g + ecuafix 100g				Foliar
		x	Lavado detergente 200cc				Foliar
21/06/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio, nitrato de potasio	Fertirriego
22/06/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego
23/06/2016				x	x	Fosfato monopotásico, nitrato de potasio, nitrato de potasio	Fertirriego
24/06/2016				x	x	Nitrato de calcio	Fertirriego

Tabla 20. Manejo agronómico (riego, poda, control de arvenses, cosecha)

Actividad	Frecuencia
Riego	Diario mediante fertirriego, 15 min.
Poda	Cada 15-25 días
Control de Arvenses	Cada 15-25 días
Cosecha	Semanal

Nota: tomado de la Granja experimental UDLA.

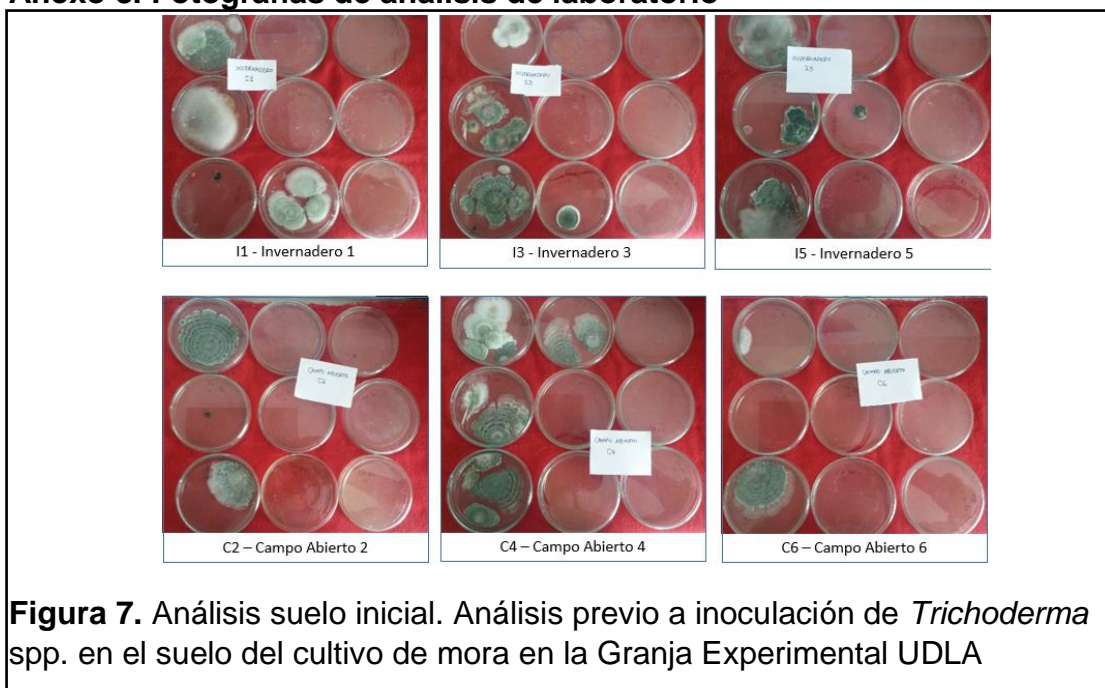
Anexo 7. Composición nutricional mora de castilla

Tabla 21. Composición nutricional de la mora de castilla en 100g.

Factor nutricional	Cantidad	Unidad
Calorías	57	kcal
Sólidos solubles	15,20	g
Ácido cítrico	0,68 - 1,84	g
Ácido ascórbico	15 - 20	mg
Agua	92,8	g
Calcio	42	mg
Carbohidratos	5,6	g
Cenizas	0,4	g
Fibra	4,2	g
Fósforo	23,90	mg
Grasa	0,1	g
Hierro	1,7	mg
Sodio	3,70	mg
Magnesio	29,50	mg
Azufre	17	mg
Niacina	0,3	mg
Proteínas	0,6	g
Riboflavina	0,05	mg
Tiamina	0,02 – 0,03	mg
Vitamina A	177,90	UI
Vitamina E	13,3	mg
Caroteno	0,1 – 0,58	mg

Nota: Tomado de: (Martínez, *et al.*, 2007; Montalvo, 2010)

Anexo 8. Fotografías de análisis de laboratorio



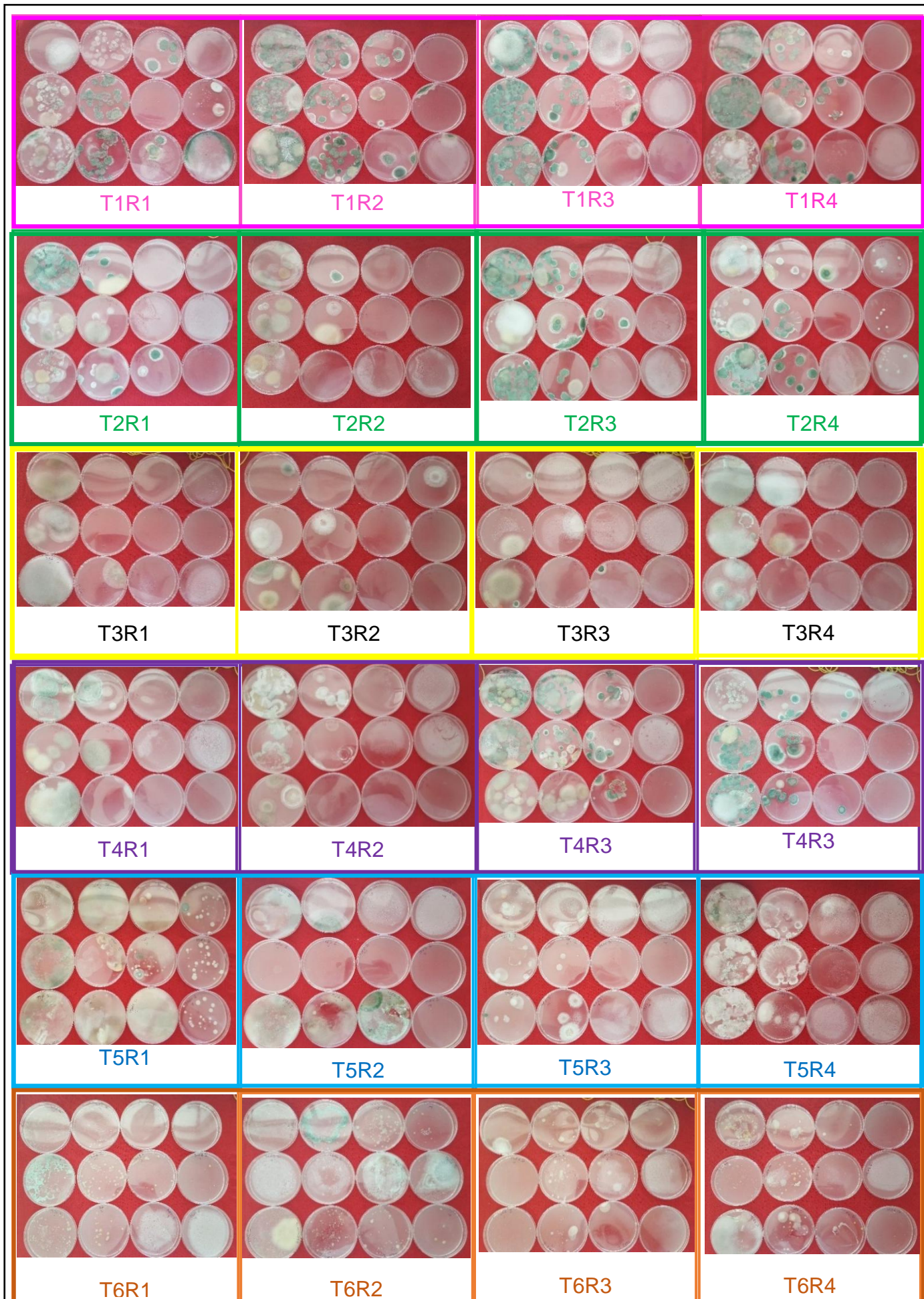


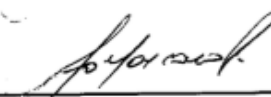



Figura 8. Análisis suelo 4. Análisis de suelo al cuarto mes de la primera inoculación en el suelo del cultivo de mora en la Granja Experimental UDLA.

Anexo 9. Resultados de evaluación de análisis de suelo

 INIAP INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS	ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA" LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340 Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693																																																																												
REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS																																																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="4" style="text-align: center;">DATOS DEL PROPIETARIO</th> </tr> <tr> <td>Nombre :</td> <td colspan="3">UDLA</td> </tr> <tr> <td>Dirección :</td> <td colspan="3">QUITO</td> </tr> <tr> <td>Ciudad :</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>Teléfono :</td> <td colspan="3"></td> </tr> <tr> <td>Fax :</td> <td colspan="3"></td> </tr> </table>	DATOS DEL PROPIETARIO				Nombre :	UDLA			Dirección :	QUITO			Ciudad :				Teléfono :				Fax :				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="4" style="text-align: center;">DATOS DE LA PROPIEDAD</th> </tr> <tr> <td>Nombre :</td> <td colspan="3">FINCA EXP. UDLA</td> </tr> <tr> <td>Provincia :</td> <td colspan="3">PICHINCHA</td> </tr> <tr> <td>Cantón :</td> <td colspan="3">QUITO</td> </tr> <tr> <td>Parroquia :</td> <td colspan="3">NONO</td> </tr> <tr> <td>Ubicación :</td> <td colspan="3"></td> </tr> </table>	DATOS DE LA PROPIEDAD				Nombre :	FINCA EXP. UDLA			Provincia :	PICHINCHA			Cantón :	QUITO			Parroquia :	NONO			Ubicación :				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">PARA USO DEL LABORATORIO</th> </tr> <tr> <td>Cultivo Actual :</td> <td>MORA</td> </tr> <tr> <td>Fecha de Muestreo :</td> <td>25/01/2016</td> </tr> <tr> <td>Fecha de Ingreso :</td> <td>26/01/2016</td> </tr> <tr> <td>Fecha de Salida :</td> <td>05/02/2016</td> </tr> </table>	PARA USO DEL LABORATORIO		Cultivo Actual :	MORA	Fecha de Muestreo :	25/01/2016	Fecha de Ingreso :	26/01/2016	Fecha de Salida :	05/02/2016																	
DATOS DEL PROPIETARIO																																																																													
Nombre :	UDLA																																																																												
Dirección :	QUITO																																																																												
Ciudad :																																																																													
Teléfono :																																																																													
Fax :																																																																													
DATOS DE LA PROPIEDAD																																																																													
Nombre :	FINCA EXP. UDLA																																																																												
Provincia :	PICHINCHA																																																																												
Cantón :	QUITO																																																																												
Parroquia :	NONO																																																																												
Ubicación :																																																																													
PARA USO DEL LABORATORIO																																																																													
Cultivo Actual :	MORA																																																																												
Fecha de Muestreo :	25/01/2016																																																																												
Fecha de Ingreso :	26/01/2016																																																																												
Fecha de Salida :	05/02/2016																																																																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="width: 8%;">Nº Muestr.</th> <th colspan="3" style="width: 15%;">meq/100ml</th> <th style="width: 8%;">dS/m</th> <th style="width: 8%;">(%)</th> <th style="width: 8%;">Ca</th> <th style="width: 8%;">Mg</th> <th style="width: 8%;">Ca+Mg</th> <th style="width: 8%;">meq/100ml</th> <th style="width: 8%;">%</th> <th style="width: 8%;">ppm</th> <th colspan="3" style="width: 15%;">Textura (%)</th> <th rowspan="2" style="width: 10%;">Clase Textural</th> </tr> <tr> <th style="width: 8%;">Laborat.</th> <th style="width: 5%;">Al+H</th> <th style="width: 5%;">Al</th> <th style="width: 5%;">Na</th> <th style="width: 8%;">C.E.</th> <th style="width: 8%;">M.O.</th> <th style="width: 8%;">Mg</th> <th style="width: 8%;">K</th> <th style="width: 8%;">K</th> <th style="width: 8%;">Σ Bases</th> <th style="width: 8%;">NTot</th> <th style="width: 8%;">Cl</th> <th style="width: 5%;">Arena</th> <th style="width: 5%;">Limo</th> <th style="width: 5%;">Arcilla</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: left;">Campo C2+C4+C6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>5,40</td> <td>A</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: left;">Campo I1+I3+I5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>4,60</td> <td>M</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>													Nº Muestr.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural	Laborat.	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	Campo C2+C4+C6						5,40	A										Campo I1+I3+I5						4,60	M									
Nº Muestr.	meq/100ml			dS/m	(%)	Ca	Mg	Ca+Mg	meq/100ml	%	ppm	Textura (%)			Clase Textural																																																														
	Laborat.	Al+H	Al	Na	C.E.	M.O.	Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo		Arcilla																																																													
Campo C2+C4+C6						5,40	A																																																																						
Campo I1+I3+I5						4,60	M																																																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="4" style="text-align: center;">INTERPRETACION</th> </tr> <tr> <th style="width: 25%;">Al+H, Al y Na</th> <th colspan="2" style="width: 25%;">C.E.</th> <th style="width: 25%;">M.O. y Cl</th> </tr> <tr> <td>B = Bajo</td> <td>NS = No Salino</td> <td>S = Salino</td> <td>B = Bajo</td> </tr> <tr> <td>M = Medio</td> <td>LS = Lig. Salino</td> <td>MS = Muy Salino</td> <td>M = Medio</td> </tr> <tr> <td>T = Tóxico</td> <td></td> <td></td> <td>A = Alto</td> </tr> </table>				INTERPRETACION				Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl	B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo	M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio	T = Tóxico			A = Alto	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">ABREVIATURAS</th> </tr> <tr> <td>C.E.</td> <td>= Conductividad Eléctrica</td> </tr> <tr> <td>M.O.</td> <td>= Materia Orgánica</td> </tr> <tr> <td>RAS</td> <td>= Relación de Adsorción de Sodio</td> </tr> </table>				ABREVIATURAS		C.E.	= Conductividad Eléctrica	M.O.	= Materia Orgánica	RAS	= Relación de Adsorción de Sodio	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">METODOLOGIA USADA</th> </tr> <tr> <td>C.E.</td> <td>= Pasta Saturada</td> </tr> <tr> <td>M.O.</td> <td>= Dicromato de Potasio</td> </tr> <tr> <td>Al+H</td> <td>= Titulación NaOH</td> </tr> </table>				METODOLOGIA USADA		C.E.	= Pasta Saturada	M.O.	= Dicromato de Potasio	Al+H	= Titulación NaOH																														
INTERPRETACION																																																																													
Al+H, Al y Na	C.E.		M.O. y Cl																																																																										
B = Bajo	NS = No Salino	S = Salino	B = Bajo																																																																										
M = Medio	LS = Lig. Salino	MS = Muy Salino	M = Medio																																																																										
T = Tóxico			A = Alto																																																																										
ABREVIATURAS																																																																													
C.E.	= Conductividad Eléctrica																																																																												
M.O.	= Materia Orgánica																																																																												
RAS	= Relación de Adsorción de Sodio																																																																												
METODOLOGIA USADA																																																																													
C.E.	= Pasta Saturada																																																																												
M.O.	= Dicromato de Potasio																																																																												
Al+H	= Titulación NaOH																																																																												
 RESPONSABLE LABORATORIO				 LABORATORISTA																																																																									

Anexo 10. Población de *Trichoderma* en los 5 análisis de suelo

Tabla 22. Población de *Trichoderma* spp. en los análisis de suelo a los 0,30,60,90 y 120 días de estudio.

	Análisis de suelo				
	0	1	2	3	4
	0 d	30 d	60 d	90 d	120 d
T1R1	2,00E+02	3,00E+02	4,33E+03	1,37E+04	1,67E+04
T1R2	2,00E+02	1,27E+04	4,87E+03	3,00E+04	2,67E+04
T1R3	2,00E+02	1,53E+04	3,17E+03	2,43E+03	1,07E+04
T1R4	2,00E+02	1,60E+04	4,83E+03	1,90E+04	1,70E+04
T2R1	1,00E+02	8,00E+03	2,70E+03	1,57E+04	1,57E+03
T2R2	1,00E+02	2,57E+03	3,50E+03	1,03E+05	3,67E+02
T2R3	1,00E+02	3,00E+03	4,93E+03	2,03E+05	1,20E+04
T2R4	1,00E+02	0,00E+00	6,20E+03	2,37E+05	5,00E+03
T3R1	4,67E+02	5,67E+02	1,33E+02	6,33E+03	3,67E+02
T3R2	4,67E+02	5,00E+02	6,00E+02	5,33E+02	0,00E+00
T3R3	4,67E+02	2,67E+02	4,33E+02	1,00E+03	2,00E+02
T3R4	4,67E+02	1,67E+02	3,67E+02	1,20E+04	5,00E+02
T4R1	4,67E+02	4,00E+02	4,33E+02	1,00E+03	5,33E+02
T4R2	4,67E+02	1,00E+02	5,33E+02	5,33E+02	2,67E+02
T4R3	4,67E+02	0,00E+00	5,33E+02	1,93E+03	1,90E+04
T4R4	4,67E+02	0,00E+00	6,67E+02	2,07E+03	8,00E+03
T5R1	5,67E+02	1,67E+02	3,33E+02	7,00E+02	3,33E+02
T5R2	5,67E+02	3,67E+02	4,00E+02	6,67E+01	0,00E+00
T5R3	5,67E+02	3,67E+02	6,67E+01	3,33E+02	0,00E+00
T5R4	5,67E+02	4,33E+02	2,33E+02	2,00E+02	0,00E+00
T6R1	6,67E+01	2,00E+02	1,67E+02	3,33E+02	0,00E+00
T6R2	6,67E+01	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+02	0,00E+00
T6R3	6,67E+01	0,00E+00	3,00E+02	6,33E+02	0,00E+00
T6R4	6,67E+01	0,00E+00	3,33E+02	1,00E+03	0,00E+00