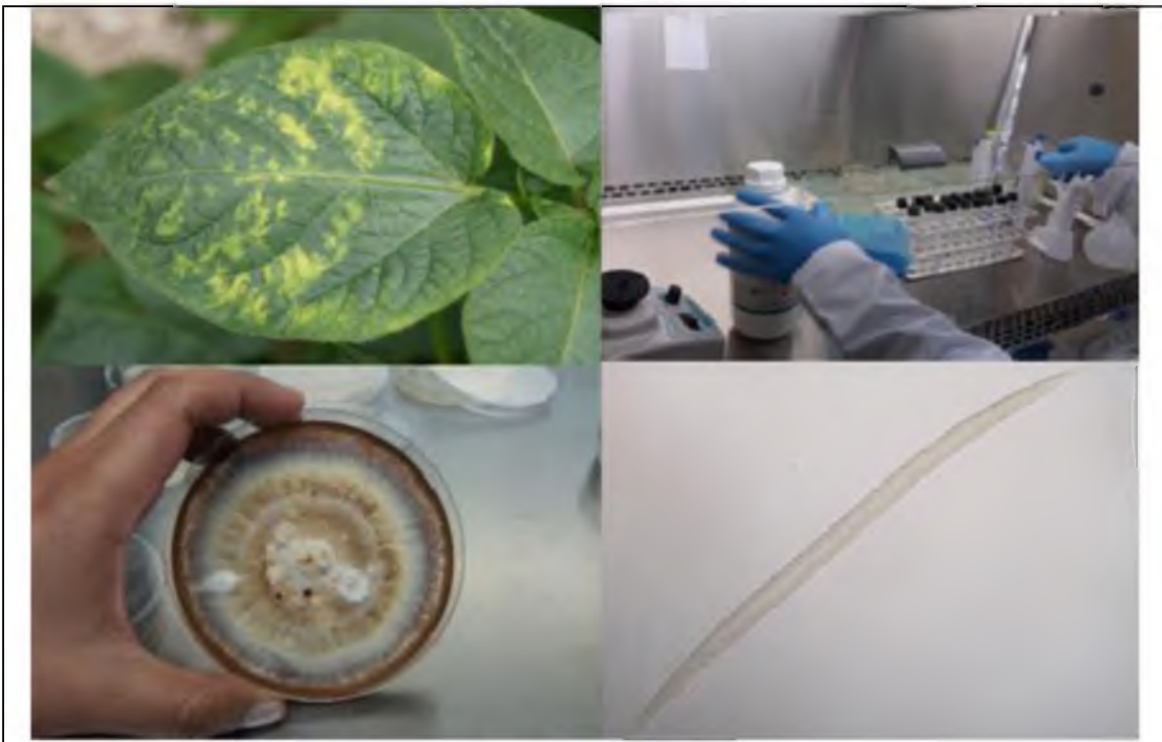


Estación Experimental Santa Catalina
Departamento Nacional de Protección Vegetal

Informe Anual 2017



Mejía – Pichincha – Ecuador
Diciembre / 2017

Actividad 9. Evaluación de la eficacia de productos convencionales y alternativos para el manejo de *Ilyonectria torressensis* en mora de Castilla (*Rubus glaucus*), bajo condiciones controladas.

Matriz de actividades

Actividades Planificadas	
Actividad	Indicador de la actividad
Evaluación de la eficacia de productos convencionales y alternativos para el manejo de <i>Ilyonectria torressensis</i> en mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i>), bajo condiciones controladas.	Informe técnico de avance de actividades
Responsable:	Ing. Cristina Tello
Colaboradores:	Egda. Cynthia Oña, Jorge Caicedo (UCE), Ing. William Viera (INIAP-Fruticultura), Ing. Francisco Baéz (IICA)

Antecedentes

La enfermedad marchitez descendente constituye uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan al cultivo de la mora de Castilla en el Ecuador (Jácome, 2010), la cual reduce los rendimientos y disminuye la vida productiva de la planta (Cedeño et al., 2004). Al momento, no se conocen prácticas de manejo integrado de la enfermedad, siendo el uso de fungicidas tanto convencionales como alternativos, una opción que permitiría minimizar las pérdidas, por lo cual es necesario evaluar alternativas de bajo impacto ambiental, que permitan un control eficiente y que además no constituyan una amenaza para la salud de agricultores y el medio ambiente.

El manejo biológico de los cultivos, se presenta como una alternativa ecológica y eficaz frente a los numerosos y crecientes problemas causados por microorganismos patógenos presentes en nuestro agro ecosistema. Dentro de estas, las especies de *Trichoderma* spp. tienen una gran actividad antagonista sobre patógenos de suelo, causantes de enfermedades importantes en varios cultivos.

Entre los principales obstáculos para la ampliación de la utilización de los bio-productos en la producción agrícola, está la escasez de las formulaciones debidamente registradas, ya que la comercialización y utilización de productos no registrados dificulta la fiscalización y propicia el surgimiento de productos de baja calidad y que terminan por generar pérdida en la credibilidad por parte de los agricultores en la eficiencia de *Trichoderma* en el control de enfermedades en las plantas; por lo tanto, el control de calidad de estos productos biológicos es importante para determinar su viabilidad y eficiencia (Salvador, 2004).



En este contexto, el Programa Nacional de Fruticultura y el Departamento Nacional de Protección Vegetal del INIAP, en la búsqueda de alternativas de manejo integrado de la enfermedad, realizan actividades de continuidad a estudios realizados en el año 2016, en cuyos resultados se identificó a *Ilyonectria torresensis* como el agente causal de marchitez en mora de Castilla en el Ecuador, se determinó un método efectivo de inoculación del patógeno en plántulas de mora bajo invernadero y a su vez, de la evaluación de fungicidas químicos y orgánicos *in vitro* para el control de *I. torresensis*, se seleccionaron los fungicidas con mayor eficacia.

En base a estos resultados, se están evaluando en condiciones de invernadero a los fungicidas químicos y orgánicos seleccionados frente a *I. torresensis* en plantas de mora de Castilla inoculadas con el patógeno; por otro lado, se pretende evaluar la capacidad biocontroladora de algunos productos comerciales a base de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *I. torresensis*. Los resultados de este estudio permitirán aportar a un programa de manejo integrado de marchitez en el cultivo de mora de Castilla.

Objetivos

Objetivo General

Establecer el efecto de la aplicación de productos químicos, orgánicos y biológicos para el control del patógeno de suelo *I. torresensis* en *Rubus glaucus* bajo condiciones controladas.

Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad antagónica de productos biológicos comerciales a base de *Trichoderma* spp. sobre el fitopatógeno *I. torresensis* bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar bajo invernadero tres dosis y dos épocas de aplicación de dos productos biológicos a base de *Trichoderma* spp. (eficaces *in vitro*) frente a *I. torresensis*, en *Rubus glaucus*.
- Determinar la eficacia bajo invernadero de tres productos orgánicos y tres químicos para el control de *I. torresensis*, en *Rubus glaucus*.

Metodología

Ubicación

El estudio se realizó en dos etapas, la primera en los Laboratorios de Control Biológico y Fitopatología del Departamento Nacional de Protección Vegetal, la segunda bajo condiciones de



invernadero en la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, ubicada en la parroquia de Cutuglagua al norte del Cantón Mejía a una altitud de 3064 msnm.

- **Aislamiento de *I. torresensis***

El aislamiento se realizó a partir de raíces de plantas de mora sintomáticas, las cuales fueron inoculadas con el patógeno hace aproximadamente un año en el estudio previo; las raíces se lavaron con agua corriente para retirar el suelo. Posteriormente se tomaron pequeños trozos (2-3mm) de la interfaz de los tejidos sanos y enfermos; a continuación, se desinfectaron los tejidos con hipoclorito de sodio 1,5% (NaClO) durante 2 min y se realizaron tres enjuagues en agua destilada estéril y después se sembraron en cajas Petri con medio PDA y ácido láctico. Luego se purificó el aislamiento y multiplicó en medio PDA-acidificado. Los cultivos se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad por 15 días (Cedeño *et al.*, 2004).

- **Control de calidad de productos biológicos**

Productos biológicos comerciales a base de *Trichoderma* spp., en una etapa previa, pasaron por un proceso de control de calidad en el Laboratorio de Control Biológico del DNPV-EESC. Esta es una fase de evaluación en la cual se determinará el estado de los productos biológicos para seleccionar aquellos que cumplan con los parámetros de calidad para su utilización a nivel *in vitro* e invernadero. Para lo cual, se determinó la concentración de los productos por conteo de esporas, pruebas de viabilidad de las esporas mediante el test de unidad formadora de colonia (UFC) y la pureza de los productos comerciales siguiendo la metodología de Bettiol *et al.* (2014).

- **Determinación de concentración de esporas.**

Se realizaron diluciones de tres submuestras de cada producto, en agua con tritón al 0,05%, a continuación, se tomaron 20 uL de la tercera o cuarta dilución y se colocaron en una cámara de Neubauer para ser visualizados en un microscopio con el objetivo 40X. Se prepararon dos cámaras por cada submuestra, realizando 4 conteos por cada producto y sacando un promedio para aplicar la siguiente fórmula:

Concentración de esporas = promedio de esporas x factor de cámara x factor de dilución

- **Viabilidad de esporas expresada en unidades formadoras de colonias.**

Se seleccionaron tres diluciones de cada producto, a continuación, se realizaron siembras de 100 uL de cada dilución en cajas con medio de cultivo PDA-tritón-ácido láctico y se incubaron a 25°C por 8 días. Transcurrido este periodo se realizaron los conteos del número de colonias en cada caja Petri, para la determinación del número de unidades formadoras de colonias se tomaron los datos de la dilución que presentó crecimiento de entre 10 y 100 colonias y se aplicó la siguiente fórmula:



UFC/mL o g = promedio del número de colonias x factor de dilución x factor de ajuste

- **Porcentaje de pureza.**

Se determinó en función del número de colonias contaminantes y el número de colonias del hongo benéfico, se expresó en porcentaje.

- **Actividad de agua.**

Esta prueba se realizó tomando una muestra de cada producto y se colocó en el equipo medidor de actividad de agua, registrando valores en función de la temperatura.

- **Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp., sobre *I. torresensis*.**

Se evaluaron tres productos biológicos comerciales a base de *Trichoderma* spp., seleccionados luego de pasar por un proceso de control de calidad. A continuación, se reactivaron las esporas de los antagonistas comerciales, para lo cual se realizaron diluciones de los productos hasta 10^{-7} , luego se adicionaron 100 uL sobre medio de cultivo PDA-acidificado en cajas Petri; las cuales fueron incubadas durante ocho días a una temperatura de 25 °C. Adicionalmente, en una nueva caja de Petri con PDA-acidificado se colocaron muestras de 0,5 mm de diámetro del patógeno (*I. torresensis* de 15 días de crecimiento) a una distancia de dos centímetros del borde de la caja de Petri. Pasado 8 días de la siembra del patógeno, se tomará una muestra de 0,5 mm de *Trichoderma* de cada uno de los productos y se depositó al lado opuesto del patógeno. El testigo consistió en la siembra del patógeno en el medio de cultivo (PDA-acidificado) sin el antagonista (Gaviria *et al.*, 2013).

El antagonismo se comprobó por la variable porcentaje de inhibición de crecimiento radial que se obtuvo a partir del crecimiento del patógeno en cultivo dual, junto con sus respectivos testigos, midiendo los radios de crecimiento del patógeno y de los antagonistas con la ayuda de un calibrador y empleando la fórmula utilizada por Fernández & Suárez (2009):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$$

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).

Se evaluaron 4 tratamientos los cuales corresponden a tres productos biológicos comerciales más un testigo del patógeno, cada uno con seis repeticiones. Se realizó el análisis de antagonismo a los 8 y días de crecimiento de *I. torresensis* debido a su crecimiento lento.

- **Inoculación de *I. torresensis* en plantas de mora.**

Para la inoculación del patógeno se preparó una suspensión de conidios, para lo cual a cada cultivo en caja Petri se le agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE) y se raspó mecánicamente la superficie con un portaobjetos. La suspensión de conidios se filtró a través de una malla y se ajustó a la concentración deseada midiendo con una cámara de Neubauer. Previo a la inoculación, las raíces se recortaron y fueron desinfectadas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % durante dos minutos y enjuagadas con ADE dos veces. Las raíces de plantas de mora fueron sumergidas en una suspensión de 1×10^6 conidios /mL durante 30 minutos, inmediatamente, todas las plantas inoculadas se plantaron en fundas individuales que contenían sustrato pasteurizado, y se colocaron en un invernadero de temperatura controlada entre 20 °C y 25 °C. Transcurridos 15 días desde la inoculación y plantación, se realizó una inoculación adicional mediante un riego de 50 mL con una solución de igual concentración de conidios (Iturralde, 2017).

Las raíces de las plantas control fueron sumergidas en agua destilada estéril y colocadas posteriormente en sustrato estéril.

- **Evaluación de tres productos químicos y tres orgánicos para el control de *I. torresensis* bajo condiciones de invernadero.**

Se evaluaron tres moléculas químicas y tres orgánicas para el control de *I. torresensis*. Las cuales fueron seleccionadas *in vitro* durante una investigación previa (Jarrín, 2017).

Se evaluaron 5 tratamientos tanto para productos químicos y orgánicos, respectivamente; que corresponden a cada uno de los productos más dos testigos, con y sin inoculación de *I. torresensis*. Las moléculas químicas seleccionadas fueron Carbendazim, Azoxistrobina y Propiconazol y las moléculas orgánicas son flavonoides, extracto de mirtáceas y sulfato cúprico pentahidratado.

Los productos químicos y orgánicos se aplicaron 15 días después de la inoculación de *I. torresensis*, permitiendo así el establecimiento del hongo.

A las plantas inoculadas con *I. torresensis* (control sin fungicida), se les aplicó agua destilada esterilizada.

El experimento se dispuso en un diseño completamente aleatorizado con 12 observaciones para cada tratamiento.

Resultados

- **Pruebas de antagonismo de productos biológicos**

Los resultados del control de calidad de los 7 productos biológicos a base de *Trichoderma* spp. se muestran en la Tabla 2, donde se presenta la concentración en número de esporas por gramo del producto, la viabilidad expresada en unidades formadoras de colonia, el valor de actividad de agua

que presenta el producto y la pureza del producto dependiendo de la contaminación por otros microorganismos.

Tabla 2. Resultados obtenidos en el control de calidad de productos biológicos a base de *Trichoderma*.

Producto	Microorganismo evaluado	Total de esporas/g	Viabilidad (UFC/g)	Valor de actividad de agua (a_w)	Otros microorganismos
b1	<i>Trichoderma</i> spp.	3×10^7	-	0.8005 a 25.05 °C	Ninguno
b2	<i>Trichoderma</i> spp.	4×10^5	-	0.9933 a 24.26 °C	Bacterias
b3	<i>Trichoderma</i> spp.	5×10^7	-	0.5757 a 24.74 °C	Ninguno
b4	<i>Trichoderma</i> spp.	3×10^7	-	0.7459 a 25.06 °C	Ninguno
b5	<i>Trichoderma</i> spp.	1×10^9	4×10^8	0.5573 a 25.04 °C	Ninguno
b6	<i>Trichoderma</i> spp.	3×10^{10}	6×10^9	0.5831 a 25.07 °C	Ninguno
b7	<i>Trichoderma</i> spp.	8×10^7	8×10^7	0.9921 a 24.60 °C	Ninguno

Se determinó que el producto b2 fue el de menor concentración de esporas/mL, además en las pruebas de viabilidad (UFC) se encontró 100% crecimiento de bacterias (Figura 2). Los productos b1, b3 y b4, aunque no presentaron contaminación, su viabilidad fue muy baja porque presentaron valores menores a 10 UFC por caja Petri (Figura 1).

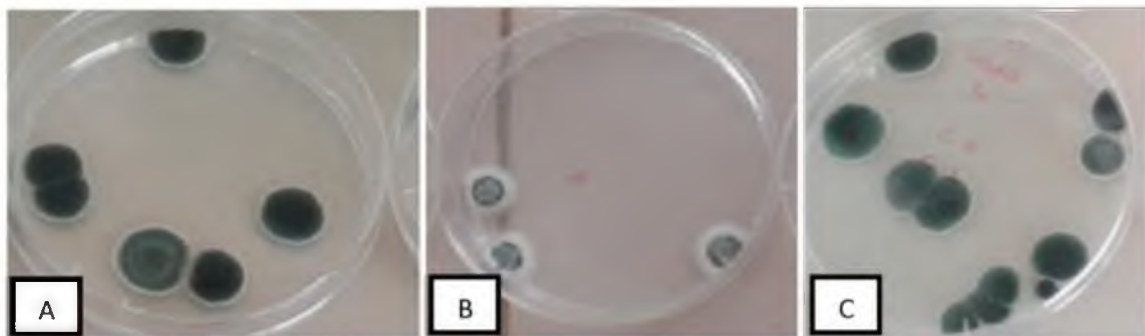


Figura 1: Número de colonias de *Trichoderma* en una dilución 10^{-3} . A) Producto b1 B) Producto b3 C) Producto b4

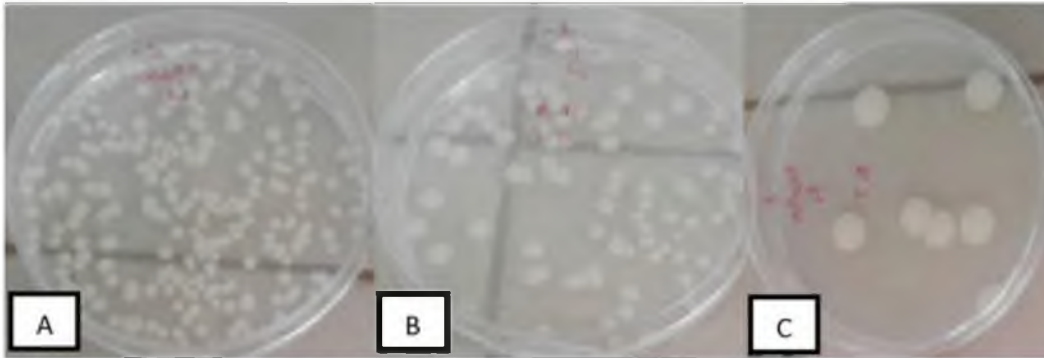


Figura 2: Número de colonias de bacterias del producto b2. A) Dilución 10^{-1} B) Dilución 10^{-2} C) Dilución 10^{-3}

Los productos b5, b6 y b7, tuvieron los mayores valores de concentración y viabilidad debido a que el número de UFC fue mayor a 10 (Figura 3), lo que permite seleccionar a estos productos para una siguiente etapa de evaluación.

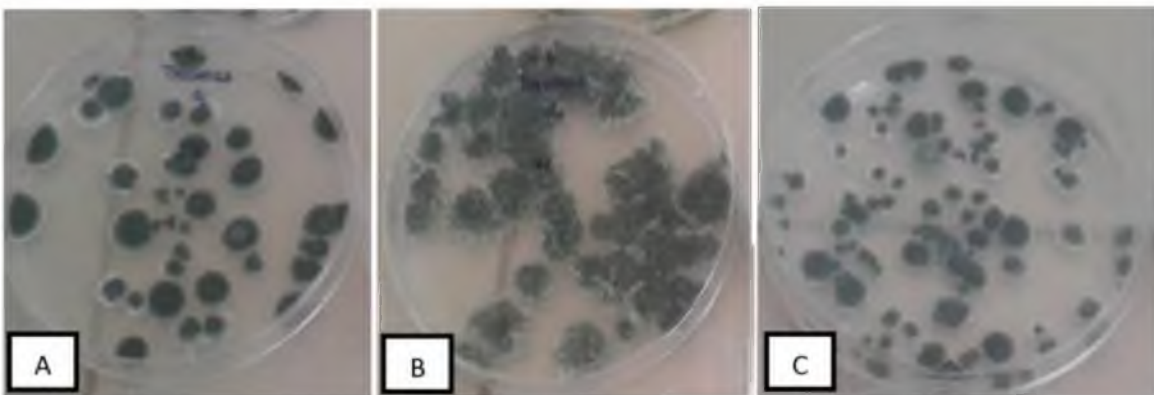


Figura 3: Número de colonias de *Trichoderma* en una dilución 10^{-6} . A) Producto b5 B) Producto b6 C) Producto b7.

- **Capacidad antagonica de *Trichoderma* spp.**

Al realizar la comparación del crecimiento del patógeno y el antagonista en cultivo dual se determinó que los tres productos biológicos se desarrollaron a una velocidad superior a la de *I. torresensis*. Debido a que los antagonistas comerciales a las 72 horas tuvieron el primer contacto con el patógeno y comenzaron a inhibir progresivamente el crecimiento del patógeno; tal como indica la figura 4.

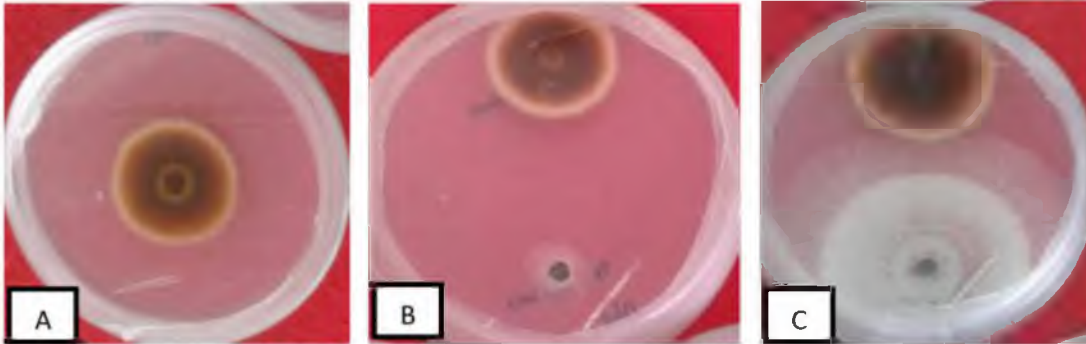


Figura 4: Confrontación de *Trichoderma* spp. vs *I. torresensis*. A) Testigo B) Cultivo dual a las 24 horas. C) cultivo dual a las 72 horas

La inhibición del crecimiento radial se observó en todos los tratamientos a las 48 horas, aun cuando las colonias del antagonista estaban distantes del patógeno. A los 15 días después de la siembra de *Trichoderma* spp. se clasificó el tipo de antagonismo según la escala utilizada por Ezziyani *et al.* (2004). *Trichoderma* spp. obtuvo un grado de antagonismo 4 en los tratamientos b5 y b7, que lo califica con muy buen potencial biocontrolador, porque hubo invasión total de la colonia del patógeno y esporulación sobre ella; al contrario del tratamiento b6 que se ubicó en un grado 3 con potencial biocontrolador bueno, debido a que el antagonista logró invadir la colonia del patógeno, pero no esporular sobre ella (Figura 5).

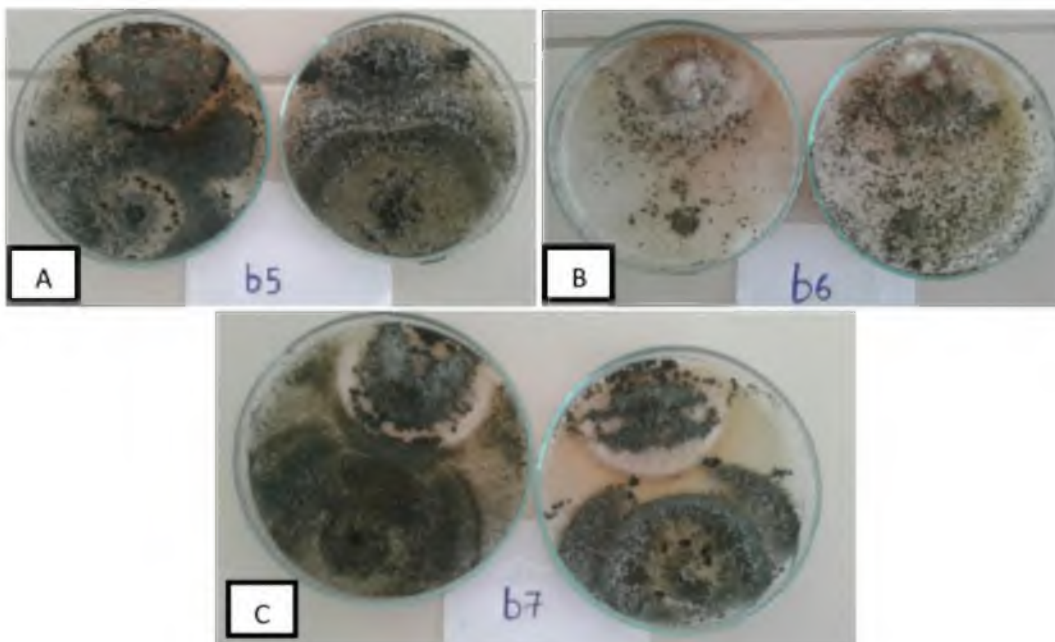


Figura 5: Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre la colonia de *I. torresensis*.

En el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *I. torresensis* se evidencia que el mayor valor de PICR se presentó en los tratamientos b5 y b7; mientras que el menor valor de PICR se encontró en el tratamiento b6 tanto a los 8 y 11 días de crecimiento del patógeno antes del cultivo dual, como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Cálculo del PICR para *Trichoderma* spp. vs *I. torresensis*.

PICR <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>I. torresensis</i>			
Observación	PICR-b6	PICR-b5	PICR-b7
1	42,50	57,50	55,00
2	41,46	58,54	56,10
3	42,50	57,50	55,00
4	46,15	58,97	53,85
5	50,00	57,50	55,00
6	51,22	60,98	53,66
PROMEDIO	45,64	58,50	54,77

Conclusiones

De los siete productos biológicos comerciales evaluados, se seleccionaron únicamente tres (productos b5, b6 y b7) para posteriormente realizar las pruebas de antagonismo contra *I. torresensis* en laboratorio. Debido a que estos productos evidenciaron una concentración de esporas de entre 10^7 y 10^{10} , considerados valores aceptables para posteriores aplicaciones bajo condiciones de invernadero. El valor de UFC de estos productos fue cercano a la de su concentración de esporas lo que evidencia que estas presentan una buena viabilidad. Además, estos productos no demostraron presencia de contaminantes durante su cultivo en caja Petri.

Los demás productos se descartaron por su baja concentración, viabilidad y contaminación con bacterias lo cual se evidenció por cumplir el número de colonias con las diluciones seriadas (Figura 1 y 2).

Trichoderma en los tratamientos b5 y b7 a las 72 horas inhibió totalmente el crecimiento de *I. torresensis*; mientras que, el tratamiento b6 aun cuando entro en contacto con el patógeno permitió el crecimiento del mismo durante los días posteriores. Esto se debido a que la capacidad de invasión de *Trichoderma* sobre el patógeno fue mayor en los tratamientos b5 y b7.

Recomendaciones

Una vez culminado el estudio, se seleccionarán los productos con mayor eficacia, tanto químicos, orgánicos y biológicos, para realizar pruebas en condiciones de campo.



Referencias

- Bettioli, W., Boechat, M. A., Pinto, Z. V., Mantovanello, C. M., Júnior, M. L., Costa, J. de C. do B., ... Moura, A. B. (2014). *Evaluación de calidad de productos a base de Trichoderma*. Brazil.
- Cedeño, L.; Carrero, C.; Quintero, K.; Pino, H.; Espinoza, W. (2004). *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans* and *Neonectria discophora* var. *rubi* associated with black foot rot on blackberry (*Rubus glaucus* B.) in Mérida, Venezuela (en línea). *Interciencia*. 29(8): 455-460.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Requena, M. E., Rubio, L., & Candela, M. E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, 26, 69–78.
- Fernández, R., & Suárez, C. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4743–4748.
- Gaviria, V., Patiño, L., & Saldarriaga, A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp ., en mora de Castilla *in vitro* evaluation of commercial fungicides for control of *Colletotrichum* spp., in blackberry. *Revista Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 67–75.
- Iturralde, P. (2017). *Identificación molecular y determinación de una metodología para la inoculación de Ilyonectria sp ., asociado a la marchitez en*. ESPE, Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Jácome, R. (2010). *Estudio de la línea base de la cadena productiva de la mora de Castilla (Rubus glaucus B.) en las provincias de Bolívar, Cotopaxi y Tungurahua*. Tesis Ing. Agrónomo. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad Estatal de Bolívar. Guaranda, Ecuador. 148 p.
- Jarrín, M. (2017). *Evaluación in vitro de productos convencionales y alternativos para el control de Ilyonectria torresensis en mora de castilla (Rubus glaucus)*. Universidad de las Américas.
- Salvador, G. 2004. Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. in vitro con énfasis en pruebas de control de calidad. Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 18 p. Recuperado de:
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2124/1/CPA-2004-T061.pdf>