



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE *Trichoderma* spp. COMO BIOFERTILIZANTE Y
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE *Verticillium albo-atrum* EN
CULTIVOS DE *Rubus glaucus*

AUTOR

Manoella Alejandra Sánchez Garnica

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE *Trichoderma* spp. COMO BIOFERTILIZANTE Y
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE *Verticillium albo-atrum* EN
CULTIVOS DE *Rubus glaucus*

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

M.Sc. Carlos Andrés Bastidas Caldés

Autora

Manoella Alejandra Sánchez Garnica

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, 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

Carlos Andrés Bastidas Caldés
Master en Microbiología Ambiental
C.C: 0201619806

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaramos haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

Laura Guerrero Latorre
Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología
Pasaporte: PAB482851

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Pedro Sebastián Lara Galarza
Microbiólogo
C.C: 1803941374

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.

Manoella Alejandra Sánchez Garnica

C.C: 0604079871

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento a la Dirección Provincial Agropecuaria de Tungurahua y a la Corporación de Organizaciones Agroproductivas del cantón Ambato, por abrirme las puertas del Laboratorio y poder llevar a cabo este proyecto. Gracias Inge Pedro, por las enseñanzas y el tiempo que dedicó en este trabajo. Por sus consejos que me han ayudado a mejorar como persona y como profesional. Profe Andrés, gracias por ser mi tutor y por ayudarme a pulir este trabajo. A mis amigos: Danny M., Pris M., Gis L., Nathy E., Jorge A., Freddy N. y Vale C. por haber hecho de la vida universitaria, la mejor de todas. Mil gracias por todo. Kathy P., Lin O., Alfon N. e Itza L. amigas más gracias por su amistad de tantos años y por siempre confiar en mí.

DEDICATORIA

"Desde el interior, nace una fuerza que traduce los inicios de mi mente soñadora"

Papá, Mamá, Belén y Victoria. Son sin duda mi mayor motivación. Nadie es más fan mío, que ustedes.

RESUMEN

La agricultura es una actividad, que en el Ecuador, representa los mayores ingresos económicos luego de la actividad petrolera. La mora (*Rubus glaucus*) tiene su mayor producción en la provincia de Tungurahua. Al ser un fruto blando, es susceptible a patógenos capaces de afectar fuertemente la producción. *Verticillium* spp, es un hongo patógeno con más de 200 especies vegetales como huéspedes. Actualmente, los cultivos de mora de la provincia de Tungurahua están siendo afectados por *Verticillium* spp. Los agentes de biocontrol han sido utilizados masivamente para contrarrestar efectos de patógenos. Son conocidas ampliamente las capacidades del hongo *Trichoderma* spp para tratar enfermedades causadas por hongos, además de su efecto fertilizante. Sus mecanismos de acción son producción de metabolitos, micoparasitismo y competencia de nutrientes y espacio, desplazando al hongo patógeno. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *Trichoderma* para tratar la infección causada por *Verticillium* spp en los cultivos de mora. Se desarrolló una solución a base de *Trichoderma* spp a diferentes concentraciones (1.98×10^9 conidios/ml, 1.32×10^9 conidios/ml y 2.6×10^6 conidios/ml) para evaluar sus efectos como antagonista de *Verticillium* y como fertilizante. Se evaluó la capacidad fertilizante de *Trichoderma* spp, mediante el análisis de nutrientes del suelo y el contenido de nutrientes en las hojas de las plantas infectadas, antes y después de los tratamientos. Se evidenció el incremento de los nutrientes, principalmente en la aplicación de la dosis de concentración 1.98×10^9 conidios/ml a un volumen de 15ml, encontrando incrementos entre 25% - 466%. Además, para analizar su capacidad antagonista versus *Verticillium* se realizaron pruebas *in vitro* que corroboraron los 3 mecanismos de acción de *Trichoderma* spp, resultando: 1) con la prueba de competición por nutrientes y espacio porcentajes de inhibición de crecimiento de *Verticillium* spp entre 45.5% - 55.7%; 2) la prueba de producción de metabolitos manifestó porcentajes de inhibición de crecimiento de *Verticillium* spp entre 28%- 70% y 3) mediante microscopia se evidenció como *Trichoderma* spp

parasita a *Verticillium* spp al introducir sus hifas en las de *Verticillium* spp. Estos resultados demuestran que el producto desarrollado controla la enfermedad en las plantas y al patógeno *in vitro*, además se evidencia su potencial aplicación para realizar una fertilización óptima.

Palabras clave: *Trichoderma* spp, *Verticillium* spp, biocontrol, incremento de nutrientes, concentración foliar de nutrientes.

ABSTRACT

Agriculture is an activity that in Ecuador represents the greater economical income after oil activity. Blackberry (*Rubus glaucus*) has its greater production in the province of Tungurahua. Being a soft fruit, it is susceptible to pathogens capable of strongly affect its quality and production. *Verticillium* spp is a pathogen fungus that has more than 200 vegetable species as guests, and its infection is lethal for the plant since it occurs from the vascular bundles. Nowadays, the blackberry crops from Tungurahua province are being affected by *Verticillium* spp. The capacities of the *Trichoderma* spp fungus are widely known to treat diseases caused by fungus as well as its fertilizing effect. Its action mechanisms are the production of metabolites, mycoparasitism, and competition for nutrients and space, displacing the pathogen fungus. In the present work, the capacity of *Trichoderma* spp to treat the infection caused by *Verticillium* spp in blackberry crops was evaluated. A solution based on *Trichoderma* spp in different concentrations (1.98×10^9 conidium/ml, 1.32×10^9 conidium /ml y 2.6×10^6 conidium /ml) was developed to evaluate its effects as an antagonist of *Verticillium* spp and as a fertilizer. The fertilizer capacity of the *Trichoderma* spp was evaluated by means of nutrient analysis in the soil and nutrient content in the leaves of the infected plants before and after the treatments. The nutrient increase was evidenced, mainly in the application of the dose with a concentration of 1.98×10^9 conidium/ml at a volume of 15 ml, finding increases between 25% - 466%. Also, to analyze its antagonist capacity versus *Verticillium*, *in vitro* tests were carried out that corroborated the three mechanisms of action of the *Trichoderma* spp, resulting: 1) with the test of nutrient and space competition, percentages of grow inhibition of *Verticillium* spp between 45.5% - 55.7%; 2) the metabolite production test manifested percentages of grow inhibition of *Verticillium* spp between 28% - 70%; and 3) by means of microscopy it was evidenced how *Trichoderma* spp parasites *Verticillium* spp introducing its hyphae in the ones of *Verticillium* spp. These results demonstrated

that the developed product controlled the disease in the plants and the pathogen *in vitro*; in addition, its potential application for optimum fertilization was evidenced.

Key words: *Trichoderma* spp, *Verticillium* spp, biocontrol, nutrient increase, foliar concentration of nutrients.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivos de la investigación.....	5
1.4 Justificación	6
2. Capítulo II. Marco teórico	7
2.1 Mora (<i>Rubus glaucus</i>).....	7
2.1.1 Características morfológicas.....	7
2.1.2 Requerimientos para el cultivo de mora	8
2.1.2.1 Requerimientos nutricionales	8
2.1.2.2 Requerimientos climatológicos.....	8
2.1.3 Tipo de suelo	9
2.1.4 Siembra	9
2.1.5 Cosecha	9
2.1.6 Principales afectaciones	9
2.2 Microorganismos del suelo.....	11
2.2.1 Hongos	11
2.2.1.1 Clasificación	11
2.2.1.2 Hongos benéficos.....	12
2.2.1.2.1 <i>Trichoderma</i> spp	13
2.2.1.2.2 Taxonomía.....	13
2.2.1.2.3 Morfología.....	14
2.2.1.3 Hongos patógenos	14
2.2.1.3.1 <i>Verticillium</i> spp.....	14
2.2.1.3.1.1 Taxonomía	15
2.2.1.3.1.2 Morfología	15

2.2.1.3.1.3 Mecanismos de infección	15
2.3 Control biológico	16
2.3.1 Mecanismos de control biológico.....	16
3. Capitulo III. Materiales y métodos.....	19
3.1 Diagrama de flujo de la metodología.....	19
3.2 Diseño del plan experimental.....	20
3.3 Determinación de la población y muestra	20
3.4 Descripción de la metodología	21
3.4.1 Obtención del bioinsumo a base de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
3.4.1.1 Cultivo de <i>Trichoderma</i> spp en arroz	21
3.4.1.2 Cosecha de <i>Trichoderma</i> spp	23
3.4.1.3 Definir concentración de bioinsumo a evaluar.....	24
3.4.2 Evaluación del bioinsumo como biofertilizante	24
3.4.2.1 Selección del cultivo y toma de muestras.....	24
3.4.2.2 Aplicación de bioinsumo en cultivos de mora.....	25
3.4.3 Evaluación de bioinsumo como agente antagonista en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Verticillium</i> spp.....	26
3.4.3.1 Pruebas <i>in vitro</i>	26
3.4.3.2 Aislamiento y purificación de <i>Verticillium</i> spp.....	27
3.4.3.3 Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp hacia <i>Verticillium</i>	27
3.4.3.4 Competencia de nutrientes y espacio	27
3.4.3.5 Producción de metabolitos volátiles por <i>Trichoderma</i> spp ...	28
4. Capitulo IV. Resultados y discusión.....	29
4.1 Bioinsumo	29
4.2 Análisis de suelo	29
4.3 Análisis de foliares.....	38
4.4 Condiciones físicas de las plantas objetivo	45
4.5 Antagonismo <i>in vitro</i>	49

4.5.1 Micoparasitismo.....	49
4.5.2 Competencia por nutrientes y espacio.....	51
4.5.3 Producción de metabolitos volátiles por <i>Trichoderma</i> spp.....	54
5. Conclusiones y Recomendaciones	56
5.1 Conclusiones.....	56
5.2 Recomendaciones	57
Referencias	58
Anexos.....	63

Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes.

El uso excesivo de pesticidas químicos ha incrementado los desechos y las emisiones tóxicas al ambiente, generando así contaminación y daños en organismos incluyendo a los humanos (Kakvan, Heydari, Zamanizadeh, & Rezaee, 2013, p. 81). La sustitución de pesticidas por alternativas amigables con el medio ambiente ha constituido la mayor búsqueda de los últimos años en el campo agrícola. La capacidad de ciertos microorganismos de controlar biológicamente microorganismos patógenos ha resultado la alternativa más exitosa. (Ke-wei, 2010, p. 92)

En los últimos 50 años, se han reportado varias especies que presentan la capacidad antagonista y el control de enfermedades. Los principales descritos son hongos y bacterias controladores de otros hongos, como *Pseudomonas fluorescens* contra *Pythium ultimum*, *Bacillus subtilis* contra *Aspergillus niger*, *B. amyloliquefaciens* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma virens* contra *Fusarium oxysporum*, *Burkholderia cepacia* contra *Fusarium solani*, *Gliocadium sp* contra *Botrytis cinerea* (Hasan, Gupta, Anand, & Chaturvedi, 2013, p. 38).

Las investigaciones acerca de control biológico se han centrado en las especies del género *Trichoderma*. La capacidad antagonista de *Trichoderma* fue inicialmente reconocida en el año de 1930 y conforme han pasado los años se ha ido evidenciando el control biológico de varias enfermedades. (C.R. Howell, 2013, p.4)

Las investigaciones llevadas a cabo hasta la actualidad han podido estudiar los mecanismos que emplea *Trichoderma* para realizar el control biológico. Existen tres procesos principales: el micoparasitismo, la producción de antibióticos y enzimas, y la competencia por nutrientes y espacio en la rizósfera. Se recomienda que se realice un consorcio de más de dos especies de *Trichoderma* con el objetivo de potencializar el efecto controlador (C.R. Howell, 2013, p.8). En adición a su efecto controlador de patógenos, se ha evidenciado la capacidad de fertilizar el suelo logrando incrementar los nutrientes presentes en él. (Molla, Haque, Haque, & Ilias, 2012, p. 2)

El reto de la ciencia acerca del control biológico es lograr una formulación que contenga diferentes especies de microorganismos con esta capacidad y poder determinar la dosis y concentración que actuaría exitosamente sobre patógenos específicos. En países como Iran se ha desarrollado una investigación acerca de formular un producto capaz de controlar *Rhizoctonia solani* a base de *Trichoderma*, obteniendo excelentes resultados. Los investigadores sugieren que las formulaciones se deben mantener en sustratos capaces de mantener al organismo viable, como residuos de arroz y/o azúcares (Kakvan, Heydari, Zamanizadeh, & Rezaee, 2013, p. 82)

El enfoque de este estudio está dirigido a cultivos de mora (*Rubus glaucus*); su principal mercado de exportación es Estados Unidos. Las familias ecuatorianas consumen aproximadamente 2 kg de mora a la semana, principalmente en la región de la costa (INEC, 2011). La provincia de Tungurahua representa el 1.27% de la superficie de labor agrícola del país, en esta provincia la mora es el principal cultivo (INEC, 20011). La mora es conocida por sus propiedades antioxidantes y por poseer compuestos químicos de interés científico y esto ha generado el incremento de su demanda comercial (Souza, y otros, 2014, p. 364)

La planta de mora es susceptible a patógenos, principalmente hongos. Actualmente, los cultivos de mora en la provincia de Tungurahua están enfrentando la presencia de *Verticillium* spp. Este hongo se caracteriza por deshidratar la planta hasta secarla por completo (Travis DeSavigny, 2000, p. 120)

Actualmente, en el mercado mundial existen soluciones a *Verticillium* spp de naturaleza química; que son los pesticidas sistémicos. Si bien, las investigaciones para encontrar alternativas amigables con el ambiente y solucionar los problemas fitosanitarios han incrementado, los productos no se han desarrollado. Específicamente, en Ecuador no se han llevado a cabo investigaciones para tratar la enfermedad causada por *Verticillium* spp. Por lo tanto, existe un campo de investigación amplio para lograr encontrar soluciones efectivas.

1.2 Planteamiento del problema.

La agricultura ha experimentado grandes cambios en la última década, la invención de nuevos compuestos químicos más potentes para los agentes patógenos y a su vez, nocivos para el ser humano, ha desencadenado la búsqueda de alternativas ecológicas emergentes que puedan competir con la industria química. Se han desarrollado técnicas amigables con el ambiente, sin embargo, siguen sin poder eliminar el principio químico. Es importante reducir el impacto ambiental de contaminantes, que desde su desarrollo han generado consecuencias realmente alarmantes. Entre los contaminantes más comunes están los pesticidas, elementos inorgánicos (metales pesados), sales acumuladas en el suelo y la lluvia ácida; esta última es una combinación de la humedad con los contaminantes atmosféricos primarios (SO_2 , NO y SO_3). Han afectado de manera directa al suelo y por ende a su biología. La agricultura es uno de los mayores contaminantes del suelo, ya que su desarrollo implica utilizar agentes como los antes nombrados; a su vez, la vegetación también se ve afectada (Crosara, 2012, p. 3)

Las plantaciones de mora (*Rubus glaucus*) son susceptibles a patógenos entre los cuales está *Verticillium* spp. Esta infección es de mucha importancia ya que las plantas no llegan a producir frutos y eso se traduce en pérdidas económicas para el agricultor. Es por eso que el presente proyecto busca determinar el volumen y concentración eficiente de una solución elaborada a base de *Trichoderma* spp; para así poder tratar esta enfermedad con un agente biológico capaz de mitigar el efecto de *Verticillium* spp. Por otra parte, la biodisponibilidad de los nutrientes en el suelo es un limitante para la producción de cualquier cultivo y a menudo es necesaria la aplicación de compuestos químicos, para poderlos liberar en el suelo. Se conoce que *Trichoderma* spp tiene capacidades fertilizantes y es por eso que se busca poder tratar dos problemas con un mismo microorganismo.

1.3 Objetivos de la investigación.

1.3.1 Objetivo general.

Evaluar a *Trichoderma* spp como mejorador de los nutrientes del suelo y su actividad antagonista frente a *Verticillium* spp en cultivos de *Rubus glaucus*.

1.3.2 Objetivos específicos.

Analizar la variación de los nutrientes del suelo pre y post aplicación de *Trichoderma* spp en campo a diferentes dosis y concentraciones.

Estimar el antagonismo entre *Trichoderma* spp y *Verticillium* spp mediante cultivo in vitro.

Establecer la concentración y dosis en campo de *Trichoderma* spp que genere mejor actividad antagonista frente *Verticillium* spp.

1.4 Justificación.

El término —biocontrol” engloba herramientas capaces de solucionar problemas de una manera ecológica y no invasiva. Las áreas de aplicación del biocontrol son mayoritariamente en entomología y fitopatología. En entomología, principalmente consiste en describir como existen insectos capaces de depredar agentes patógenos que están también vivos o a su vez, la disminución de plagas. Por su parte, la fitopatología al ser la ciencia que estudia las enfermedades vegetales, busca solucionarlas mediante el empleo de organismos que presenten dichas capacidades. A los organismos capaces de realizar esto se lo conoce como Agente de Biocontrol (BCA, por sus siglas en inglés). Existe también, la posibilidad de realizar biocontrol con sustancias extraídas de plantas o con fermentaciones microbianas; tratando siempre de reducir el uso de compuestos químicos. El uso de microorganismos en esta herramienta es muy favorable ya que enriquece la microbiota del suelo que se ve muy afectada (Pal & Gardener, 2006, p. 5).

Las especies del género *Trichoderma* son los BCA más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y destacando su efecto fertilizante en el suelo (C. R. Howell, 2002, p. 7). Por otro lado, la provincia de Tungurahua es la provincia que más produce mora en el país, por lo que es fundamental mantener una producción constante y sin afectaciones por patógenos; sin embargo, en la actualidad los agricultores han detectado que sus cultivos están siendo afectados por *Verticillium* spp. Muchas de las soluciones para combatir enfermedades vasculares de plantas son plaguicidas sistémicos. Es por eso que se busca un método ecológico a base del BCA *Trichoderma* spp para poder combatir a *Verticillium* spp, mejorar las condiciones del suelo y que la absorción de nutrientes sea más eficiente procurando la seguridad de los alimentos de consumo humano.

Capítulo 2. Marco teórico

2.1 Mora.

La mora es una fruta originaria de América del Sur, principalmente de la zona tropical alta (MAGAP, 2013). Sus centros de origen son Ecuador, Panamá, Colombia, Guatemala, Honduras (Lopez & Gómez, 2008, p. 10). Pertenece a la familia de las ROSÁCEAS y su nombre científico es *Rubus glaucus* (MAGAP, 2013, p. 5). El género *Rubus* es uno de los géneros con más diversidad genética, con más de 500 especies y 12 subgéneros, de los cuales solo cinco presentan frutos de interés (Lopez & Gómez, 2008, p. 11).

2.1.1 Características morfológicas.

La planta de mora es perenne, su tamaño es arbustivo y sus tallos son bienales. Las hojas son trifoliadas oval-lanceoladas con bordes aserrados, color verde en el haz y blanco en el envés. Sus ramas florecen en racimos terminales, de las cuales nacerán los frutos (Lopez & Gómez, 2008, p. 12). Las flores, de 2-2.5cm, son hermafroditas y se distribuyen en racimos, posee un cáliz persistente de cinco sépalos color verde, mientras que su corola posee cinco pétalos, y pueden ser de color blanco, lila o rojo (Lopez & Gómez, 2008, p. 14). Los frutos son cúmulos de drupas que contienen una semilla en su interior. Su color va del rojo al negro rojizo cuando maduran (Lopez & Gómez, 2008, p. 14). Su sabor es ácido-dulce y se cree que cada fruto contiene de cien a ciento veinte semillas (MAGAP, 2013, p. 5). La semilla presenta forma coniforme además de una superficie reticulada, su tamaño no es generalizado, todo dependerá de la tecnificación del cultivo. Presenta un endocarpio duro e impermeable por lo que su germinación es lenta (Lopez & Gómez, 2008, p. 13). La raíz es fasciculada. En los 30 primeros centímetros de suelo se distribuyen las raíces primarias, poseen yemas vegetativas que le permite a la planta propagarse. Desarrolla raíces secundarias y terciarias. (Lopez & Gómez, 2008, p. 13)

2.1.2 Requerimientos para el cultivo de mora.

Para cultivar cualquier especie vegetal son necesarias condiciones específicas. Estas condiciones varían dependiendo del suelo; es decir, si se tiene un suelo con cantidades altas o bajas de cierto mineral, su fertilización se enfocará en ese mineral. De la misma manera dependerá del cultivo. La mora presenta necesidades específicas como el clima, la latitud, y es dependiente de ciertos minerales.

2.1.2.1 Requerimientos nutricionales.

El cultivo de mora requiere de un suelo que contenga: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, boro, hierro, cobre, manganeso, molibdeno y zinc (Ospina, 2012) siendo más exigente en nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio (Lopez & Gómez, 2008). La relación Calcio/Magnesio, Calcio/Potasio y Potasio/Magnesio deben mantenerse en rangos aceptables de 2-5, 5-25 y 2,5-15 meq/100gr respectivamente (Ospina, 2012, p. 5). Para considerar un cultivo de mora en buenas condiciones se debe analizar que a nivel foliar el nitrógeno, potasio, calcio, magnesio y fósforo se encuentren entre 2,2% - 4%, 1,1% - 3%, 0,6% - 2,5%, 0,25% - 0,8% y 0,2% - 0,6%, respectivamente. (Ospina, 2012). Para lograr estos valores, el suelo debe contener gran cantidad de materia orgánica e inorgánica (Lopez & Gómez, 2008, p. 20).

2.1.2.2 Requerimientos climatológicos.

Se recomienda que los cultivos de mora se realicen de 1300 a 2500 m.s.n.m., la temperatura debe oscilar entre 15 y 22 °C con una humedad relativa de 70% - 80%; cuando las temperaturas son bajas los frutos son pequeños (Lopez & Gómez, 2008, p. 21).

2.1.3 Tipo de suelo.

Los suelos óptimos para el cultivo de *Rubus glaucus* son franco-arenosos. Estos suelos poseen arcilla, limo, arena, ricas en fósforo y potasio. Se recomiendan suelos capaces de retener humedad. La mora tolera el pH ácido pero su desarrollo es mejor en pH cercano al neutro, generalmente en un rango entre 6-6.5 (Lopez & Gómez, 2008, p. 21)

2.1.4 Siembra.

Para la siembra de mora es necesario realizar hoyos de 40cm x 40cm x 40cm, la separación entre cada planta debe ser de no menos de 1,5 metros (MAGAP, 2013). La distancia deberá ampliarse cuando el suelo presente cantidades de nutrientes por encima de lo óptimo (Lopez & Gómez, 2008, p. 22). La siembra se realiza por estacas. Debe existir una planta madre de la cual se extraerán las mejores ramas para inducir su crecimiento en pequeñas fundas que luego serán trasplantadas al suelo (Anexo 1) (MAGAP, 2013, p. 6).

2.1.5 Cosecha.

Los primeros frutos aparecen ocho meses luego de sembradas las plantas (MAGAP, 2013), una vez que llegan a los quince meses la planta presenta su mayor pico de producción. En condiciones controladas y óptimas, el rendimiento de la mora es de 18 Tn/Ha (Grijalba, Calderón, & Pérez, 2010, p. 30). La cosecha es la parte más crítica, debido a que los frutos maduran de manera no uniforme y la planta presenta espinas en toda su superficie. La mora es un fruto no climatérico; es decir, no continúa su maduración separada de la planta. Se recomienda que la recolección de frutos se realice una vez que se haya evaporado el rocío. Además, no se debe manipular el fruto sino almacenarlo enseguida en contenedores de poco volumen (Lopez & Gómez, 2008, p. 23).

2.1.6 Principales afectaciones.

El cultivo de mora se ve afectado generalmente por plagas y enfermedades. Los organismos que causan plagas son ácaros, pulgones, la araña roja y escarabajos (Anexo 2) (MAGAP, 2013, p. 8). Por otro lado, los microorganismos que causan las enfermedades son hongos. En la siguiente tabla se muestran las principales enfermedades, sus síntomas y el agente causante.

Tabla 1.

Principales afectaciones del cultivo de mora.

	Agente infeccioso	Afectación	Síntomas	Referencia
Insectos	<i>Tetranychus sp</i>	Succionan la sabia de los tallos	Los frutos se tornan de color rojo óxido	MAGAP. (2013). La mora de castilla. Quito: MAGAP.
	<i>Aphis sp</i>	Succionan la sabia de los tallos liberando virus	Hojas jóvenes afectadas y frutos color rojo óxido	Haddad, N. M., Crutsinger, G. M., Gross, K., Haarstad, J., & Tilman, D. (2010). Plant diversity and the stability of foodwebs. <i>Ecology letters</i> , 42-46.
	<i>Phyllophaga sp</i>	Muerde las raíces dejando heridas que facilitan el ingreso de bacterias, virus y hongos	Hojas jóvenes afectadas y frutos color rojo óxido	Dutta, S. (2015). BIOPESTICIDES: AN ECOFRIENDLY APPROACH FOR PEST CONTROL. <i>WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES</i> , 250-265.
Hongos	<i>Oidio sp y Sphaeroteca sp</i>	La enfermedad es conocida como Mildeo polvoso	Hojas arrugadas y manchadas. En el envés aparece un polvo blanco. Los frutos se afectan en casos crónicos	MAGAP. (2013). La mora de castilla. Quito: MAGAP.
	<i>Botrytis spp</i>	Afecta directamente al fruto	Mata las yemas pudriendo el fruto	MAGAP. (2013). La mora de castilla. Quito: MAGAP.
	<i>Peronospora spp</i>	La enfermedad es conocida como Mildeo veloso	El tallo se fisura impidiendo el crecimiento de nuevas ramas	Rubin, A. E., Galperin, M., Ploch, S., Runge, F., & Thines, M. (2014). Seed Transmission of <i>Pseudoperonospora cubensis</i> . <i>PLOS one</i> , 45-50.
	<i>Verticillium spp</i>	La enfermedad se conoce como marchitez	Hojas amarillas y tallos secos de color negro azulado. La planta finalmente muere	Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2009). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen <i>Verticillium</i> , with the descriptions of five new species. <i>PLOS ONE</i> , 1-22.

2.2 Microorganismos del suelo

El suelo es un ecosistema rico en diversidad biológica, la cantidad de especies de microorganismos e invertebrados que alberga, es incalculable. Sin embargo, los microorganismos pueden ser bacterias, hongos y levaduras, por su parte, los invertebrados pueden ser insectos, arácnidos y lombrices. Todos estos organismos constituyen una parte para que el proceso de producción de los alimentos se lleve a cabo. (FAO, 2009)

2.2.1 Hongos.

Los hongos pertenecen al Reino Fungi. La diversidad genética es tan grande que se le ha asignado un Reino de la vida. La cantidad de formas, colores y tamaños es inmensa. Se han identificado hasta el momento más de trecientas mil especies. Sin embargo, lo único que se aprecia a simple vista es el cuerpo fructífero del hongo. (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013, p. 12)

El cuerpo del hongo es conocido como micelio, compuesto por filamentos denominados hifas. Para su reproducción, los hongos generan una zona conocida como himerio en macromicetos y gleba en hongos gasteroides. La diferencia entre estas partes del hongo es importante para determinar a qué clase pertenecen (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013, p. 13).

2.2.1.1 Clasificación.

Se han clasificado a los hongos en dos grandes grupos: Eumycota y Myxomycota. La clasificación de los hongos se encuentra en la siguiente figura.

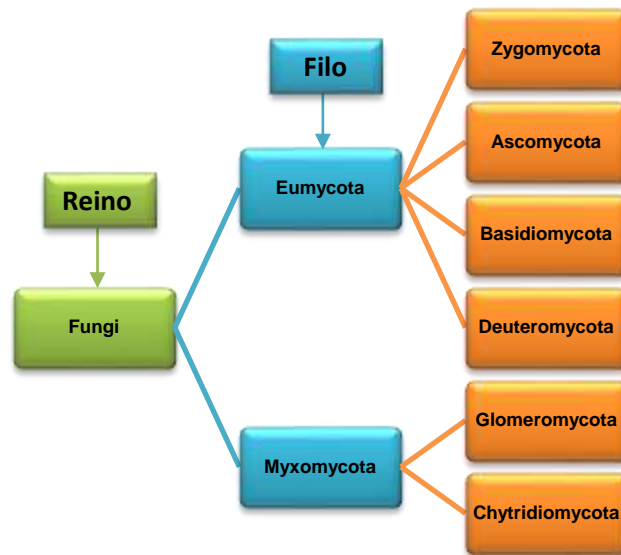


Figura 1: Clasificación del Reino Fungi.

Adaptado de ICTF, 2016.

Conforme ha avanzado la investigación enfocada en la agricultura, se han identificado hongos que resultan beneficiosos para las plantas y para el suelo. De igual manera, los causantes de pérdidas incalculables de cultivos, han sido los hongos.

2.2.1.2 Hongos benéficos.

Los hongos benéficos son conocidos así debido a que, cualquiera que esta sea, tienen la capacidad de relacionarse de manera positiva con las plantas y el suelo. Existen hongos benéficos propios del suelo, como *Trichoderma* spp (Anexo 3) y también hongos que realizan interacción con las plantas como las micorrizas (Anexo 4). La presencia de estos microorganismos en el suelo es sinónimo de un suelo saludable (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013, p. 14)

2.2.1.2.1 *Trichoderma* spp.

El científico Christiaan Hendrik Persoon describió por primera vez el género *Trichoderma* en 1794. Este género es altamente conocido por sus capacidades antagonistas frente a hongos patógenos. Los estudios acerca de este hongo iniciaron aproximadamente en 1930 (C.R. Howell, 2013, p. 4).

La capacidad de crecer en sustratos de cualquier naturaleza con cantidades mínimas de nutrientes y rápidamente, le ha otorgado ventaja frente a otros microorganismos. La utilización de este microorganismo ha sido reportada como la alternativa más exitosa al uso de pesticidas químicos (Hasan, Gupta, & Anand, 2013, p. 37).

Dentro de las especies del género *Trichoderma* se destacan *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii*. Estas son especies propias del suelo (C.R. Howell, 2013, p. 5). Esta distribuido en varias latitudes y presentes en suelos ricos en materia orgánica. La determinación de especies resulta difícil, se debe optar por técnicas moleculares para distinguir cada especie (Martinez, Infante, & Reyes, 2013, p. 2).

2.2.1.2.2 Taxonomía.

Entre los hongos saprofitos más comunes se encuentra *Trichoderma*. Pertenece a la división *Eumycota*, subdivisión *Deuteromycota*, clase *Hyphomycetes*, orden *Hyphales* y familia *Moniliaceae*, género *Trichoderma* (Argumedo, Alarcon, Ferrera, & Peña, 2009). La reproducción de *Trichoderma spp* es desconocida. (C.R. Howell, 2013, p. 5)

2.2.1.2.3 Morfología.

Trichoderma está compuesta por filamentos llamados hifas. Las hifas son estructuras cilíndricas y su crecimiento es en cualquier dirección; algunas especies tienen hifas septadas, estas permiten su reproducción (Anexo 5) (FAO, 2009). El color del micelio de *Trichoderma* spp es de color blanco y luego de la esporulación se torna de color verde y genera olores parecidos al coco. Su adaptabilidad está dada por la recombinación parasexual y mutaciones que se generan por acción del ambiente. Su reproducción es mediada por esporas y se albergan en la gleba. (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013, p. 13)

2.2.1.3 Hongos patógenos.

Los hongos patógenos son todos aquellos que causan enfermedades, ya sea a las plantas, animales o seres humanos. Los hongos son ubicuos y se los puede encontrar en cualquier ambiente (BMC Biology, 2012, p. 7). Dentro de los hongos que afectan a los cultivos de mora esta *Verticillium* spp. (MAGAP, 2013, p. 8)

2.2.1.3.1 *Verticillium* spp.

Verticillium es uno de los hongos que causa enfermedades vasculares a las plantas. Las especies más destacadas son *V. albo-atrum* y *V. dahliae*; han sido reportadas como las causantes de millones de dólares de pérdidas anuales. En infecciones de lechuga se puede perder el 100% de su producción (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 40). Las especies del género *Verticillium* no tienen definido su forma de reproducción (sexual o asexual). Son capaces de infectar más de 200 especies de plantas, incluyendo perennes, anuales, frutales y ornamentales. Los principales problemas con *Verticillium* son su capacidad de liberar estructuras de reproducción (hifas) que persisten durante muchos años, su hábitat es cualquier tipo de suelo y la capacidad de infectar un número incalculable de especies vegetales (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 42).

2.2.1.3.2 Taxonomía.

La historia de la taxonomía de *Verticillium* es realmente extensa. Su primera descripción fue en 1816 y hasta ahora se han descrito cerca de 190 especies. *Verticillium* pertenece a la clase *Incertae sedis*, familia *Plectosphaerellaceae* (Inderbitzin, y otros, 2009, p. 5). Existen especies asociadas a la subdivisión *Ascomyceto*, sin embargo es necesaria la realización de análisis moleculares para determinar de que especie de *Verticillium* se trata; generalmente las especies son asignadas en dependencia a la especie vegetal que infecta (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 44).

2.2.1.3.3 Morfología.

Verticillium es un hongo de color blanco. Las diferencias morfológicas entre especies son minúsculas. Hifas más grandes o de textura distinta las convierten en especies diferentes. Ciertas especies crecen uniformemente, otras son de crecimiento amorfo (Anexo 6). Sus hifas son gruesas y sus esporas ovaladas (Amyotte, y otros, 2012). En un cultivo vegetal se reconocen debido a que las enfermedades causadas son de tipo vascular (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 47).

2.2.1.3.4 Mecanismos de infección de *Verticillium* spp.

La infección empieza a partir de una microsclerotia latente presente en el suelo o incrustada en restos vegetales. Cuando no existen huéspedes cerca, la microsclerotia puede mantenerse en latencia hasta 14 años. Sin embargo, las microsclerotias de la especie *V. albo-atrum* solo sobreviven hasta cinco años (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 50).

Una vez ocurrida la germinación de la microsclerotia, se genera una gran hifa que se atraviesa las raíces del huésped. La colonización se ha observado en los pelos radiculares y en las extremidades de las raíces; la hifa crece entre las células epidermales (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 51).

Muchos estudios tratan de identificar específicamente los procesos moleculares de la infección. Resulta bastante difícil detectar el momento preciso en que la planta tiene la infección, pero se cree que es cuando las hifas del hongo atraviesan el cilindro vascular. (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009, p. 52)

2.3 Control Biológico de cultivos vegetales.

Fertilizantes, herbicidas, insecticidas, fungicidas, todos ellos químicos, han sido utilizados indiscriminadamente en nuestro suelo. La emergente alarma ambiental ha presionado a los científicos y ambientalistas a buscar alternativas amigables con el entorno. La utilización de organismos propios del suelo y de ambientes naturales se ha tornado en la alternativa más factible. En una sociedad consumista, las prioridades son económicas, en el sentido de que lo barato es aceptable y preferido. Las soluciones ambientales mediadas por organismos son mucho menos costosas que las químicas. La eficiencia es un parámetro que se toma en cuenta cuando no arrastra cultivos o plantas de interés, es decir cuando una solución es específica. La generación de soluciones basadas en organismos vivos se ha centrado en ser específica; es decir, cierto organismo debe atacar a otro único patógeno. Resulta mejor si ese organismo ataca a varios patógenos a la vez. El control biológico o biocontrol, surgió precisamente de la capacidad de ciertos organismos para defender a las plantas de patógenos y su potencial como alternativa a pesticidas.

2.3.1 Mecanismos de control biológico

El biocontrol se lleva a cabo mediante procesos biológicos que realizan los microorganismos. Existen organismos que mediante la producción de metabolitos, como enzimas o sustancias tóxicas, atacan a los patógenos. Otros emplean el parasitismo, es decir infectan al patógeno. Los biocontroladores de plagas, se alimentan del organismo causante de la plaga.

Los procesos más comunes son la competencia por nutrientes y espacio en la rizósfera (área comprendida entre la raíz y suelo) de la planta y la producción de metabolitos; la enzima que facilita el control biológico es la celulasa, enzima que degrada los componentes estructurales de los patógenos causándoles la muerte; uno de los microorganismos más empleados en biocontrol es *Trichoderma* spp. (C.R. Howell, 2013, p. 7). *Trichoderma* spp realiza los 3 mecanismos de acción: producción de metabolitos, competencia por nutrientes y espacio y microparasitismo (C.R. Howell, 2013). Además, *Trichoderma* spp es naturalmente resistente a herbicidas, fungicidas y/o pesticidas, debido a que las distintas cepas cubren todo el suelo antes de que los agroquímicos sean colocados en el suelo (Benitez, Rincón, Limón, & Codón, 2004, p. 251)

En cuanto a la competencia por nutrientes y espacio, en el suelo existen infinidad de microorganismos ya sean hongos, bacterias y virus; esto genera una competencia entre ellos por sobrevivir. Actualmente, los nutrientes en el suelo se encuentran limitantes, esto ha generado variabilidad de las especies haciéndolas más resistentes. La pérdida de materia orgánica y de organismos benéficos en el suelo, es causada por la inanición. Esto genera una competencia entre todos los microorganismos del suelo. (Benitez, Rincón, Limón, & Codón, 2004, p. 251)

Trichoderma spp actúa como biofertilizante y estimulador de los mecanismos de defensa de las plantas. Esto lo realiza mediante la interacción con los microorganismos que interactúan con las plantas directamente, que son las micorrizas, mejorando así el enraizamiento de las plantas. Además, posee una mayor capacidad para movilizar nutrientes que otros organismos. (Benitez, Rincón, Limón, & Codón, 2004, p. 252)

La producción de metabolitos o antibiosis impide el crecimiento de patógenos. Los metabolitos pueden ser volátiles y no volátiles; los metabolitos principales son el ácido harzianico, alamicinas, tricholina, antibióticos, viridina, gliovirina, glicopreninas, ácido heptelídico y enzimas (Benitez, Rincón, Limón, & Codón, 2004, p. 255). El micoparasitismo se entiende como el ataque directo de *Trichoderma* spp contra patógenos. Este proceso se basa en la degradación de las paredes celulares mediante las enzimas quitinasas

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1 Diagrama de flujo de la metodología.

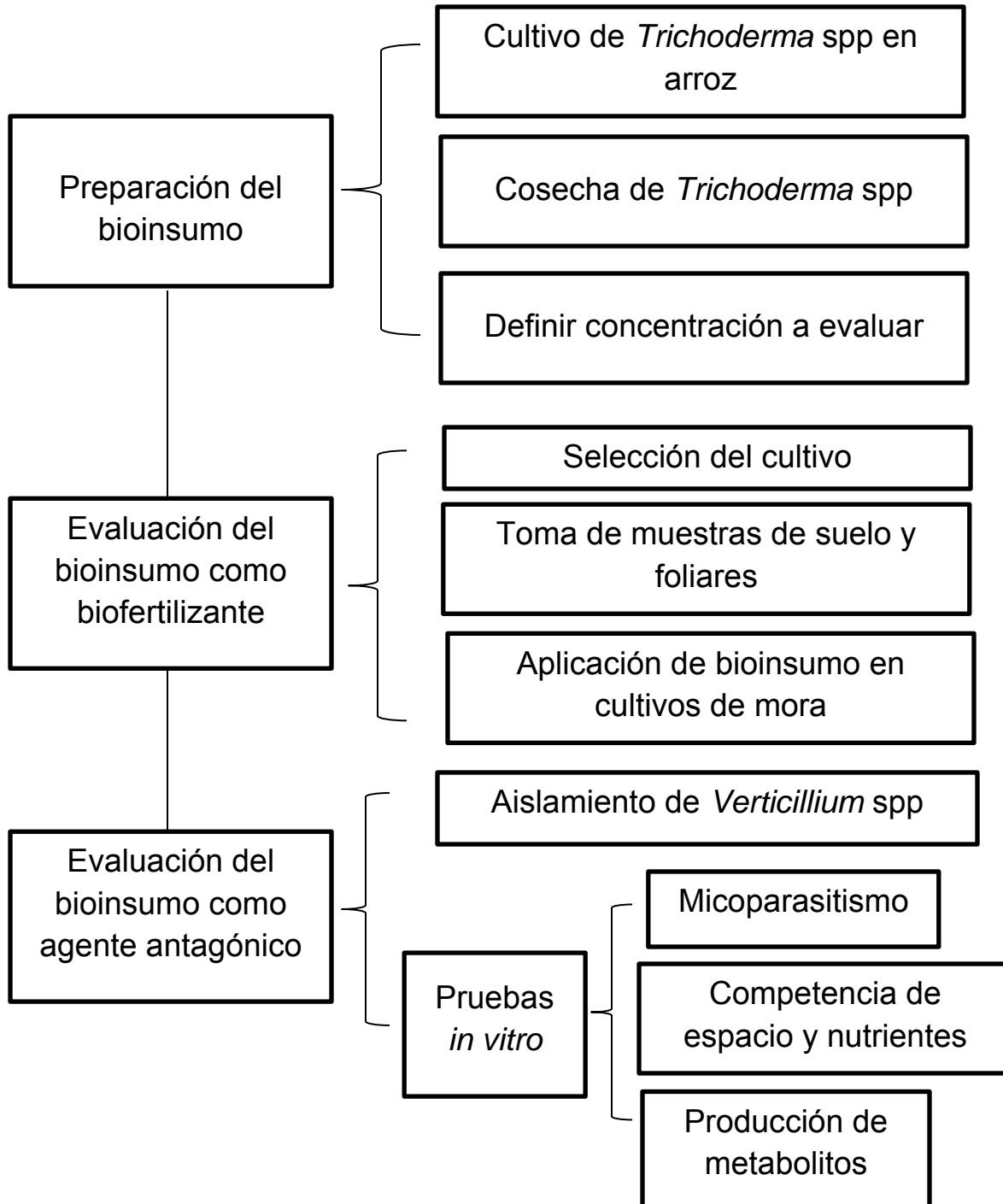


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología

3.2. Diseño del plan experimental.

El presente proyecto tiene como objetivo evaluar *Trichoderma* spp como fertilizante y agente antagónico de *Verticillium* spp.. Para ello, primeramente, se elaboró un bioinsumo a base de cuatro especies de *Trichoderma*: *T. hamatun*, *T. harzianum*, *T. koningii* y *Trichoderma* spp. Se probaron tres concentraciones (1.98×10^9 conidios/ml, 1.32×10^9 conidios/ml y 2.6×10^6 conidios/ml) a tres volúmenes cada una (5ml, 10ml y 15ml). Para evaluar su eficacia como fertilizante se aplicaron las distintas dosis del bioinsumo en cultivo de *Rubus glaucus* infectado con *Verticillium* spp. Se evaluaron los nutrientes presentes en el suelo, el contenido foliar de nutrientes y el mejoramiento de las condiciones de las plantas enfermas antes y después del tratamiento. Las capacidades antagónicas se analizaron mediante tres pruebas *in vitro*: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y producción de metabolitos por parte de *Trichoderma* spp

La prueba estadística utilizada para analizar la variación de los nutrientes del suelo y hojas, fue la prueba t para medias de dos muestras emparejadas (t student); mientras que la prueba estadística utilizada para el análisis de las pruebas *in vitro* fue Kruskal-Wallis.

3.3. Determinación de la población y muestra.

La población total de estudio fueron 18 camas de cultivo pertenecientes al mismo lote de plantación. Se dividió cada cama en 5 cuadrantes, resultando 120 cuadrantes en total como población. Para la obtención de la muestra se aplicó la ecuación uno. Donde σ es la desviación estándar, generalmente se recomienda que sea 0.5, **E** es el margen de error, el cual debe estar entre 0.003 - 0.05, **Z** es el valor de Z para 95% que es 1.96 y **N** es el valor de la población (120 cuadrantes).

$$n = \frac{\sigma^2}{\frac{E^2}{z^2} + \frac{\sigma}{N}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

3.4 Descripción de la metodología.

El presente proyecto experimental se llevó a cabo en la provincia de Tungurahua. Las pruebas en campo en el cantón Cevallos, recinto San Pedro (1°21'51.0"S 78°36'50.2"W) y la parte experimental de laboratorio en el cantón Ambato, en el Laboratorio Artesanal de Bioinsumos de Tungurahua del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, a cargo del Mb. Pedro Lara.

El medio utilizado para el cultivo de *Trichoderma* spp y *Verticillium* spp fue *Difco*TM *Potato Dextrose Agar* (PDA) a 3.9% a pH neutro. Se utilizaron cajas petri descartables de 94X16mm. Todas las esterilizaciones se llevaron a cabo durante 15 minutos a 120°C y entre 15-18 psi. *Verticillium* spp fue incubado a 27°C durante el tiempo que indicaba cada prueba. *Trichoderma* spp fue incubado a 27°C durante el tiempo que indicaba cada prueba. Según lo descrito por Atlas, 2010.

3.4.1 Obtención del bioinsumo a base de *Trichoderma* spp.

Para la preparación del bioinsumo a base de *Trichoderma* spp, se utilizó el protocolo descrito por Troya y Vaca, 2014. (Anexo 7). Que resumidamente consiste en tres procesos que son 1) cultivar *Trichoderma* spp en arroz, 2) cosechar *Trichoderma* spp y 3) estimar la concentración de la solución final. Para esto fue necesario tener un cultivo stock de cada cepa que fue propagada por separado. Las cepas fueron propias del laboratorio (*T. hamatun*, *T. harzianum* y *T. koningii*).

3.4.1.1 Cultivo de *Trichoderma* en arroz.

El cultivo de *Trichoderma* se realizó en matraces. El medio nutritivo para este cultivo fue arrocillo. Se colocó 120g de arrocillo en matraces de 350ml. El arrocillo se lavó hasta que el agua resultante fuese transparente. Se coció el arroz durante cinco minutos. Se procuró que el arrocillo estuviera semiduro. Se cerraron los matraces con tapones de algodón y gasa y se esterilizaron.

Una vez esterilizados los matraces se sembró *Trichoderma* mediante *siembra por parche*. Esta siembra consistió en realizar un corte de 0.5x0.5 cm del agar que contenía la cepa y colocarlo en el matraz con el arrozillo. Se agitó manualmente el matraz para distribuir las esporas por todo el arrozillo y homogenizar el crecimiento. Cada cepa fue inoculada en distintos recipientes. Se incubaron los matraces a temperatura ambiente con 12 horas de luz y 12 oscuridad. Se esperó 15 días hasta obtener la mayor esporulación posible.

El matraz resultante fue la matriz madre de cada cepa. Fue necesario la multiplicación de este matraz siguiendo el siguiente esquema.

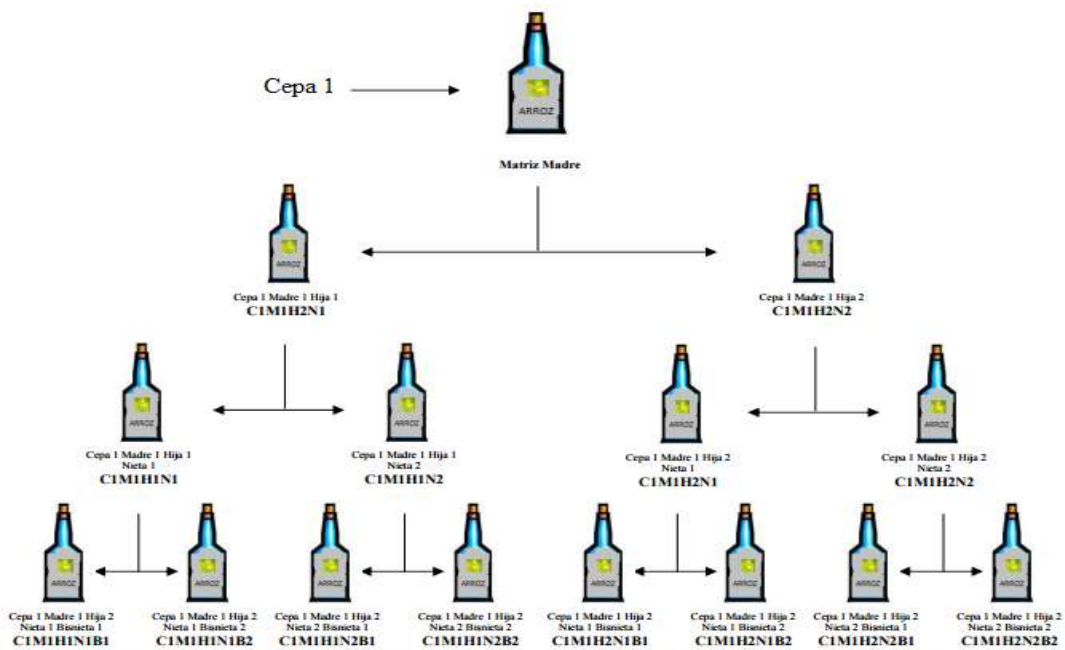


Figura 3: Metodología para la multiplicación de matraces madre. Tomado de (Troya & Vaca, 2014)

De la matriz madre se extrajo una muestra que fue inoculada en matraces subsiguientes, una muestra diferente en cada matraz. Este proceso se repitió tres veces para cada cepa. Se incubaron los matraces hasta obtener una esporulación deseada.

Una vez que se observó un crecimiento poblacional adecuado se procedió a la siembra en fundas de producción; cada funda contuvo 300g de arrozillo, previamente esterilizado. Se añadió 200ml de agua destilada estéril en cada matraz, se agitó hasta lograr desprender las esporas del arrozillo; de los 200ml se tomaron 5ml que se colocaron en las fundas de producción. De cada matraz se obtuvieron 40 fundas de producción. Se incubaron las fundas a temperatura ambiente con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 15 días.

3.4.1.2 Cosecha de *Trichoderma* spp.

La cosecha de *Trichoderma* se la realizó a partir de las fundas de producción. Se tomaron 100g del arrozillo y se mezcló con 100ml de agua destilada estéril. Se aplicó agitación para remover la mayor cantidad de esporas del arrozillo; es decir, se dejó al arrozillo prácticamente limpio. Se tamizó manualmente la mezcla y se recolectó el líquido con *Trichoderma* en un envase estéril. Este proceso se realizó tres veces hasta obtener el arrozillo limpio.

Además, se aplicó un capturador bioquímico específico para *Trichoderma* spp de *Plantsphere Laboratories*. La solución cosechadora es 20ml de cultivo cosechador en un litro de agua destilada estéril. Por cada gramo de arrozillo inoculado con *Trichoderma* se utilizó 100ml de solución cosechadora.

El procedimiento se realizó para cada cepa de *Trichoderma*. El bioinsumo final fue la mezcla del líquido resultante de cada cepa. Finalmente, se realizó el conteo de esporas del bioinsumo final.

3.4.1.3 Definir concentraciones de bioinsumo a evaluar.

Para la estimación de la concentración del bioinsumo se realizaron tres diluciones seriadas: 1/10, 1/100 y 1/1000. El conteo se realizó de la dilución 1/100. Se tomó 40ul y se colocó en la cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de esporas de los cinco cuadrantes y la fórmula utilizada la ecuación dos. Donde #C es el número de conidios, 250000 es una constante de cámara y Fd es el factor de dilución.

$$\#C = \bar{x} \times 250000 \times Fd \quad (\text{Ecuación 2})$$

3.4.2 Evaluación del bioinsumo como biofertilizante.

3.4.2.1 Selección del cultivo y toma de muestra de suelo y foliares.

El cultivo donde fue aplicado el bioinsumo fue seleccionado debido a los problemas con *Verticillium* spp que presentaba. Previo a la aplicación del bioinsumo en campo, se realizó la toma de muestras del suelo y de las hojas de las plantas objetivo. Las muestras de suelo fueron tomadas a 20cm de profundidad y a 15cm de distancia de las plantas; utilizando una pala para jardinería. Las hojas fueron tomadas de la parte media de la planta, es decir hojas en un estadio intermedio, utilizando una tijera de poda. Según el protocolo de muestreo de Fertilab, 2012. Las muestras de suelo fueron almacenadas en una funda plástica *ziploc* y las hojas fueron almacenadas en fundas de papel para su posterior transporte hacia el laboratorio de suelos y aguas del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (Anexo 8). Los nutrientes evaluados en el suelo fueron nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), zinc (Zn) y boro (B); además materia orgánica (MO), B-à bases (Ca/Mg, Mg/K, Ca+Mg) y pH. Por su parte, en hojas se evaluaron nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg). El mismo procedimiento se realizó una vez terminado el proyecto.

3.4.2.2 Aplicación del bioinsumo en cultivos de mora.

Para la aplicación en campo se desarrollaron bioinsumos a tres concentraciones: 1.98×10^9 conidios/ml (concentración 1), 1.32×10^9 conidios/ml (concentración 2) y 2.6×10^6 conidios/ml (concentración 3). Cada concentración fue aplicada a tres dosis: 5ml, 10ml y 15ml.

El siguiente esquema ilustra cómo fue aplicado el bioinsumo en el campo. Donde A son las camas del cultivo destinadas a la dosis uno, B y C para las dosis dos y tres, respectivamente. Cada dosis se aplicó de tres diferentes concentraciones.

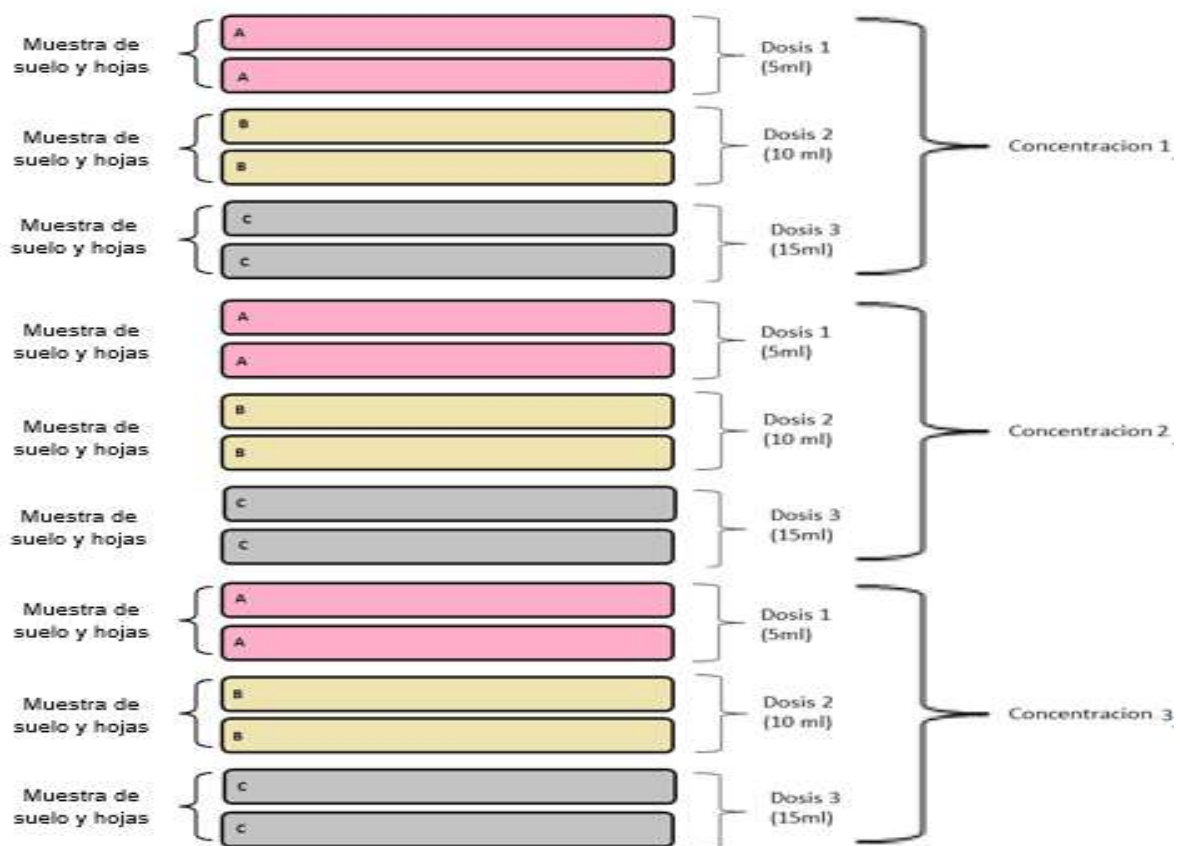


Figura 4. Esquema de trabajo en campo.

Se identificaron cuatro plantas por dosis, es decir 12 plantas por concentración, dando un total de 36 plantas estudio. A cada dosis se le designaron dos camas de cultivo. Para la aplicación del bioinsumo se siguió la metodología *Drench* (K. T. Leath, 1973), es decir directamente en la base del tallo. Cada dosis del bioinsumo se mezcló con 500ml de agua de riego para facilitar la aplicación de volúmenes muy pequeños. La aplicación se realizó una vez por semana durante cuatro semanas.

3.4.3 Evaluación del bioinsumo como agente antagonista en cultivos *In vitro* de *Verticillium* spp.

3.4.3.1 Pruebas *in vitro*.

Para la realización de las pruebas *in vitro* se cultivó cada concentración del bioinsumo en agar PDA (Anexo 9) durante siete días. Estos cultivos fueron los cultivos stock de *Trichoderma* spp. De esta manera se comprobó que el bioinsumo no tuvo contaminación y que en el medio de cultivo solo creció *Trichoderma* spp. De los tallos infectados se identificó un solo microorganismo (*Verticillium* spp); este fue subcultivado para poseer cultivos stock. Se evaluaron tres pruebas: micoparasitismo de *Trichoderma* spp hacia *Verticillium* spp., competencia de nutrientes y espacio, y producción de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. El siguiente esquema manifiesta las tres pruebas *in vitro*. Donde **A** representa a *Verticillium* spp y **B** a *Trichoderma* spp.



Figura 5. Esquema de trabajo en laboratorio

3.4.3.2 Aislamiento y purificación de *Verticillium* spp.

Para el aislamiento de *Verticillium* spp fue necesario extraer una sección de tallo de una planta infectada. El tallo extraído fue fragmentado en cortes utilizando un bisturí estéril. (Anexo 10). Se desinfectaron los fragmentos con solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante siete minutos (Anexo 11) y se enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril. Se colocaron los tallos estériles en cajas petri con agar PDA. Se incubaron a 27°C durante siete días (Anexo 12).

3.4.3.3 Micoparasitismo de *Trichoderma* spp hacia *Verticillium* spp.

Se sembró *Verticillium* spp a partir del cultivo stock en 48 cajas con agar PDA, se incubo durante 15 días a 27°C; hasta ver toda la caja poblada (Anexo 13). Una vez pasados los 15 días de incubación se aplicó un disco de cartulina de 9mm empapados del bioinsumo en un extremo de la caja sobre *Verticillium* spp. Se incubo durante 15 días más (Anexo 14).

Este proceso se repitió para cada concentración de bioinsumo. Finalizado el crecimiento de los dos microorganismos se procedió a visualizar en el microscopio. Se tomó con ayuda de una cinta adhesiva una sección de la caja en donde se visualizaba fácilmente la interacción de los dos microorganismos. Se tiño con azul de metileno y se observó.

3.4.3.4 Competencia de nutrientes y espacio.

Para esta prueba se siguió el protocolo de Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013. Se sembró por estrías *Verticillium* spp en una caja con agar PDA. Enseguida se colocó discos de cartulina de 9mm empapados con agar PDA por toda la caja para que el hongo crezca en ellos. Se incubó durante 15 días a 27°C (Anexo 15).

Una vez crecido *Verticillium* spp en los discos, se colocó a un extremo de una caja con medio PDA un disco con *Verticillium* spp y al extremo contrario un disco de

iguales dimensiones empapado del bioinsumo. Los dos discos deben estar a un centímetro de distancia del borde de la caja (Anexo 16). Se incubó durante siete días a 27°C. Se repitió el proceso para las tres concentraciones de bioinsumo. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó utilizando la ecuación tres, donde r1 es el radio de crecimiento del patógeno menos expuesto al antagonista y r2 el radio en dirección directa al antagonista (Anexo 17).

$$\%I = \frac{r1-r2}{r1} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

3.4.3.4 Producción de metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp.

En el centro de una caja petri con agar PDA, se colocó un disco de papel celofán de 40mm de diámetro totalmente estéril. Sobre él, con un asa de disco, se colocó el bioinsumo; aproximadamente una gota (Anexo 18). Se incubó a 27°C durante 48 horas. Este método fue desarrollado por Dennis & Webster en 1971.

Pasadas las 48 horas se retiró el disco de papel celofán con pinzas estériles y se desecharon en un recipiente para luego ser autoclavadas. En el centro de la caja, donde estuvo el papel celofán, se inoculó *Verticillium* spp. Se incubó a 27°C durante siete días (Anexo 19).

El porcentaje de inhibición se determinó utilizando la ecuación cuatro, donde C es el diámetro del crecimiento del patógeno sin presencia del antagonista y T el crecimiento del patógeno en presencia del antagonista. El diámetro fue medido en centímetros.

$$\%I = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Capítulo IV. Resultados y Discusión

4.1 Bioinsumo.

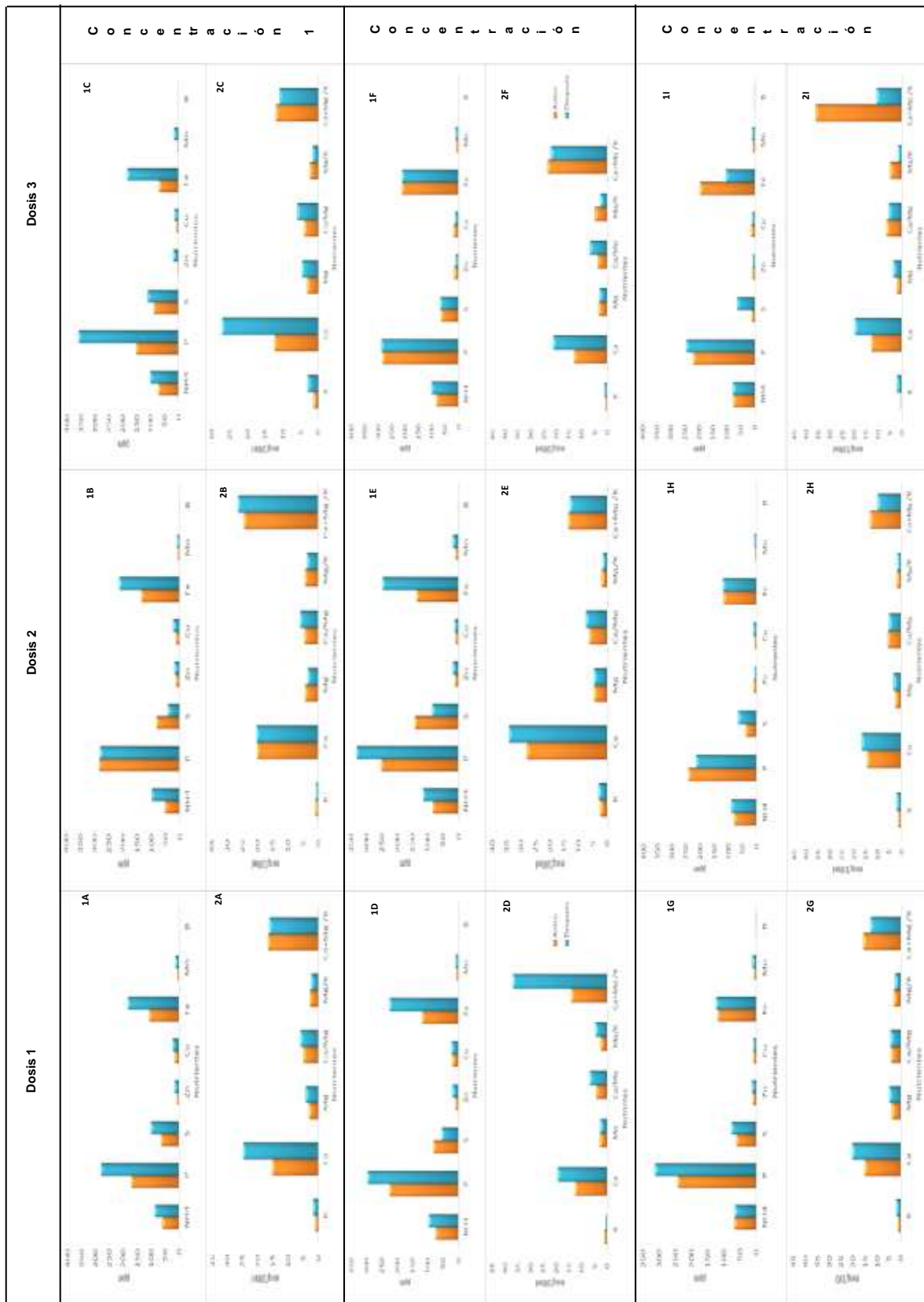
El bioinsumo obtenido fue de color verde oscuro, con olor característico a coco. La concentración inicial obtenida fue de 1.98×10^9 . A partir de esta se diluyeron las dos subsiguientes concentraciones. En el anexo 20 se observa el bioinsumo final. La concentración del bioinsumo depende de la esporulación de *Trichoderma* spp; es muy importante que la incubación sea por el tiempo adecuado, para así poder obtener un producto más concentrado. Si el *Trichoderma* es cosechado antes de un tiempo prudente, que generalmente son 15 días, es muy probable que la concentración sea baja y no tenga una acción eficaz.

4.2 Análisis de suelo.

Los valores de nutrientes en el suelo pre-tratamiento se indican en el anexo 21 y los resultados post-tratamiento en el anexo 22. Por su parte, los resultados pre-tratamiento de análisis foliar se detallan en el anexo 23 y post-tratamiento en el anexo 24. Las gráficas básicamente comparan las cantidades de nutrientes medidas de ppm, meq/100ml y %, antes de aplicar los tratamientos y después de finalizarlos. La mayoría de estudios se enfocan en la dinámica del nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), potasio (K) y magnesio (Mg) debido a que son los macroelementos necesarios. Sin embargo, existen otros nutrientes que juegan roles importantes en la fisiología de las plantas. Existe variabilidad de los nutrientes en el suelo en cada tratamiento. En las siguientes figuras se ilustra la variación de los nutrientes en dependencia del tratamiento (tabla 2)

Tabla 2.

Análisis de los nutrientes en suelo antes (tomate) y después (azul) del tratamiento con el bioinsumo a diferentes dosis (1, 2 y 3) y concentraciones (1, 2 y 3). Los análisis de los nutrientes NH₄, P, S, Zn, Cu, Fe, Mn, B se muestran en las gráficas superiores (1A,1B,1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I) y los análisis de K, Ca, Mg, Ca/Mg, Mg/K, Ca+Mg/K se muestran en las gráficas inferiores (2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 2I).



Concentración

Concentración

Concentración

El nitrógeno es el nutriente que afecta altamente el rendimiento comercial de los cultivos que se planten en cualquier suelo. Además del nitrógeno, está el fósforo y el potasio, estos tres macronutrientes siempre se toman como prioridad para cualquier plan de producción agrícola. (Espinoza, Martínez, Rivera, & Espinoza, 2015)

En el presente proyecto, los valores de amonio (forma disponible de nitrógeno), fósforo y potasio mantienen un crecimiento en todos los tratamientos. En parte se debe a las interacciones entre los microorganismos. *Trichoderma* spp interactúa con otros microorganismos como micorrizas y bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo. Todos esos microorganismos comparten información y generan un equilibrio nutricional en el suelo (Brotman, y otros, 2013, p. 1-15)

Los tres volúmenes aplicados de la concentración uno, muestran incremento de nutrientes; más, sin embargo, el volumen dos no fue tan eficiente debido a que existió un decrecimiento de ciertos nutrientes. No obstante, es importante recalcar que los valores iniciales de nutrientes en el suelo donde se aplicó el volumen dos de la concentración uno, fueron mayores que los valores iniciales del suelo de los dos tratamientos restantes.

Entre los nutrientes más importantes, está el nitrógeno. Con la utilización de lombrices, el nitrógeno se encuentra en 0.3% (Huerta, Dios, & Nuncio, 2007), mientras que en el presente proyecto el nitrógeno incrementa un 45%.

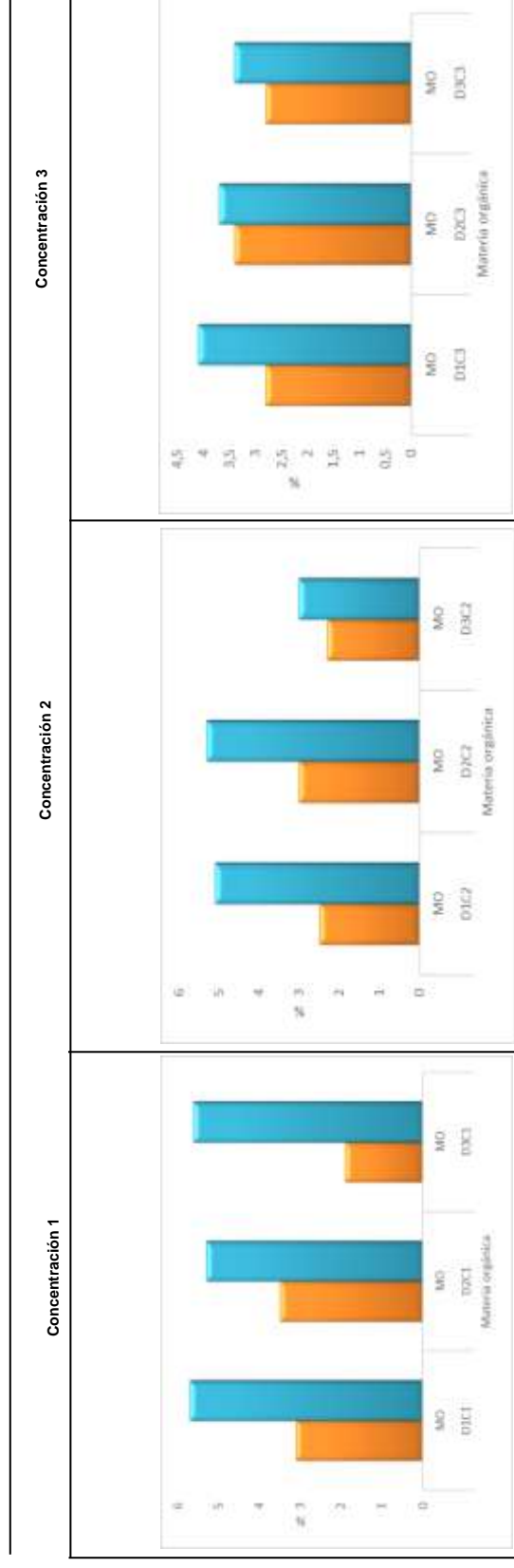
La mayoría de estudios con *Trichoderma* spp se enfocan en demostrar los efectos antagónicos frente a otros microorganismos patógenos, más no estudian sus efectos como biofertilizante.

Con la aplicación de la concentración tres existe incremento de nutrientes, mas no en porcentajes altos. Es importante recalcar que el estado del suelo en las 18 camas de cultivo fue heterogéneo; es decir, los nutrientes iniciales son drásticamente diferentes y esto puede influir en el incremento de nutrientes que ya son altos inicialmente. Los microorganismos tienen la capacidad de detectar problemas o necesidades del ambiente donde se desarrollan, de esta manera procuran un equilibrio de los nutrientes.

Los porcentajes de incremento no son muy altos, sin embargo, el bioinsumo logra incrementar los nutrientes. Conforme la concentración del bioinsumo el incremento de nutrientes es menor; sin embargo, existe un incremento aceptable para los requerimientos del cultivo.

Tabla 3.

Análisis de la materia orgánica en suelo antes (tomate) y después (azul) del tratamiento con el bioinsumo a diferentes dosis (1, 2 y 3) y concentraciones (1, 2 y 3).



La materia orgánica determina los distintos tipos de nutrientes del suelo, así como también las condiciones fisicoquímicas del propio suelo. En el trabajo de Huerta, Dios, & Nuncio, 2007, buscan el incremento de la fertilidad del suelo usando lombrices. Sus resultados se enfocan en incrementar el nitrógeno, fósforo y la materia orgánica. Al final de su proyecto la materia orgánica se mantuvo en un 5.5%; utilizando *Trichoderma* spp en el presente proyecto, el mejor tratamiento (D3C1) indica que se logró mantener la materia orgánica en un 5.6%.

La materia orgánica determina los distintos tipos de nutrientes del suelo, así como también las condiciones fisicoquímicas del propio suelo. En el trabajo de Huerta, Dios, & Nuncio, 2007, buscan el incremento de la fertilidad del suelo usando lombrices. Sus resultados se enfocan en incrementar el nitrógeno, fósforo y la materia orgánica.

Al final de su proyecto la materia orgánica se mantuvo en un 5.5%; utilizando *Trichoderma* spp en el presente proyecto, el mejor tratamiento (D3C1) indica que se logró mantener la materia orgánica en un 5.6%.

Durante mucho tiempo la agricultura se enfocó en la utilización de organismos como las lombrices para lograr un efecto fertilizante. Con los resultados de este trabajo se evidencia que no es necesaria la aplicación de lombrices, que resulta más laboriosa que la aplicación de bioinsumos en estado líquido, y se logran resultados similares e incluso minimamente superiores.

La variación de pH se muestra en la siguiente figura. Como se observa no se muestra mucha variación. En el suelo, el pH es un factor fundamental para la disponibilidad de nutrientes. Cuando el pH es bajo se favorecen ciertos nutrientes: potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca) y manganeso (Mn); por su parte, a pH alto, se afecta la absorción de iones fosfato y disponibilidad de hierro (Neyoy, 2012)

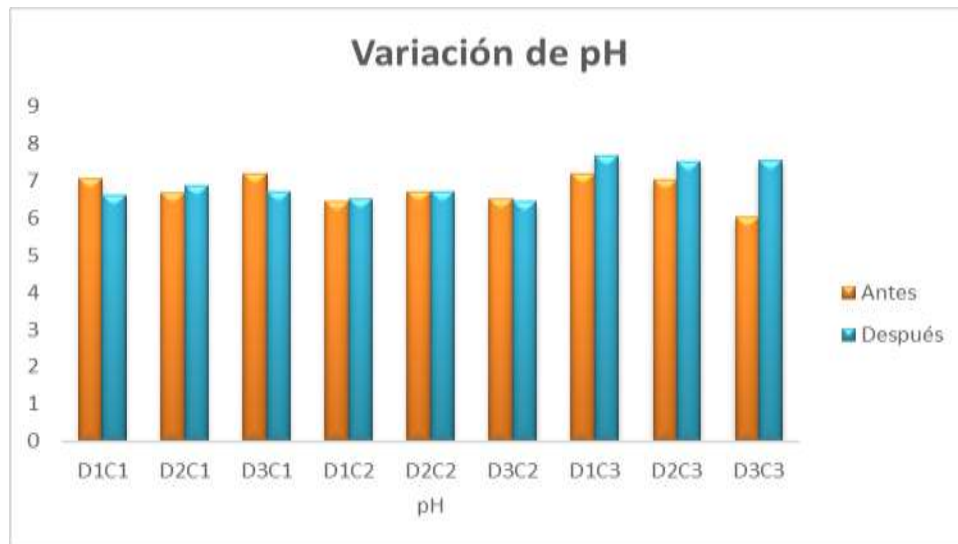


Figura 6. **D1C1:** volumen 1 (5ml) concentración 1, **D2C1:** volumen 2 (10ml) concentración 1, **D3C1:** dosis 3 (15ml) concentración 1, **D1C2:** volumen 1 (5ml) concentración 2, **D2C2:** volumen 2 (10ml) concentración 2, **D3C2:** volumen 3 (15ml) concentración 2, **D1C3:** volumen 1 (5ml) concentración 3, **D2C3:** volumen 2 (10ml) concentración 3, **D3C3:** volumen 3 (15ml) concentración 3.

La temperatura, la irradiación, aeración y la rizósfera son factores que afectan la disponibilidad de nutrientes. El suelo del cultivo en donde se realizó el proyecto era muy heterogéneo. Siendo las 18 camas del mismo lote de cultivo, el suelo de cada cama tenía inicialmente valores de nutrientes completamente diferentes. *Trichoderma* spp es un solubilizador de nutrientes (Brotman, y otros, 2013, p. 1-15), sin embargo, no puede solubilizar cantidades que pueden ser tóxicas para el suelo; es por esto que el incremento o decremento dependió de los valores iniciales. Al realizar las pruebas estadísticas para la variación de nutrientes, se evidenció que las tres concentraciones tienen efecto en la variación del nitrógeno (N), con un valor de P de 0.03, 0.02 y 0.04 respectivamente. Estos valores sustentan que las tres concentraciones influyeron en el incremento del nitrógeno del suelo.

En cuanto a calcio (Ca), estadísticamente, la concentración 2 tiene efecto en su incremento, con un valor de P de 0.006. El efecto de la concentración 3 se evidencia en el magnesio con un valor estadístico de P de 0.04. La concentración 1, estadísticamente tiene un efecto en el cobre (Cu), hierro (Fe) y materia orgánica (MO) con valores de P de 0.01, 0.01 y 0.03, respectivamente.

Los valores de P cuando son inferiores a 0.05, indican que existe un efecto de la variable en el resultado. El resto de nutrientes que no presentaron valores inferiores a 0.05, significa que la variación de nutrientes antes y después no es significativa. Por ejemplo, el azufre (S) en la concentración dos decreció y el valor para P fue de 0.27; lo que significa que la concentración no tiene efecto en esta variación. En el caso de fosforo (P), azufre (S), zinc (Zn), manganeso (Mn) y boro (B) no representaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las concentraciones. Los nueve tratamientos han presentado incremento de nutrientes, siendo el tratamiento tres el que tiene valores más aceptables. En la tabla 4 se encuentran los valores en porcentaje de todos los nutrientes ya sea su incremento o decremento.

Tabla 4.

Porcentajes de incremento de nutrientes con cada dosis y concentración. Se muestran los porcentajes de incremento de los nutrientes en cada tratamiento. **C**: concentración. **V**: volumen. En rojo se encuentran los valores en negativo. Estos nutrientes decrecieron. En negrita están los valores obtenidos con la concentración 1 a un volumen 3 (15ml); este tratamiento presenta los menores valores en rojo.

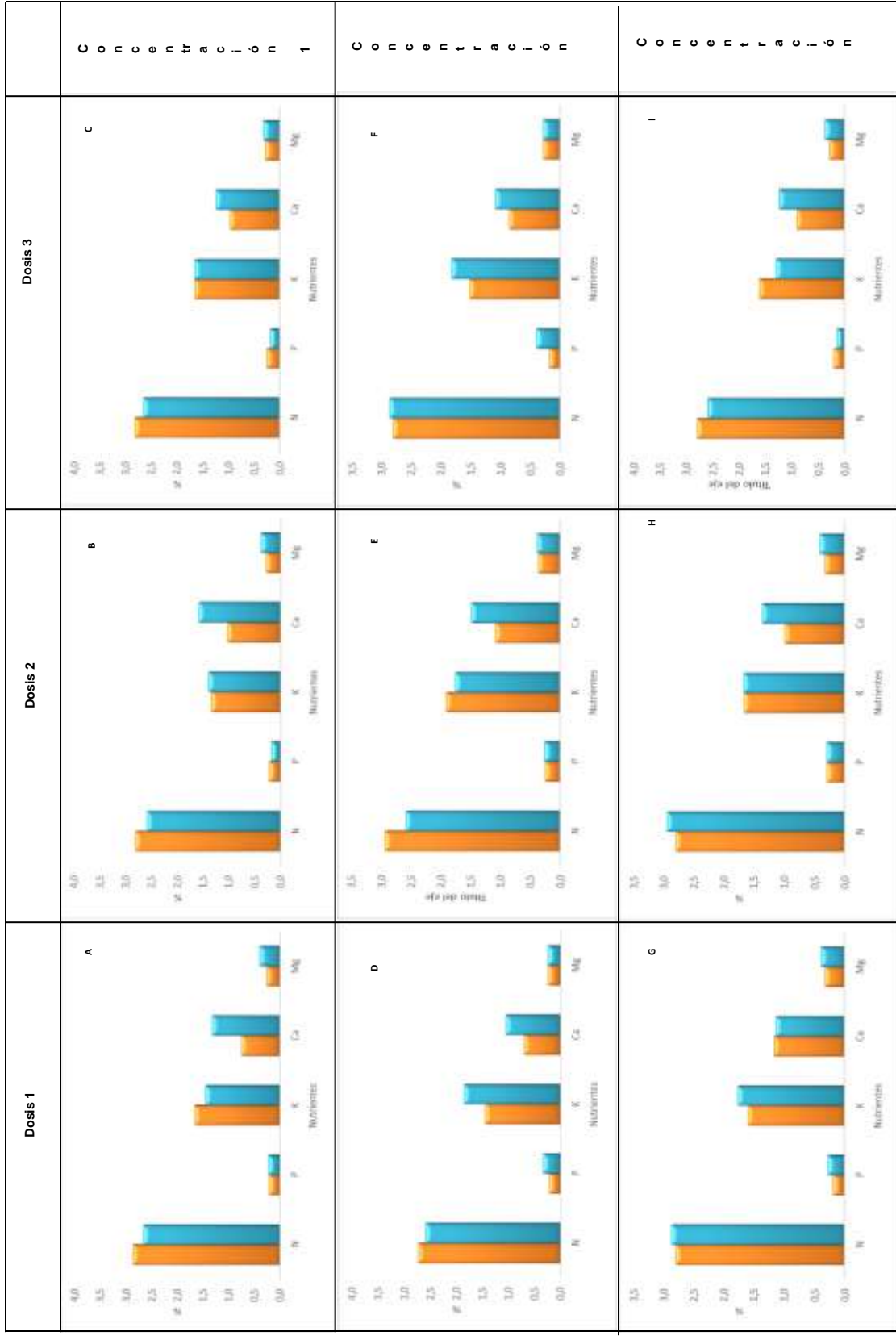
NUTRIENTES	C1			C2			C3			P
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	
NH4	45,8	88,5	38,4	31,1	38,6	21,4	-3,0	12,5	2,6	0.04
P	62,8	-1,4	136,2	31,4	31,6	1,8	28,8	-11,2	10,9	
S	55,4	-50,0	24,7	-32,9	-40,1	6,2	24,2	66,7	481,8	
ZN	119,2	35,0	465,7	106,2	47,5	-25,8	19,1	-35,1	-7,0	
CU	51,3	77,1	90,9	10,9	34,8	-24,2	8,2	57,1	-28,4	
FE	72,0	56,6	162,9	90,7	82,4	0,0	4,2	3,4	-46,9	
MN	123,3	38,9	347,4	58,7	91,5	43,8	86,8	66,0	29,5	
B	116,7	-36,4	20,0	-22,2	-15,4	50,0	11,1	0,0	66,7	
K	63,6	-10,0	123,1	-45,5	25,0	57,1	66,7	53,8	436,6	
CA	63,2	1,5	119,4	54,0	22,5	63,1	34,9	16,0	53,9	0.006
MG	35,5	-22,7	48,4	-3,4	2,2	-8,8	29,7	28,0	80,0	0.04
CA/MG	20,5	31,3	47,8	59,6	19,9	79,0	3,9	-9,4	-14,5	
MG/CA	-17,3	-14,1	-33,4	76,8	-18,4	-42,0	-22,1	-16,7	-66,5	
(CA+MG)/K	-3,2	7,9	-8,0	162,6	-4,2	-5,7	-19,7	-23,5	-70,7	
MO	83,9	51,4	194,7	104,0	76,7	30,4	46,4	8,8	21,4	0.03

4.3 Análisis de foliares.

El contenido nutricional de las hojas indica el estado nutricional de las plantas. Cuando se elabora un plan de producción agrícola se debe tomar en cuenta los nutrientes disponibles en el suelo y también los nutrientes que se encuentran en las hojas. De este modo poder evidenciar si existe una absorción de nutrientes por parte de las plantas. Cuando el suelo es rico en nutrientes, pero la planta no presenta valores aceptables de nutrientes en sus hojas, es muy probable que existan problemas con la conductividad eléctrica del suelo. Es por eso que el análisis de suelo y análisis de foliares van siempre de la mano. El cultivo se encontraba en condiciones climáticas óptimas, por lo que se descarta la demanda excesiva de nutrientes por las plantas, dejando abierta la posibilidad de que exista un problema con la conductividad del suelo. En el presente proyecto se evidenció un incremento de nutrientes en el suelo con la aplicación del bioinsumo desarrollado a base de *Trichoderma* spp. A continuación, se muestran los resultados de la variación de los nutrientes contenidos en las hojas. Cada gráfica muestra la variación de nutrientes en las hojas con respecto a cada tratamiento. La siguiente tabla contiene las variaciones de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) de cada tratamiento. Estos nutrientes son los más demandados por las plantas; forman parte de rutas metabólicas, son cofactores de enzimas, de procesos fundamentales para el óptimo desarrollo de las plantas (Haddad, Crutsinger, Gross, Haarstad, & Tilman, 2010, p. 43)

Tabla 5.

Análisis de nutrientes contenidos en foliares de plantas **antes (tomate) y después (azul) del tratamiento con el bioinsumo a diferentes dosis (1, 2 y 3) y concentraciones (1, 2 y 3)**. Los nutrientes evaluados fueron nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio. Los valores fueron reportados en porcentajes.



En el análisis de suelo correspondiente a la concentración 1 (1.98×10^9) a dosis 1 (5ml) (tabla 2, A) el nitrógeno incrementó; en el contenido de foliar el nitrógeno decreció; lo que significa que el nitrógeno que no fue asimilado por las hojas permanece en acumulado en el suelo. Por más contenido nutricional que posea el suelo, si la planta no requiere, no lo asimila. De esta manera se procura un equilibrio nutricional (Craine, y otros, 2009, p. 989). El calcio en el suelo se mantiene casi constante mientras que el contenido de calcio foliar incrementa más del 50%. El incremento de calcio en suelo no puede evidenciarse debido a que la asimilación por la planta fue mayor, existiendo una acumulación de este nutriente en las hojas. Por otra parte, el potasio se mantiene prácticamente constante en el suelo y en el contenido foliar. Entonces se puede inferir que existió un equilibrio de la relación suelo-planta. (Kabata-Pendias, 2004, p. 145)

Las plantas tienen una demanda nutricional diferente en cada estadio de crecimiento. Las plantas de este estudio estaban en la etapa juvenil, se encontraban dando su primera producción. Además, los requerimientos cambian cuando las condiciones climáticas del lugar de cultivo no son apropiadas. En la tabla 2B, se observa que los nutrientes que decrecieron fueron nitrógeno (N) y fósforo (P), con un 7% y 18%, respectivamente; mientras que el calcio (Ca) incrementó en un 53.4%, magnesio (Mg) en 31% y potasio (K) en un 3.7%. El análisis de suelo para este tratamiento indica una disminución de fósforo, lo cual también se evidencia en el contenido foliar. Como el fósforo (P) disminuyó en el suelo, se hizo menos disponible para la absorción por las plantas. Por otra parte, el magnesio (Mg) en el suelo disminuyó un 27% y en foliares aumentó un 31%. Se puede inferir que el magnesio (Mg) perdido en el suelo fue absorbido eficientemente por las plantas. Por otra parte, en la tabla 4C, se evidenció un incremento del calcio (Ca) del 28.8% y magnesio (Mg) en un 10.3%, mientras que el nitrógeno (N) y fósforo (P) decrecieron en un 5.7% y 27%, respectivamente. Por su parte el potasio se mantuvo constante.

Para el tratamiento con concentración 1 a volumen de 15ml (tabla 2C), todos los nutrientes del suelo incrementaron. El nitrógeno y el fósforo que no fueron acumulados en las hojas se mantienen presentes en el suelo, debido a que su incremento en el suelo superó el 100%. Según la revisión realizada por Craine, y otros, 2009; asevera que las concentraciones foliares de nitrógeno depende de las concentraciones foliares de fósforo. Es por eso que a nivel foliar nitrógeno y fósforo decrecieron.

La tabla 2D ilustra los resultados para el tratamiento con la concentración 2 (1.32×10^9) a volumen 1 (5ml). En este tratamiento el único elemento que se ve disminuido es el nitrógeno (N); reducido en un 5.1%. Magnesio (Mg) se mantiene constante. El incremento se evidencia en el fósforo (P), potasio (K) y calcio (Ca) en un 50%, 27.5% y 50%, respectivamente. El Calcio (Ca) y fósforo (P) presentes en el suelo aplicado con el tratamiento de concentración 2 a dosis 1 (tabla 2, 1D y 2D) incrementaron. Por su parte, estos elementos en el contenido foliar también han incrementado. Mientras que magnesio (Mg) en el suelo y en foliares se mantiene constante; esto permite inferir que en cuestión al magnesio (Mg) se mantuvo un equilibrio.

Los resultados obtenidos de la aplicación de la concentración 2 a volumen 2 (tabla 2E) se evidencia que nitrógeno (N) y potasio (P) decrecieron; nitrógeno en un 11.9% y potasio en un 8.3%. Al contrario, calcio (Ca) incrementó en un 36.7%. Magnesio (Mg) y fósforo (P) se mantuvieron constantes. Es muy importante la relación suelo-planta; es por eso que se relaciona el contenido de nutrientes en el suelo y el contenido foliar. Para el tratamiento de la concentración 2 a volumen 2 en el suelo (tabla 2, 1E y 2E) y en foliares (tabla 5E) el magnesio se mantiene constante. En cuanto al potasio (K) de foliares se observa que tuvo una disminución, pero en suelo éste aumenta. Lo que permite inferir que el potasio

faltante en foliares está almacenado en el suelo. El calcio en suelo y foliares incrementó.

En el tratamiento con concentración 2 a volumen 3 (tabla 2F) todos los nutrientes han incrementado, a excepción del magnesio (Mg) que se mantiene constante. Por su parte, a nivel del suelo también han incrementado los nutrientes, pero mínimamente. Este resultado permite concluir que conforme incrementan los nutrientes en el suelo, incrementan en el contenido foliar. A diferencia de los anteriores tratamientos, en éste, los nutrientes incrementaron en el suelo y en foliares. Al ser el terreno heterogéneo un factor que puede ser determinante en esta diferencia es la conductividad eléctrica del suelo. Para el tratamiento con concentración 3 a volumen 1, en el suelo y en foliares existió un incremento de todos los nutrientes a excepción de calcio (Ca) que en foliares tuvo un decrecimiento del 2.5%.

En el estudio de Han, Fang, Reich, Woodward, & Wang, 2011, analizaron las variaciones de 11 nutrientes en plantas en dependencia del suelo, gradientes climáticos y tipo de plantas. Entre todas las variedades vegetales, existen aquellas que sirven de alimento así como las que se consideran malezas. Por obvias razones, las plantas que son de alimento tienen una demanda mayor de nutrientes; estos nutrientes se almacenan en las partes de la planta que son para alimentación. La clasificación de tipos funcionales de plantas de Han, Fang, Reich, Woodward, & Wang, 2011, fue: hojas caducas, coníferas caducifolias, hojas perennes, hojas anchas, coníferas de hoja perenne y hierbas; siendo las hojas caducas las que presentan mayor incremento de nutrientes. Se puede inferir que se debe a que al ser hojas caducas necesitan más nutrientes para vivir un corto tiempo; por su parte las hojas perennes distribuyen sus requerimientos a lo largo de su vida; es decir, no tienen un metabolismo acelerado que demande más nutrientes.

La mora es un cultivo perenne. Y los resultados indican que al incrementar los nutrientes del suelo, incrementan los nutrientes en las hojas; lo que indica que la disponibilidad de nutrientes mediada por *Trichoderma* spp genera una mayor absorción por parte de las plantas.

La tabla 5H muestra las variaciones de los nutrientes a nivel foliar. En el cual se evidencia que el nitrógeno (N) incrementó un 5%, calcio (Ca) un 38.3%, magnesio (Mg) un 24% y potasio (K) un 0.5%- Fósforo (P) se mantuvo constante. A nivel de suelo, para este tratamiento, el fósforo (P) decreció; permitiendo inferir que al estar en menor disponibilidad en el suelo, la absorción de fósforo (P) por la planta se vio limitada. Además, el resto de nutrientes en el suelo también incrementaron.

Para el tratamiento con concentración 3 a volumen 3 (tabla 5I) el nitrógeno (N) disminuyó en un 7.5%, fósforo también disminuyó en un 28.5% al igual que potasio en un 19.7%. Adicional a esto, calcio (Ca) y magnesio (Mg) aumentaron en un 36% y 31%, respectivamente.

Según Ospina, 2012, el contenido foliar de nutrientes es dependiente de la materia orgánica. La materia orgánica analizada en cada tratamiento incrementó y como resultado, los nutrientes en el suelo y en las hojas también. Si bien es cierto, existen ciertos elementos que decrecieron. El punto que se considera más importante en este proyecto, es la heterogeneidad del cultivo problema. La fertilización con el bioinsumo desarrollado en el proyecto se evidencia; pero las variaciones se deben a que el estado inicial del suelo del cultivo no fue óptimo.

La fertirrigación constante del suelo, causó que *Trichoderma* spp no tenga una adaptación tan eficiente. Esto debido a que los fertilizantes comerciales no son direccionados a problemas específicos. En el cultivo no se realizó un análisis previo a la fertirrigación, por lo tanto no se tenía noción de cuales eran las deficiencias nutricionales del suelo, generando así una heterogeneidad de nutrientes en todo el terreno.

Los análisis estadísticos, manifiestan que no existió efecto de la concentración en los valores de los nutrientes a nivel foliar; a excepción del nitrógeno (N) que en la concentración 1, su valor de P fue de 0.008. En cuanto al calcio (Ca) la concentración 1 y 2 tuvieron un efecto en el resultado, con un valor de P de 0.003 y 0.02, respectivamente.

4.4 Condiciones físicas de las plantas objetivo

Las condiciones de las plantas objetivo se vieron mejoradas con la aplicación del bioinsumo. En las siguientes figuras se constatan un antes (izquierda) y un después (derecha) de cada tratamiento. Las personas encargadas del cultivo manejaron la enfermedad mediante una poda, esta no era lo suficientemente eficiente, debido a que los restos de material vegetal lo arrojaban al mismo suelo. Esto complicó el mejoramiento de las condiciones físicas, ya que el material vegetal era un foco de infección de *Verticillium* spp.





Tabla 6.

Condiciones de las plantas estudio antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento con cada concentración y dosis.

Tabla 6.

Condiciones de las plantas estudio antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento con cada concentración y dosis.

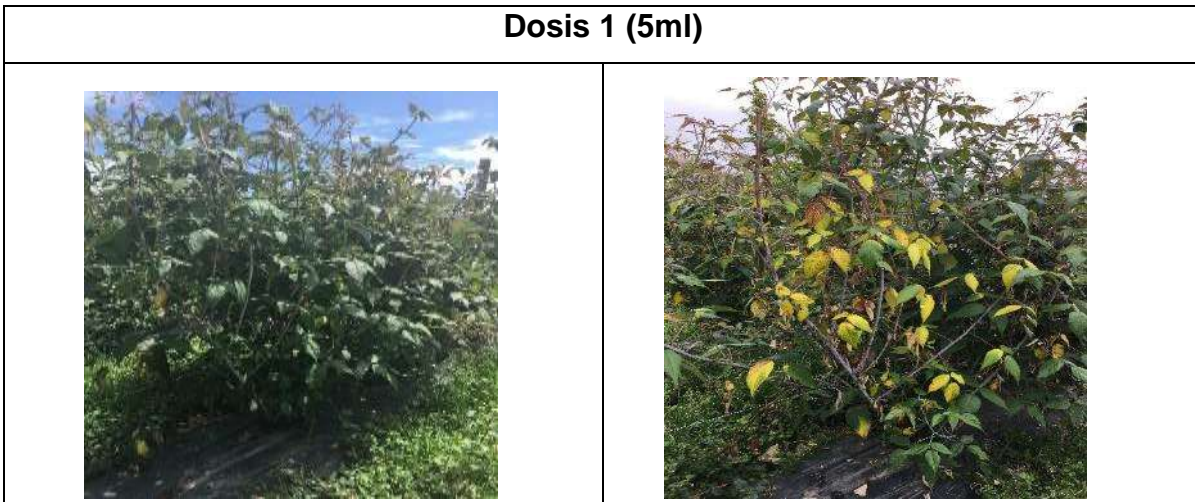
Concentración 1

Dosis 1 (5ml)	
	
Dosis 2 (10ml)	
	
Dosis 3 (15ml)	



Concentración 2

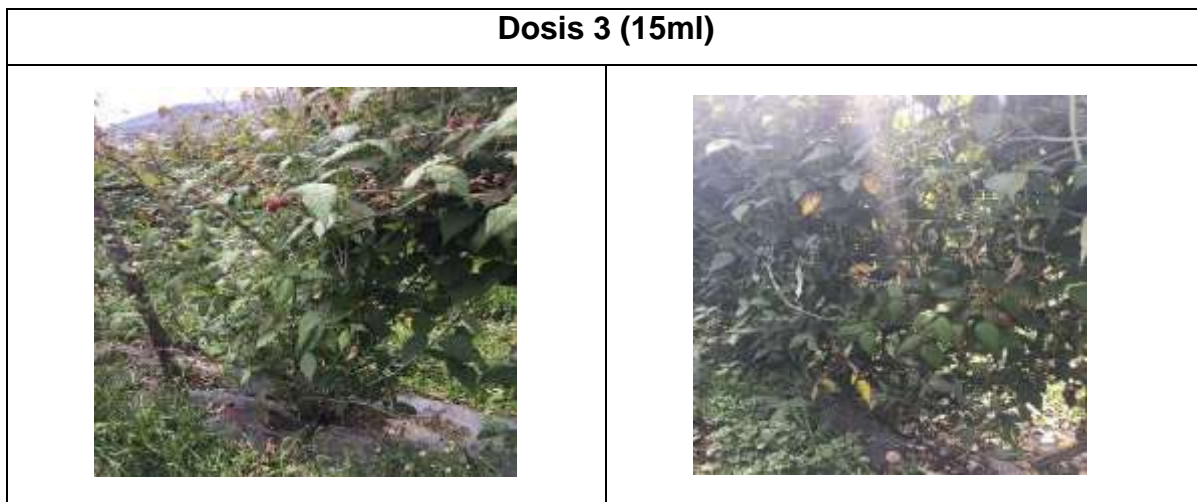
Dosis 1 (5ml)



Dosis 2 (10ml)



Dosis 3 (15ml)**Concentración 3****Dosis 1 (5ml)****Dosis 2 (10ml)**



Al ser el mecanismo de infección de *Verticillium* spp a través de los ases vasculares, es complicada la rehabilitación de las plantas una vez infectadas. Sin embargo, *Trichoderma* spp actúa micoparasitando a *Verticillium* spp en el suelo, de este modo se inhibe la infección y la planta se renueva naturalmente; es decir, se caen las partes enfermas y se generan nuevos tejidos. Como se observa en las figuras, el tratamiento siete, ocho y nueve presentas mejoras; sin embargo, aún se conservan hojas amarillas y la planta con poco volumen foliar.

4.5 Antagonismo *in vitro*

4.5.1 Micoparasitismo.

El micoparasitismo se evidenció de manera macro y micro. En la siguiente figura se muestra como *Trichoderma* spp creció en una placa poblada completamente por *Verticillium* spp. Esto sugirió que *Trichoderma* para poder sobrevivir parasitó a *Verticillium*, de esta forma obtuvo los nutrientes necesarios para su crecimiento.

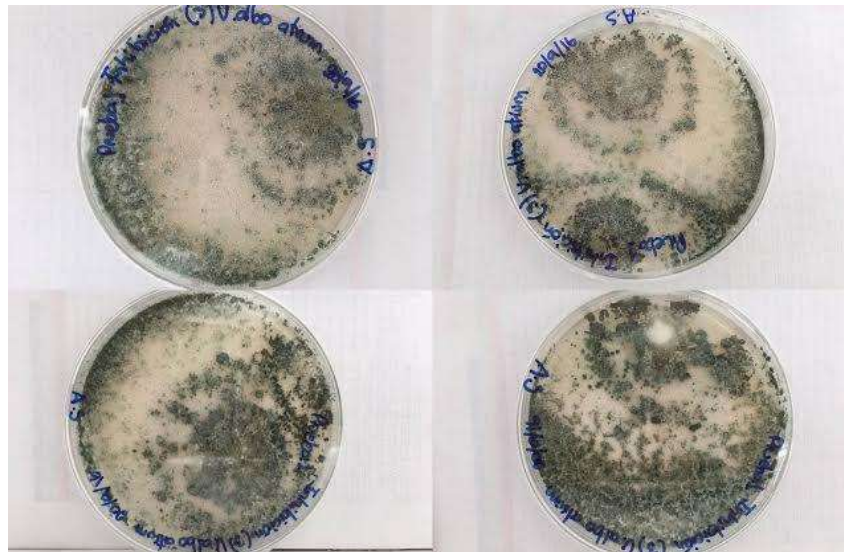


Figura 7. Micoparasitismo *in vitro*. *Trichoderma* spp se muestra de color verde, mientras *Verticillium* es de color blanco. En las imágenes se ven como *Trichoderma* se ha desarrollado encima de *Verticillium*.

A las cajas que tenían *Verticillium* spp crecido durante 15 días, se le consideraba un hongo viejo; pese a que *Verticillium* tenía ganado todo el medio de cultivo y todo el espacio, *Trichoderma* utilizó la capacidad de parasitar a *Verticillium* y poder sobrevivir.

Para constatar que efectivamente estaba ocurriendo parasitismo, se visualizó en microscopio a 400x. Las siguientes imágenes demuestran el micoparasitismo.

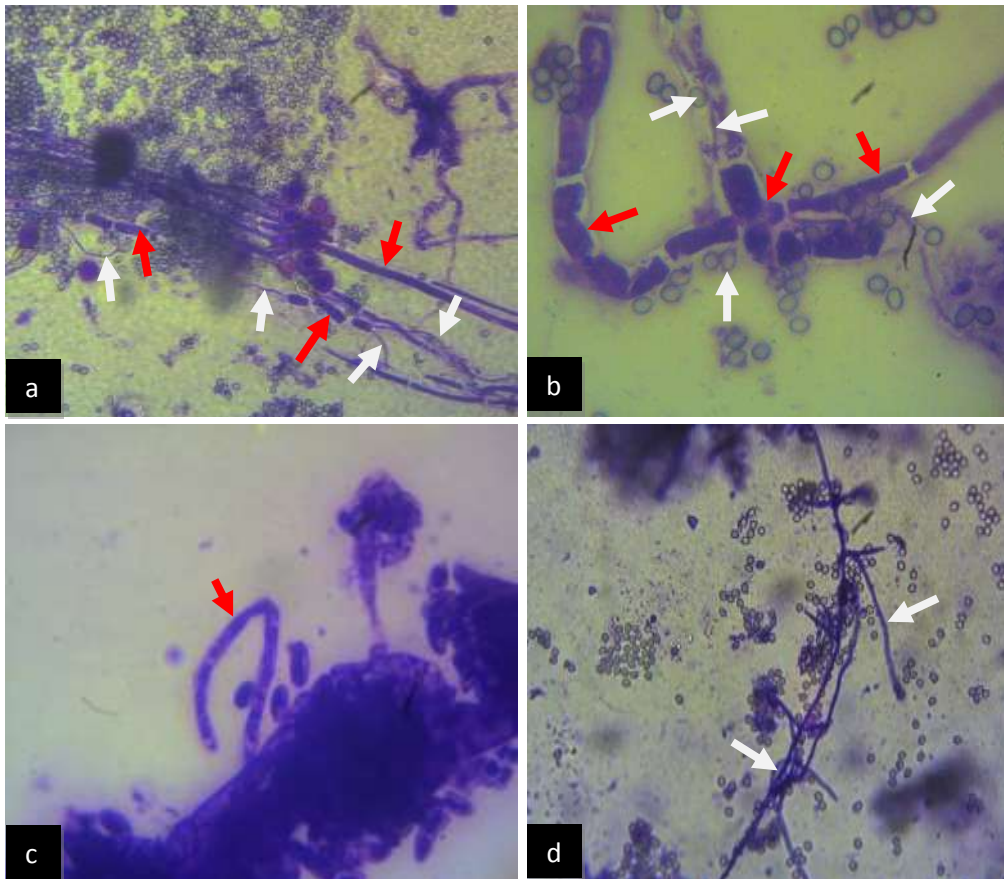


Figura 8. Micoparasitismo visto en microscopía.

a) A: se muestra como las hifas de *Trichoderma* spp penetran las hifas de *Verticillium* spp.

b) B: vista 1000X del micoparasitismo.

c) C: Se muestran las hifas y esporas de *Verticillium* spp; estas son gruesas y sus esporas ovaladas y anchas.

d) D: Las hifas de *Trichoderma* se muestran finas y las esporas cilíndricas. Las flechas de color rojo indican donde se encuentran las hifas de *Verticillium* spp y las

flechas blancas muestran a *Trichoderma* spp. Las hifas finas (*Trichoderma* spp) ingresan en las hifas gruesas (*Verticillium* spp), además se observa como las esporas de *Trichoderma* se mantienen junto a las hifas de *Verticillium* spp.

Las hifas de *Verticillium* son de un tamaño superior a *Trichoderma*, debido a que estas deben penetrar las raíces y germinar junto a las células del cilindro vascular (Klosterman, Atallah, Vallad, & Subbarao, 2009).

Las hifas de *Trichoderma* al ser más finas tienen mayor versatilidad para penetrar la pared celular de *Verticillium* spp. (C.R. Howell, 2013). En las imágenes 34A y 34B se evidencia como *Trichoderma* ha ingresado e incluso ha fragmentado las hifas de *Verticillium* spp.

Los resultados de este trabajo coinciden con los resultados de Saïd, 2012. En los cuales detallan los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp frente a plantas infectadas con enfermedades vasculares. En los dos proyectos se evidencia la producción masiva de esporas de *Trichoderma* spp. De este modo se garantiza una reproducción acelerada de *Trichoderma* spp controlando de mejor manera a *Verticillium* spp.

4.5.2 Competencia por nutrientes y espacio.

De las 44 cajas a las que se aplicó el bioinsumo de concentración 1, el mejor resultado fue la caja #38, con un porcentaje de inhibición del 83,3% y el porcentaje más bajo de 25% fue de la caja #19. La mediana obtenida de este grupo fue de 56.5. Para la concentración 2 se evaluaron 43 cajas, el porcentaje más alto fue del 70%, se obtuvo una mediana de 51 y la concentración 3 fue evaluada en 48 cajas, el mejor porcentaje fue de 70 y se obtuvo una mediana de 45.5.

El factor principal que afecta el porcentaje de inhibición es la temperatura. Se debe controlar los cambios de temperatura de la incubadora para evitar que los cambios bruscos afecten el crecimiento de cualquiera de los dos microorganismos.

No existen datos bibliográficos de estudios previos que evidencien el efecto antagonista de *Trichoderma* spp contra *Verticillium* spp. Se han realizado estudios para lograr entender los mecanismos de infección de *Verticillium* spp para un futuro desarrollar soluciones ante este patógeno tan invasivo.

Las grandes pérdidas causadas por *Verticillium* spp se han dado en plantaciones de algodón. En la investigación de Amyotte, 2012, se identificaron elementos genéticos llamados *transposones* que dotan a las especies de *Verticillium* variabilidad y diversificación; generándose así, especies difíciles de controlar.

Existen soluciones químicas para la presencia de *Verticillium* spp, estas son plaguicidas sistémicos. Un plaguicida sistémico es absorbido por hojas y raíces, además se moviliza por toda la planta; estas condiciones son muy importantes, ya que afecta la seguridad del alimento. Pese al peligro de su mecanismo de acción, se utiliza contra *Verticillium* porque mata al hongo que ha ingresado a los ases vasculares. Los principales plaguicidas tienen como principio activo: Benomil, Cimoxanil, famoxadone, Mancozeb, Dimetamorf y Fosetil aluminio. (FAO, 2012)

Evidentemente, *Trichoderma* spp es más competitivo que *Verticillium* spp por espacio y nutrientes. En las siguientes figuras se evidencia *in vitro* como actúa *Trichoderma* spp.

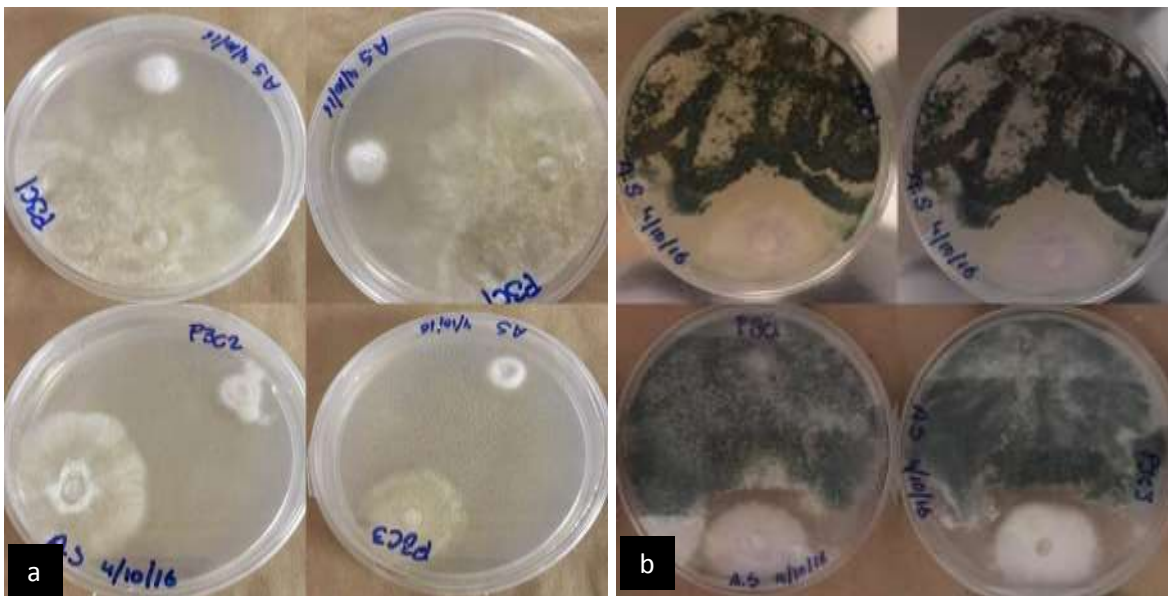


Figura 9. Competencia por espacio y nutrientes *in vitro*.

a): Enfrentamiento de *Trichoderma* spp contra *Verticillium* spp pasadas 48 horas de incubación. Se evidencia como *Trichoderma* spp gana espacio más rápidamente que *Verticillium* spp.

b): Enfrentamiento después de siete días de incubación; *Trichoderma* spp ha ganado casi por completo espacio y nutrientes.

Se han estudiado las actividades antagonistas de *Trichoderma* spp contra *Fusarium oxysporum* (El-Hassan, Gowen, & Pembroke, 2012), *Botrytis cinérea* (Peng & Sutton, 2009), *Meloidogyne javanica* (nematodo) (Al-Shammari, Bahkali, Elgorban, Elkahky, & Al-Sum, 2013) y *Collectotrichum acutatum* (Freeman, y otros, 2004); todos los resultados son positivos y coinciden con los resultados *in vitro* de este proyecto; es decir, *Trichoderma* spp tiene igual efecto antagonista contra *Verticillium* spp. La prueba de inhibición de crecimiento por competencia de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum* realizada por Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013 indica un porcentaje de inhibición del 53%. En este proyecto, el mejor porcentaje de inhibición fue de 55.7% obtenido con la aplicación de la

concentración 1. Se puede inferir en que *Trichoderma* spp mantiene su efecto inhibitorio ante cualquier patógeno.

Los porcentajes de inhibición de crecimiento obtenidos en la prueba de competencia por nutrientes y espacio, fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, obteniendo una significancia de 0.000. Con lo cual se puede inferir que existe efecto en la concentración del bioinsumo.

4.5.3 Producción de metabolitos por *Trichoderma* spp.

Los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp inhiben el crecimiento de patógenos. *Verticillium* spp fue sensible a estos metabolitos y su inhibición se observa en el anexo 19.

Las siguientes figuras muestran el resultado *in vitro* de la inhibición por producción de metabolitos.

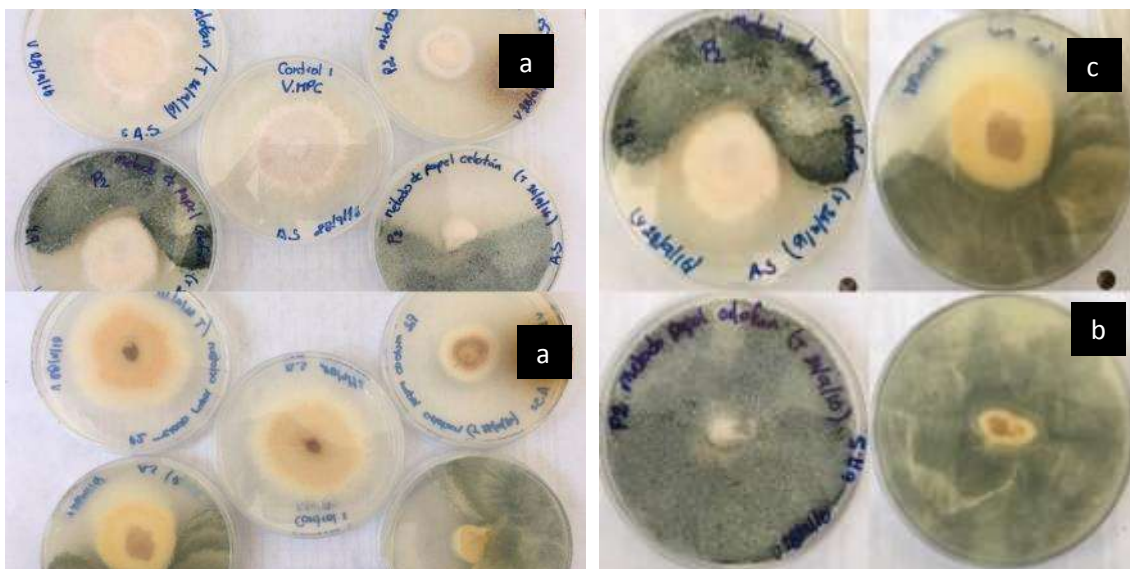


Figura 10. Producción de metabolitos volátiles.

a): La caja del centro indica el crecimiento de *Verticillium* spp sin metabolitos de *Trichoderma* spp; las cajas laterales muestran la disminución de crecimiento de *Verticillium* spp.

b): la producción de metabolitos de la concentración 1 disminuye por completo el crecimiento de *Verticillium* spp. **C:** inhibición de crecimiento por la concentración 2; no es tan evidente, pero tiene una inhibición de aproximadamente 30%

El mejor porcentaje de inhibición fue de 71.5%. En cambio, la publicación de Aceves, y otros, 2008 reporta un porcentaje de inhibición de 62.9%; esta publicación no contempla concentraciones de *Trichoderma* spp. De las tres concentraciones analizadas en esta prueba resultó la mas optima la concentración uno, con una mediana de 80.

La prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis generó un valor de significancia de 0.000. Al igual que la prueba por competencia, las concentraciones tienen efecto en el resultado.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones.

La variación de los nutrientes en el suelo indica que *Trichoderma* spp tiene la capacidad de actuar como biofertilizante. Además, el aumento de nutrientes en el contenido foliar manifiesta que mejora la absorción de nutrientes por la planta.

Los distintos mecanismos de biocontrol empleados por *Trichoderma* spp tienen un efecto contra *Verticillium* spp. El mejor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Verticillium* spp se evidenció en la prueba que evalúa la producción de metabolitos por parte de *Trichoderma* spp. Además, el mecanismo simultaneo de antagonismo es micoparasitar a *Verticillium* spp.

Se establece que en campo e *in vitro*, la concentración y la dosis que genera mejor actividad antagónica es 1.98×10^9 a dosis de 15ml por planta. Las condiciones físicas de las plantas se mejoran y los nutrientes incrementan a esta dosis y concentración.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el bioinsumo desarrollado a base de *Trichoderma* spp tiene efecto fertilizante, además de controlar la enfermedad causada por *Verticillium* spp en cultivos de mora (*Rubus glaucus*). Este proyecto es el hincapié para futuras investigaciones más específicas y para el desarrollo a gran escala de un bioinsumo que solucione los problemas de la agricultura moderna.

5.2 Recomendaciones.

Para poder evidenciar un incremento de nutrientes de manera más clara y consistente, se recomienda evaluar el efecto aplicando en campo el bioinsumo más de tres meses.

Cuando se esté generando el plan de producción agrícola, se recomienda que se evalúe la presencia de *Trichoderma* spp en el suelo antes de empezar la siembra. Esto asegurara que los patógenos o plagas no se desarrollen. *Trichoderma* spp debe estar en el suelo primero que los patógenos.

En base a los conocimientos obtenidos durante la realización de este proyecto experimental, se recomienda tener un suelo homogéneo. Que exista una óptima distribución de nutrientes por todo el suelo y así realizar un análisis de suelo previo a la siembra de cualquier cultivo. De esta manera se podrá conocer las deficiencias nutricionales y poder tratarlas específicamente. Cuando se detecten plantas enfermas, se recomienda descartarlas. Si se opta por podar las partes afectadas, preferentemente quemar ese material vegetal y evitar la propagación en suelo del patógeno.

Referencias

- Aceves, A. C., Sánchez, M. A., Pascacio, L. Y., Flores, R. A., Barrios, A., & Rebolledo, A. (2008). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Mexican Journal of Phytopathology*.
- Al-Shammari, T., Bahkali, A., Elgorban, A. M., Elkahky, M., & Al-Sum, B. (2013). The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. *Journal of pure and applied microbiology*.
- Amyotte, S. G., Tan, X., Pennerman, K., Jimenez, M. d., Klosterman, S., Ma, L.-J., . . . Veronese, P. (2012). Transposable elements in phytopathogenic *Verticillium* spp.: insights into genome evolution and inter- and intra- specific diversification. *BMC Genomics*.
- Argumedo, R., Alarcon, A., Ferrera, R., & Peña, J. J. (2009). El genero fungico *Trichoderma* y su relacion con contaminantes organicos e inorganicos. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. Washington D.C: CRC Press.
- Benitez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*.
- Bernal, J., & Franco, G. (2008). *Tecnología para la producción de frutales de clima frío moderado. Manual Técnico*. Santander: Colombia.
- BMC Biology. (2012). What is a pathogen? A question that begs the point. *Biomedcentral*.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros, A., Takayuki, T., Fernie, A., Chet, I., . . . Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-Plant Root Colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLOS*.

- C.R. Howell. (2013). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant disease*.
- Craine, J. M., Elmore, A. J., Aida, M. P., Bustamante, M., Dawson, T. E., Hobbie, E. A., . . . Reich, P. B. (2009). Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. *New pathologist*.
- Crosara, A. (2012). *El suelo y los problemas ambientales*. Recuperado el 22 de enero de 2015, de Universidad de la Republica: <http://edafologia.fcien.edu.uy/archivos/Suelos%20y%20problemas%20ambientales.pdf>
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species – groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. *Transaction of the British Mycological Society*.
- Dutta, S. (2015). Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*.
- El-Hassan, S. A., Gowen, S., & Pembroke, B. (2012). Use of *Trichoderma hamatum* for biocontrol of lentil vascular wilt disease: efficacy, mechanisms of interaction and future prospects. *Journal of Plant Protection Research*.
- Espinoza, A., Martinez, L., Rivera, R., & Espinoza, E. (2015). Efecto del nitrógeno y hongos micorrizicos arbusculares en dos clones comerciales de bionato sobre un suelo pardo mullido carbonatado. *Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales*.
- FAO. (2009). *Micro-organisms and invertebrates*. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Recuperado el 16 de octubre de 2016, de <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cgrfa-home/en/>
- FAO. (2012). *Listado de plaguicidas usados para el control de enfermedades y desórdenes nutricionales vegetales*. Roma: FAO. Recuperado el 16 de octubre de 2016, de <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cgrfa-home/en/>
- Fertilab. (2012). *Manual de muestreo de suelo, planta y agua*. Guanajuato: Mexico.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., & Maymon, M. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*.

- Grijalba, C. M., Calderón, L. A., & Pérez, M. M. (2010). Rendimiento y calidad de la fruta en mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), con y sin espinas, cultivada en campo abierto en Cajicá (Cundinamarca-Colombia). *Universidad Militar Nueva de Granada*.
- Haddad, N. M., Crutsinger, G. M., Gross, K., Haarstad, J., & Tilman, D. (2010). Plant diversity and the stability of foodwebs. *Ecology letters*.
- Han, W. X., Fang, J. Y., Reich, P. B., Woodward, F. I., & Wang, Z. H. (2011). Biogeography and variability of eleven mineral elements in plant leaves across gradients of climate, soil and plant functional type in China. *Ecology Letters*.
- Hasan, S., Gupta, G., & Anand, S. (2013). Biopotential of microbial antagonists against soilborne fungal plant pathogens. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology (IJAFST)*.
- hasan, S., Gupta, G., Anand, S., & Chaturvedi, A. (2013). Biopotencial of microbial antagonists against soilborne fungal plant pathogens. *IJAFST*.
- Hasan, S., Gupta, G., Anand, S., & Chaturvedi, A. (2013). Biopotencial of microbial antagonists against soilborne fungal plant pathogens. *IJAFST*.
- Huerta, E., Dios, D. d., & Nuncio, G. (2007). Incremento de la fertilidad del suelo mediante el uso de lombrices de tierra (*Glossoscolecidae* y *Acanthodrilidae*) y leguminosas (*Arachis pintoi*) en un suelo de traspatio. *Ciencia ergo sum*.
- ICTF. (1 de Enero de 2016). *Taxonomy of fungi*. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de: <http://www.fungaltaxonomy.org/>
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2009). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLOS ONE*.
- K. T. Leath, K. E. (1973). Increased Yield and Persistence of Red Clover after a Soil Drench Application of Benomyl. *American Society of Agronomy*.
- Kabata-Pendias, A. (2004). Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. *Goderma*.
- Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., & Rezaee, S. (2013). Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal

antagonists for antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. *Elsevier*.

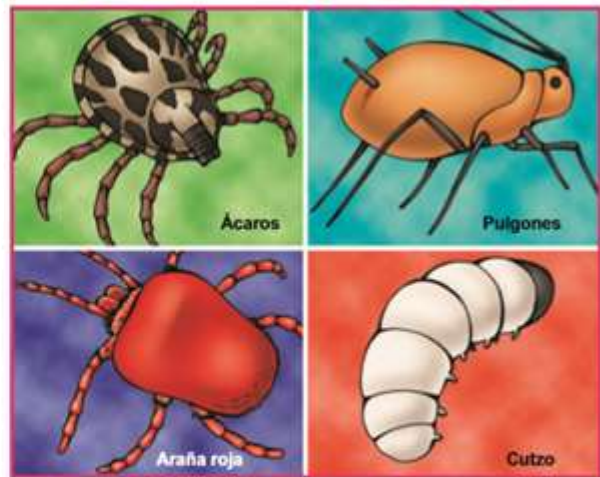
- Ke-wei, P. (2010). Review on Biocontrol Research with Trichoderma. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*.
- Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2009). Diversity, Pathogenicity and Management of Verticillium species. *Annual Review of Phytopathology*.
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfología y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*.
- Lopez, J., & Gómez, R. (2008). *Tecnología para la producción de frutales de clima frío moderado. Manual Técnico*. Santander: Colombia.
- MAGAP. (2013). *La mora de castilla*. Quito: MAGAP.
- Martinez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). Trichoderma spp y su funcion en el control de plagas en los cultivos. *Proteccion vegetal*.
- Molla, A. H., Haque, M., Haque, M. A., & Ilias, G. N. (2012). Trichoderma-Enriched Biofertilizer Enhances Production and Nutritional Quality of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Minimizes NPK Fertilizer Use. *Agricultural Research*.
- Neyoy, C. (2012). Principales factores que afectan la absorción de nutrientes en las plantas. *Fisiología Vegetal*.
- Ospina, M. I. (2012). *Algunas consideraciones para la nutricion del cultivo de mora*. Montevideo: Barpen.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). *Biological Control of Plant Pathogens*. Recuperado el 22 de enero de 2015, de APSnet: <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI-biologicalControl.pdf>
- Peng, G., & Sutton, J. C. (2009). Evaluation of microorganisms for biocontrol of Botrytis cinerea in strawberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*.
- Rubin, A. E., Galperin, M., Ploch, S., Runge, F., & Thines, M. (2014). Seed Transmission of Pseudoperonospora cubensis. *PLOS one*.

- Souza, V. R., Pereira, P. A., Silva, T. L., Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*.
- Sundaramoorthy, S., & Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp against wilt of tomate caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology y Biotechnology*.
- Sundaramoorthy, S., & Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* . *Applied Biology & Biotechnology*.
- Teng, Y., Wu, J., Lu, S., Wang, Y., Jiao, X., & Song, L. (2014). Soil and soil environmental quality monitoring in China: A review. *Environmental International*.
- Travis DeSavigny. (2000). *Verticillium albo-atrum*. *North Carolina State University*. Recuperado el 16 de octubre del 2016, de: https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/alboatrum/Verticillium_albo-atrum.html
- Troya, C., & Vaca, L. (2014). *Protocolo para la producción de cepas nativas de Trichoderma spp en laboratorios artesanales*. Quito: MAGAP.

ANEXOS



Anexo 1. Proceso de obtención de estacas para la siembra de mora.
Tomado de (MAGAP, 2013)



Anexo 2. Patógenos que causan principales afectaciones en el cultivo de mora.
Tomado de (MAGAP, 2013)



Anexo 3. *Trichoderma spp* creciendo en una caja petri en medio PDA. El color verde es característica de este microorganismo.



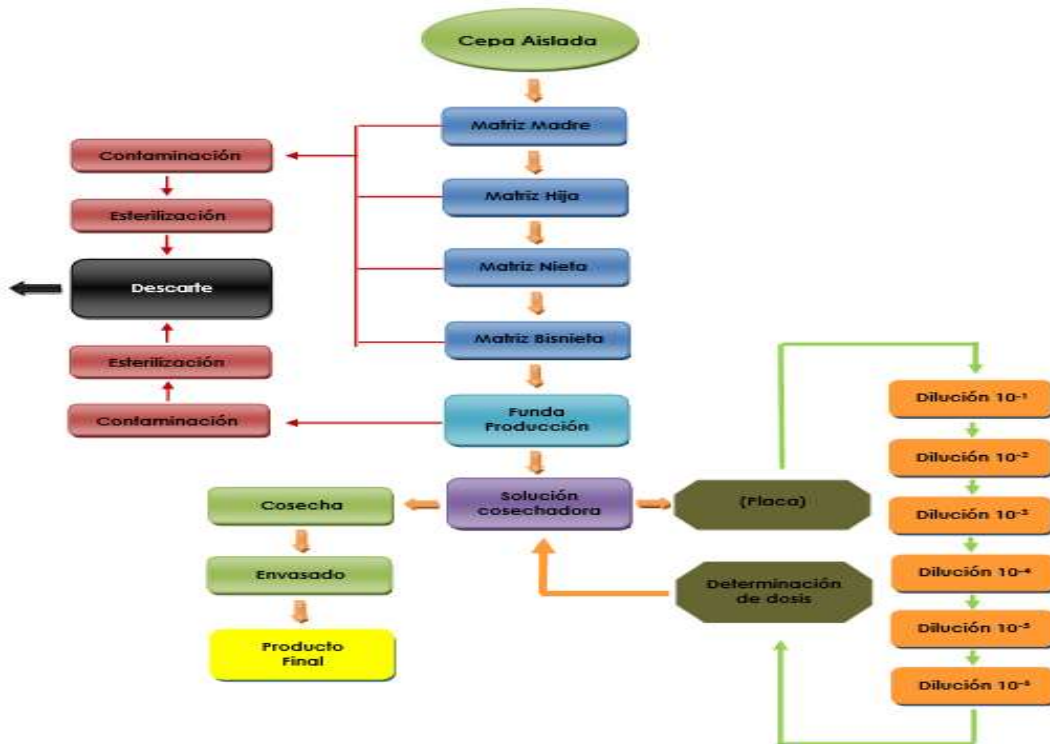
Anexo 4. Micorrizas presentes en el suelo.



Anexo 5. Hifa de *Trichoderma spp* septada.



Anexo 6. Diferentes especies de *Verticillium spp.*



Anexo 7. Diagrama de flujo elaborado por Troya y Vaca, 2014, para la producción de *Trichoderma spp* en laboratorios del MAGAP
Tomado de Troya & Vaca, 2014, p. 20



Anexo 8. Almacenamiento de muestras en fundas plásticas ziploc.



Anexo 9. Cultivo de las 3 concentraciones del bioinsumo. **A:** concentración 1. **B:** concentración 2 y **C:** concentración 3.



Anexo 10. Cortes de tallo infectado con *Verticillium* spp.



Anexo 11. Desinfección de tallos en solución de hipoclorito de sodio al 1.5%.



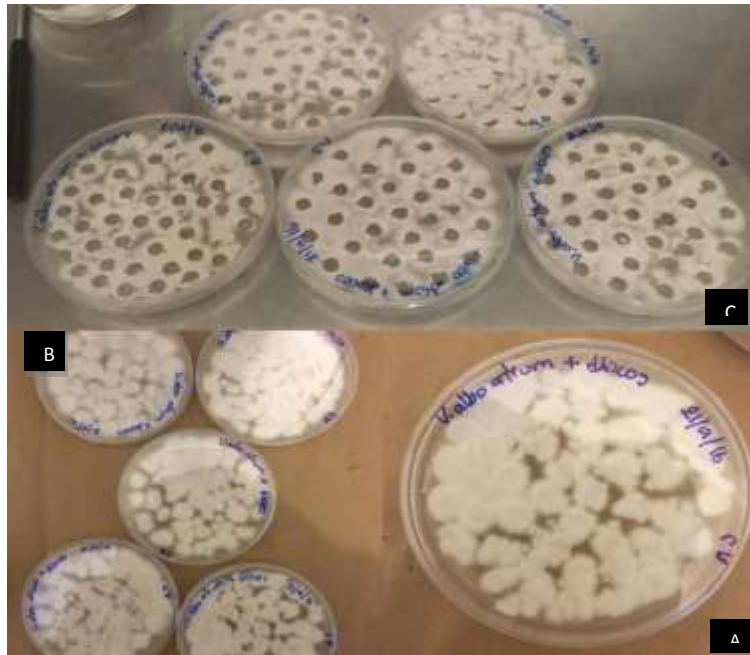
Anexo 12. Tallos cultivados. Se muestra crecimiento de *Verticillium* spp.



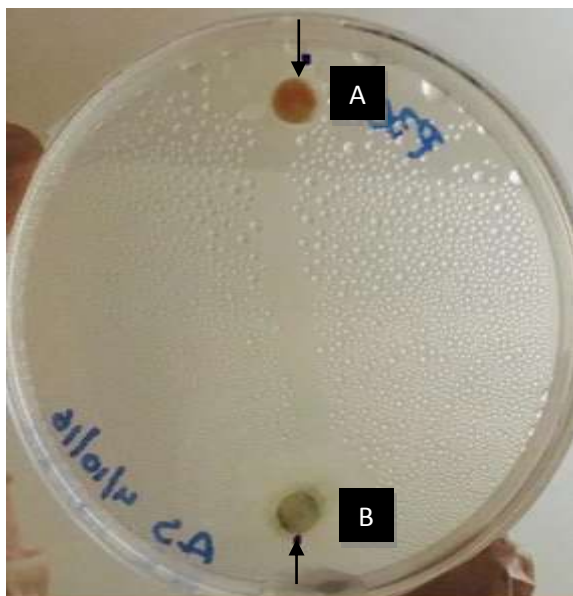
Anexo 13. Caja completamente poblada de *Verticillium* spp.



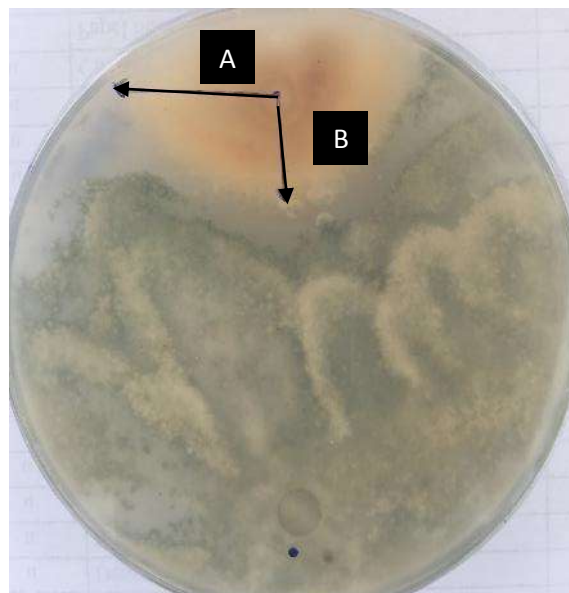
Anexo 14. Prueba de micoparasitismo. **A:** disco empapado con bioinsumo. **B:** colocación de disco en la caja poblada por *Verticillium* spp.



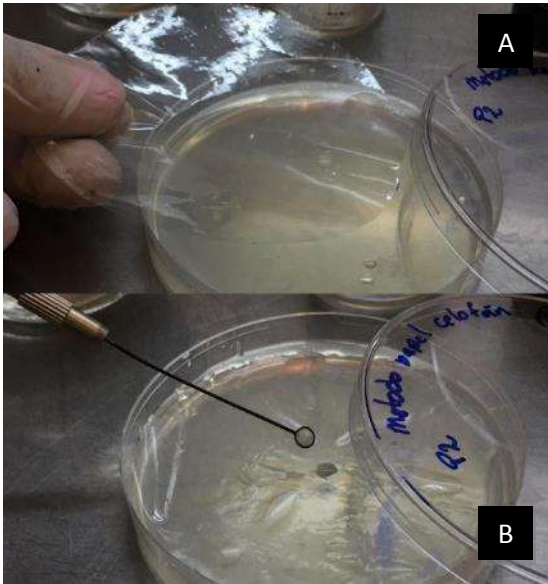
Anexo 15. A y B: Cultivo de *Verticillium* spp en discos empapados con agar PDA. **C:** cajas luego de haber utilizado los discos con inoculo de *Verticillium* spp.



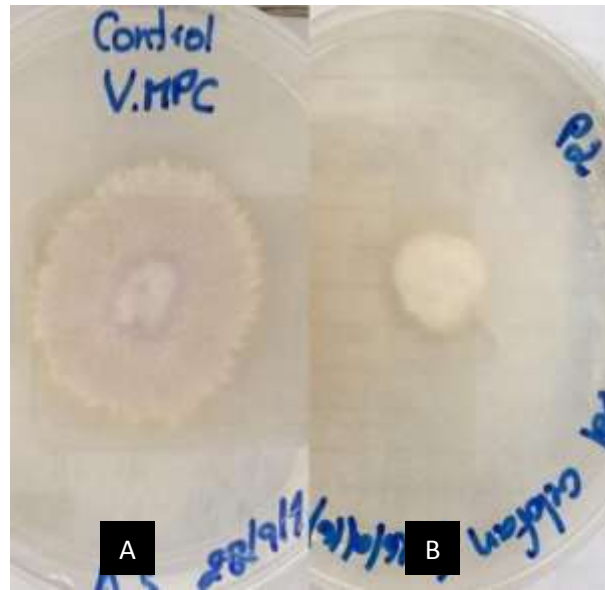
Anexo 16. A: Disco con *Verticillium* spp. **B:** Disco empapado con bioinsumo. Las flechas indican la distancia de 1cm desde el borde de la caja.



Anexo 17. A: radio de crecimiento menos expuesto al antagonista. **B:** radio de crecimiento expuesto directamente al antagonista.



Anexo 18. Prueba de producción de metabolitos. **A:** disco de papel celofán colocado en el centro de la caja Petri con agar PDA. **B:** bioinsumo colocado con un asa de disco; aproximadamente una gota en el centro del papel celofán.



Anexo 19. Crecimiento de *Verticillium* spp en cajas donde se realizó la prueba del papel celofán. **A:** crecimiento de *Verticillium* spp sin papel celofán. **B:** crecimiento de *Verticillium* luego de retirar el papel celofán.



Anexo 20. Bioinsumo final. Tres concentraciones diferentes.

Anexo 21. Análisis de suelo pre-tratamiento. En la primera columna izquierda se encuentra la identificación de cada muestra, ordenadas ascendentemente; **D:** dosis, **C:** concentración. Se analizaron pH, amonio (NH₄), fosforo (P), azufre (S), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mg), boro (B), materia orgánica (MO) y las relaciones entre elementos: Ca/Mg, Mg/K, Ca+Mg/K. Las letras que acompañan a cada valor son: **A:** alto, **M:** medio, **B:** bajo, **PN:** prácticamente neutro, **LAC:** ligeramente ácido.

Identificación del Lote	pH	ppm				meq/100ml				ppm				Mg		Ca		Ca+Mg	
		NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B	Mg		Ca		Ca+Mg		
													M.O.	M.O.	K	K	K	K	
ID 1C	7,07 PN	59,00 M	172,00 A	65,00 A	1,10 A	15,20 A	3,10 A	7,3 A	15,6 A	107,0 A	6,0 M	0,60 B	4,90	2,82	4,90	2,82	16,64	16,64	
2D 1C	6,69 PN	52,00 M	285,00 A	82,00 A	1,00 A	20,10 A	4,40 A	14,0 A	13,1 A	136,0 A	7,2 M	1,10 M	4,57	4,40	4,57	4,40	24,50	24,50	
3D 1C	7,19 PN	73,00 A	152,00 A	89,00 A	1,30 A	12,40 A	3,10 A	3,5 M	7,7 A	70,0 A	3,8 B	1,00 M	4,00	2,38	4,00	2,38	11,92	11,92	
ID 2C	6,45LAc	74,00 A	226,00 A	82,00 A	1,10 A	12,60 A	2,90 A	9,7 A	20,2 A	118,0 A	6,3 M	0,90 B	4,34	2,64	4,34	2,64	14,09	14,09	
2D 2C	6,70 PN	83,00 A	253,00 A	142,00 A	2,40 A	28,00 A	4,50 A	12,0 A	9,2 A	136,0 A	9,4 M	1,30 M	6,22	1,88	6,22	1,88	13,54	13,54	
3D 2C	6,52 PN	84,00 A	284,00 A	65,00 A	0,70 A	13,00 A	3,40 A	15,9 A	18,6 A	212,0 A	8,0 M	0,40 B	3,82	4,86	3,82	4,86	23,43	23,43	
ID 3C	7,20 PN	67,00 A	243,00 A	62,00 A	1,20 A	15,20 A	3,70 A	11,0 A	8,5 A	119,0 A	6,8 M	0,90 B	4,11	3,08	4,11	3,08	15,75	15,75	
2D 3C	7,04 PN	80,00 A	242,00 A	39,00 A	1,30 A	14,40 A	2,50 A	11,1 A	7,7 A	116,0 A	5,3 M	0,80 B	5,76	1,92	5,76	1,92	13,00	13,00	
3D 3C	6,03LAc	77,00 A	221,00 A	11,00 M	0,41 A	12,80 A	2,00 M	8,6 A	13,4 A	196,0 A	7,8 M	0,60 B	6,40	4,88	6,40	4,88	36,10	36,10	

Anexo 22. Análisis de suelo post-tratamiento. En la primera columna izquierda se encuentra la identificación de cada muestra, ordenadas ascendentemente; **D:** dosis, **C:** concentración. Se analizaron pH, amonio (NH₄), fosforo (P), azufre (S), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mg), boro (B), materia orgánica (MO) y las relaciones entre elementos: Ca/Mg, Mg/K, Ca+Mg/K. Las letras que acompañan a cada valor son: **A:** alto, **M:** medio, **B:** bajo, **PN:** prácticamente neutro, **LAC:** ligeramente ácido.

Identificación del Lote	pH	ppm				meq/100ml				ppm				Mg		Ca		Ca+Mg	
		NH ₄	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B	Mg		Ca		Ca+Mg		
													M.O.	M.O.	K	K	K	K	
ID 1C	6,63 PN	86,00 A	280,00 A	101,00 A	1,80 A	24,80 A	4,20 A	16,0 A	23,6 A	184,0 A	13,4 M	1,30 M	5,90	2,33	5,90	2,33	16,11	16,11	
2D 1C	6,87 PN	98,00 A	281,00 A	41,00 A	0,90 A	20,40 A	3,40 A	18,9 A	23,2 A	213,0 A	10,0 M	0,70 B	6,00	3,78	6,00	3,78	26,44	26,44	
3D 1C	6,72 PN	101,00 A	359,00 A	111,00 A	2,90 A	27,20 A	4,60 A	19,8 A	14,7 A	184,0 A	17,0 A	1,20 M	5,91	1,59	5,91	1,59	10,97	10,97	
ID 2C	6,53 PN	97,00 A	297,00 A	55,00 A	0,60 A	19,40 A	2,80 A	20,0 A	22,4 A	225,0 A	10,0 M	0,70 B	6,93	4,67	6,93	4,67	37,00	37,00	
2D 2C	6,70 PN	115,00 A	333,00 A	85,00 A	3,00 A	34,30 A	4,60 A	17,7 A	12,4 A	248,0 A	18,0 A	1,10 M	7,46	1,53	7,46	1,53	12,97	12,97	
3D 2C	6,45LAc	102,00 A	289,00 A	69,00 A	1,10 A	21,20 A	3,10 A	11,8 A	14,1 A	212,0 A	11,5 M	0,60 B	6,84	2,82	6,84	2,82	22,09	22,09	
ID 3C	7,69LAI	65,00 A	313,00 A	77,00 A	2,00 A	20,50 A	4,80 A	13,1 A	9,2 A	124,0 A	12,7 M	1,00 M	4,27	2,40	4,27	2,40	12,65	12,65	
2D 3C	7,53LAI	90,00 A	215,00 A	65,00 A	2,00 A	16,70 A	3,20 A	7,2 A	12,1 A	120,0 A	8,8 M	0,80 B	5,22	1,60	5,22	1,60	9,95	9,95	
3D 3C	7,57LAI	79,00 A	245,00 A	64,00 A	2,20 A	19,70 A	3,60 A	8,0 A	9,6 A	104,0 A	10,1 M	1,00 M	5,47	1,64	5,47	1,64	10,59	10,59	

Anexo 23. Análisis de foliares pre-tratamiento. En la primera columna izquierda se encuentra la identificación de cada muestra, ordenadas ascendentemente; **D:** dosis, **C:** concentración. Se analizaron los siguientes nutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg).

N° Muestr. Laborat.	Identificación del Lote	Nitrógeno (N)					Fósforo (P)					Potasio (K)					Calcio (Ca)					Magnesio (Mg)																								
		N					P					K					Ca					Mg																								
28687	1D [3C]	2,80	0,19	1,61	1,17	0,33	2,80	0,26	1,67	0,99	0,33	2,80	0,21	1,62	0,91	0,29	2,73	0,22	1,45	0,70	0,24	2,94	0,25	1,92	1,09	0,37	2,81	0,19	1,52	0,86	0,29	2,87	0,22	1,67	0,75	0,27	2,81	0,22	1,34	1,03	0,29	2,82	0,26	1,66	0,97	0,29

Anexo 24. Análisis de foliares pre-tratamiento. En la primera columna izquierda se encuentra la identificación de cada muestra, ordenadas ascendentemente; **D:** dosis, **C:** concentración. Se analizaron los siguientes nutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg).

N° Muestr. Laborat.	Identificación del Lote	Nitrógeno (N)					Fósforo (P)					Potasio (K)					Calcio (Ca)					Magnesio (Mg)																								
		N					P					K					Ca					Mg																								
28747	1.D 1.C	2,66	0,23	1,45	1,32	0,40	2,59	0,18	1,39	1,58	0,38	2,66	0,19	1,66	1,25	0,32	2,59	0,33	1,85	1,05	0,24	2,59	0,26	1,76	1,49	0,39	2,87	0,40	1,83	1,09	0,29	2,87	0,28	1,77	1,14	0,39	2,94	0,30	1,68	1,37	0,41	2,59	0,15	1,30	1,24	0,38

