



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Control Biológico de la roya del café (*Hemileia vastatrix*
Berk. & Br.) mediante *Trichoderma* spp. de Sistemas
Agroforestales de Café.

Tesis previa a la obtención del
título de Ingeniero Agrónomo

AUTOR

David Alejandro Fernandez Arteaga

DIRECTOR

Ing. Angel Rolando Robles Carrión PhD.

LOJA – ECUADOR

2020

CERTIFICADO

Ing. Angel Rolando Robles Carrión PhD.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que luego de haber dirigido y revisado el trabajo de tesis titulado: “**Control Biológico de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) mediante *Trichoderma* spp. de Sistemas Agroforestales de Café**”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, del egresado: David Alejandro Fernandez Arteaga, se autoriza su presentación debido a que el mismo se sujeta a las normas y reglamentos generales de graduación exigido por la carrera de Ingeniería Agronómica.

En mi calidad de Director de Tesis certifico que la investigación realizada ha sido trabajo propio del egresado.

Loja, 21 de agosto del 2020



Firmado electrónicamente por:
**ANGEL ROLANDO
ROBLES CARRION**

Ing. Angel Rolando Robles Carrión PhD.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Una vez cumplida la reunión del tribunal de calificación del trabajo final de tesis titulado: “Control Biológico de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) mediante *Trichoderma* spp. de Sistemas Agroforestales de Café”, de la autoría del Sr. David Alejandro Fernandez Arteaga, egresado de la carrera de Ingeniería Agronómica.

En tal virtud, nos permitimos calificar favorablemente el trabajo final consolidado de investigación está acorde con los requerimientos de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto, se autoriza continuar con los trámites pertinentes.

Loja, 26 de noviembre del 2020



EDMIGIO SOLIFS
VALDIVIESO
CARAGUAY

Mg. Sc. Edmigio Solifs Valdivieso Caraguay

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Paulina Vanesa
Fernández
Guarnizo

Digitally signed
by Paulina Vanesa
Fernández
Guarnizo

Mg.Sc. Paulina Vanesa Fernández Guarnizo

VOCAL



KLEVER ANIBAL
CHAMBA
CAILLAGUA

Ing. Klever Anibal Chamba Caillagua

VOCAL

AUTORIA

“Yo, David Alejandro Fernandez Arteaga declaro ser el autor del presente trabajo de Tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Declaro que durante la investigación y elaboración de la tesis el uso de referencias publicadas por otros autores cumplió con las normas y regulaciones establecidas.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorios Institucional – Biblioteca Virtual.



Firmado electrónicamente por:
**DAVID ALEJANDRO
FERNANDEZ ARTEAGA**

David Alejandro Fernandez Arteaga

Cedula: 1105023327

Fecha: 26/11/2020

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **David Alejandro Fernandez Arteaga**, declaro ser el autor de la tesis titulada **“Control Biológico de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) mediante *Trichoderma* spp. de Sistemas Agroforestales de Café”** como requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo, por lo que autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la publicación intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden hacer uso de este trabajo investigativo en las redes de información del país (RID) y del exterior, con las que mantenga convenio de la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio de dicha tesis que realice una tercera persona.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los veinte seis días del mes de noviembre del dos mil veinte, firma el autor:



Firmado electrónicamente por:
**DAVID ALEJANDRO
FERNANDEZ ARTEAGA**

Firma:

Autor: David Alejandro Fernandez Arteaga

Cedula: 1105023327

Dirección: Km 3 y medio vía a Zamora

Correo: david.fernandez@unl.edu.ec

Celular: 0980890660

Datos complementarios

Director de tesis: Ing. Angel Rolando Robles Carrión PhD.

Tribunal de grado:

PRESIDENTE: Mg. Sc Edmigio Solifs Valdivieso Caraguay.

VOCAL: Mg. Sc Paulina Vanesa Fernández Guarnizo.

VOCAL: Ing. Klever Aníbal Chamba Caillagua.

AGRADECIMIENTO

A mis padres Daniel Victoriano Fernandez Arteaga y Lourdes Magdalena Arteaga Suarez los que me impulsan a seguir adelante y por brindarme su apoyo incondicional durante el transcurso de la carrera.

A mi director de tesis Ing. Angel Rolando Robles Carrión por el apoyo y asesoramiento brindado en mi trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional de Loja, Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y a todos los docentes de la Carrera de Ingeniería Agronómica por sus conocimientos y experiencias brindadas durante los años de formación universitaria.

David Alejandro Fernandez Arteaga

DEDICATORIA

A mi padre que me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por sí mismo. También está dedicado a mi madre, quien me enseñó que incluso la tarea más grande se puede lograr si se hace un paso a la vez.

David Alejandro Fernandez Arteaga

ÍNDICE GENERAL

TITULO	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. El cultivo de café	4
2.1.1. Origen y distribución.....	4
2.1.2. Zonas de producción en el país.....	4
2.2. Roya del café.....	5
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	5
2.2.2. Origen y distribución de la roya del café.....	6
2.2.3. Ciclo de vida del agente causal de la roya del café.....	6
2.2.4. Sintomatología.....	7
2.2.5. Daños de la roya del café.....	8
2.2.6. Progreso de la enfermedad.....	8
2.3. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad.....	9
2.3.1. Factores bióticos.....	9
2.3.2. Factores abióticos.....	9
2.4. Principal microorganismo usado como agente de control biológico.....	10
2.5. Características generales de <i>Trichoderma</i>	10
2.5.1 Taxonomía del género <i>Trichoderma</i>	11
2.5.2 Control biológico de <i>Trichoderma</i> en diferentes ambientes.....	12

2.6. Investigaciones realizadas en el control de la roya del café	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación.....	15
3.2. Materiales.....	16
3.3. Metodología para el primer objetivo.....	16
“Identificar mediante características morfológicas los aislados de <i>Trichoderma</i> spp”	16
3.3.1. Sitios de muestreo.....	16
3.3.2. Características morfológicas.....	17
3.3.3. Conteo de esporas de <i>Trichoderma</i>	18
3.3.4. Medición de esporas de <i>Trichoderma</i>	18
3.4. Metodología para el segundo objetivo.....	19
“Evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. para el control de la roya bajo condiciones <i>in vitro</i> ”	19
3.4.1. Desprendimiento y variables evaluadas para la eficacia del biocontrol.....	19
3.4.2. Desprendimiento, desinfección e inoculación de hojas de café.....	19
3.4.2.1. Variables medidas sobre la hoja de café.....	20
3.5. Metodología para el tercer objetivo.....	21
“Evaluar la contribución de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. como promotores del crecimiento vegetal bajo condiciones de invernadero.....	21
3.5.1. Desinfección e inoculación de la semilla de café con tres tratamientos.....	21
3.5.2. Evaluación del mejor aislado aplicados a las semillas de café.....	22

4. RESULTADOS	23
4.1. Resultado para el primer objetivo.....	23
“Identificar mediante características morfo-culturales los aislados de <i>Trichoderma</i> spp”.....	23
4.1.1. Características morfo-culturales.....	23
4.1.2. Conteo de esporas de <i>Trichoderma</i>	25
4.1.3. Medición de esporas de <i>Trichoderma</i>	25
4.2. Resultado para el segundo objetivo.....	26
“Evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. para el control de la roya bajo condiciones <i>in vitro</i> ”.....	26
4.2.1. Desprendimiento, desinfección e inoculación de hojas de café.....	26
4.2.2. Desprendimiento y variables evaluadas para la eficacia del biocontrol.....	28
4.5. Resultado para el tercer objetivo.....	28
“Evaluar la contribución de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. como promotores del crecimiento vegetal bajo condiciones de invernadero.....	28
4.5.1. Desinfección inoculación de la semilla de café con tres tratamientos.....	28
4.5.2. Evaluación del mejor aislado aplicados a las semillas de café.....	29
5. DISCUSIONES	30
6. CONCLUSIONES	33
7. RECOMENDACIONES	34
8. BIBLIOGRAFÍA	35
9. ANEXO	45

**Control Biológico de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.) mediante
Trichoderma spp. de Sistemas Agroforestales de Café**

RESUMEN

El café es de gran importancia para la economía ecuatoriana, debido a que aporta divisas al estado, genera ingresos para las familias que cultivan café y es producido principalmente en sistemas agroforestales. La principal enfermedad del café es la roya su agente causal es el hongo biotrófico *Hemileia vastatrix*, que ataca principalmente a las hojas, propiciando pérdidas de rendimiento superiores al 50 %, también reduce la capacidad fotosintética, y el debilitamiento de las plantas. Por lo tanto, surge el objetivo de la presente investigación la cual consiste en evaluar el control biológico la roya del café (*H. vastatrix*) mediante aislados de *Trichoderma* spp. de Sistemas Agroforestales de Café. En base a los resultados obtenidos del suelo rizosférico del cantón Chaguarpamba, los aislados incubados a 28 °C en cajas de Petri presentaron una expansión rápida a las 48 horas con una tasa de crecimiento radial (TCR) 1.88 mm, con su micelio algodonoso y su color amarillo blanquecino tanto en anverso como en reverso, a las 96 horas el micelio logro cubrir la superficie del medio de cultivo agar papa dextrosa con un TCR 0.9 mm, en el anverso presentó un color verde oliva de textura granular mientras que en el reverso una coloración amarillo-blanquecino esto se debe a la producción de cristales de color amarillento, en el conteo de esporas no existe una diferencia significativa, siendo su valor menor 4.45×10^7 y su valor mayor de 5.22×10^7 esporas / mL, en cuanto a la medición, de esporas presento de largo 6 y 6.5 mm y de ancho 5.75 y 6.5 mm en la medición de *Trichoderma* no se encuentran diferencias significativas. En el biocontrol a las 144 horas de haber aplicado *Trichoderma* tuvo un efecto positivo con un 93 % de efectividad ante la roya (*H. vastatrix*). El mejor tratamiento del poder germinativo es (T1= agua) con un porcentaje de 92 %, mientras el tratamiento (T3= *Trichoderma*) su poder germinativo fue 68 % siendo este muy bajo en comparación de los otros tratamientos. En el crecimiento radicular (CR) y según los resultados de análisis estadístico, el mejor tratamiento fue agua, el cual en el día 27 de enero tuvo una temperatura promedio de 22.3°C con un CR 0.66 mm, ácido naftalenacético (ANA) un CR 0.24 mm, y *Trichoderma* un CR 0.00 mm, al final de la valuación el día 21 de febrero y con una temperatura promedio de 22.5 °C el tratamiento con agua tuvo un CR 24.9 mm, ANA un CR 22.1 mm, y *Trichoderma* un CR 13.5 mm con un menor poder germinativo en comparación con el agua y ácido naftalenacético.

ABSTRACT

Coffee is of great importance to the Ecuadorian economy because it brings in foreign exchange to the state, generates income for families that grow coffee, and is produced primarily in agroforestry systems. The main disease of coffee is rust, its causal agent is the biotrophic fungus *Hemileia vastatrix*, which attacks mainly the leaves, causing yield losses of over 50%, also reducing the photosynthetic capacity, and weakening the plants. Therefore, it arises the objective of this research which consists on evaluating the biological control of coffee rust (*H. vastatrix*) through *Trichoderma* spp. isolates from Coffee Agroforestry Systems. Based on the results obtained from the rhizospheric soil of Chaguarpamba canton, the isolates incubated at 28 °C in Petri dishes presented a fast expansion at 48 hours with a radial growth rate (TCR) 1.88 mm, with its cottony mycelium and its whitish yellow color both in front and back, at 96 hours the mycelium managed to cover the surface of the culture medium dextrose potato agar with a TCR 0.9 mm, in the obverse it presented an olive green color of granular texture while in the reverse a yellow-white coloration this is due to the production of crystals of yellowish color, in the count of spores does not exist a significant difference, being its value smaller 4.45×10^7 and its higher value of 5.22×10^7 spores / mL, as for the measurement, of spores present in length 6 and 6.5 mm and width 5.75 and 6.5 mm in the measurement of *Trichoderma* no significant differences are found. In the biocontrol at 144 hours after application *Trichoderma* had a positive effect with 93% effectiveness against rust (*H. vastatrix*). The best treatment of the germinative power is (T1= water) with a percentage of 92%, while the treatment (T3= *Trichoderma*) its germinative power was 68% being this very low in comparison with the other treatments. In the root growth (CR) and according to the results of statistical analysis, the best treatment was water, which on January 27th had an average temperature of 22.3°C with a CR 0.66 mm, naphthaleneacetic acid (ANA) a CR 0.24 mm, and *Trichoderma* a CR 0.00 mm, at the end of the valuation on February 21st and with an average temperature of 22.5°C the water treatment had a CR 24.9 mm, ANA a CR 22.1 mm, and *Trichoderma* a CR 13.5 mm with a lower germination power compared to water and naphthaleneacetic acid.

1. INTRODUCCIÓN

El café representa uno de los productos agrícolas más importantes dentro de las exportaciones mundiales, es producido principalmente en sistemas agroforestales (SAF) (Montagnini *et al.*, 2015), siendo Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Honduras los principales países exportadores en el mundo con las especies arábico y robusta (Organización Internacional Café [ICO], 2018).

En Ecuador, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2019) durante el año 2018 la superficie plantada de café fue de 45 852 ha, de las cuales 37 872 se encuentran en monocultivo y 7 980 en asocio, la provincia de Loja cuenta con una superficie de 3 981 ha de cultivo, de las cuales 1 994 ha se encuentran asociadas dentro de sistemas agroforestales.

El asocio con árboles potencializa al cultivo de café como un sistema agroforestal que puede ofrecer servicios ecosistémicos, como la regulación hídrica de gases y del clima, control de erosión por retención de sedimentos, formación de suelos, reciclaje de nutrientes, polinización, control biológico, mantenimiento de biodiversidad y belleza escénica (paisaje y territorio), los cuales tienen un papel determinante en el funcionamiento de los agro ecosistemas de cafeto (Ponce *et al.*, 2018).

Sin embargo, se debe tener precaución en el uso de la arborización en cafetales, debido a que, si se usan especies incorrectas o en condiciones inadecuadas, los árboles pueden competir significativamente con el cafeto, pueden provocar el exceso de sombra o dificultades en las operaciones de la cosecha (Cummings *et al.*, 2012) así como problemas con la incidencia de las enfermedades del café.

Las plantaciones de áreas extensas de monocultivo tienen alto impacto sobre los recursos naturales, entre ellos la regulación de poblaciones de microorganismos fitopatógenos, es importante reconocer que la fragmentación de ecosistemas naturales para plantaciones de monocultivos resulta en la pérdida de importantes hábitats para la conservación de la biodiversidad (Viteri, 2016).

En el monocultivo del café, los frecuentes brotes de microorganismos fitopatógenos han contribuido a la constante necesidad de intervención por medio de la aplicación de productos fitosanitarios para su control (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Esta práctica puede colaborar aún más para la desestructuración de estos sistemas agrícolas porque muchos

de los productos utilizados inciden también en las poblaciones de diversas especies de antagonistas, entre ellos los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, que contribuyen en la regulación de fitopatógenos (Castillo-Reyes *et al.*, 2015).

La principal enfermedad del café es la roya (*H. vastatrix* Berk. & Br.), la misma que puede causar pérdidas de rendimiento superiores al 50 % (Zambolim *et al.*, 1997). En el cultivo de café, la roya puede manejarse con cultivares resistentes y productos a base de cobre, cuyo uso es la medida de control más accesible y común en el país (Correa, 2014). Pero la variabilidad fisiológica del patógeno compromete la durabilidad de la resistencia (Herrera *et al.*, 2009). Dada la dificultad de obtener resistencia duradera, y las restricciones sobre los productos a base de cobre, la mayoría de las áreas están sembradas con cultivares susceptibles (Avelino y Rivas, 2013). Frente a esta situación, se hace necesario contar con una nueva forma de control para la roya que sea más amigable con el medio ambiente y con la salud de los productores y consumidores (Badii, *et al.*, 2000).

Una alternativa para el control de la roya es la utilización de microorganismos antagonistas, los cuales representan una estrategia no química contra microorganismos fitopatógenos (Whipps, 2001). Existe un gran número de microorganismos antagonistas que inhiben el desarrollo de fitopatógenos, entre los cuales está *Trichoderma* spp., que coloniza las raíces de las plantas, lo cual favorece el desarrollo, tanto aéreo como radical, e impide el ataque de fitopatógenos telúricos (Michel-Aceves *et al.*, 2013). Además, esta colonización radical genera resistencia sistémica, y controlan a su vez ciertos patógenos aéreos (Martínez *et al.*, 2013).

Con los antecedentes antes planteados la carrera de Ingeniería Agronómica cuenta con el proyecto “Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos benéficos de los sistemas agroforestales de cafetales en la región sur del Ecuador” del cual se deriva la presente investigación, donde se ha propuesto la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características de *Trichoderma* spp con potencial de biocontrol para la roya del café (*H. vastatrix*) de Sistemas Agroforestales de Café?, De aquí se derivan las preguntas específicas: ¿Cuáles son las características morfo-culturales para la identificación de *Trichoderma* spp y *H. vastatrix*?, ¿Qué efectos tiene la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp para el control de fitopatógenos bajo condiciones

in vitro?, ¿Cómo actúa la mejor combinación de los microorganismos antagonistas seleccionados frente a fitopatógenos en condiciones de invernadero?

Para el desarrollo de la presente investigación se plantea los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Evaluar el control biológico la roya del café (*Hemileia vastatrix*) mediante aislados de *Trichoderma* spp. de Sistemas Agroforestales de Café

Objetivos específicos

- Identificar mediante características morfoculturales los aislados de *Trichoderma* spp.
- Evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de *Trichoderma* spp. para el control de la roya bajo condiciones *in vitro*
- Evaluar la contribución de los aislados de *Trichoderma* spp. como promotores del crecimiento vegetal bajo condiciones de invernadero

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El cultivo de café

En Ecuador el cultivo del café es de gran importancia en el desarrollo económico y social desde el siglo XVIII, aportando divisas al país y para quienes lo cultivan, lo que genera un importante efecto multiplicador dentro de la cadena de comercialización, en especial en el acopio y la transformación, y sobre todo generando oportunidades de empleo a un importante segmento de la población rural (Viteri Salazar *et al.*, 2018).

2.1.1 Origen y distribución

Etiopía probablemente en la provincia de Kaffa es el hábitat original del *Coffea arabica* (Mesa *et al.*, 2016), mientras la especie *Coffea canephora*, fue descubierta en el antiguo Congo belga, en el siglo XIX (ICAFE, 2001). La especie *C. arabica* es la variedad más cultivada y aproximadamente representa el 56% de la producción a nivel mundial, además, es la especie más valorada por su calidad aromática y digestibilidad. En la actualidad existen extensos cultivos de café en el mundo siendo Brasil el país mayor productor y exportador (Murthy y Madhava Naidu, 2012).

La variedad de café que primero se cultivó en Ecuador en los tiempos de la colonia fue arábigo, luego a mediados del siglo XX ingresa la especie robusta, la cual alcanzó una gran extensión en zonas tropicales y húmedas de la costa y en los años 70 se propagó hacia la región Amazónica. En este contexto, el Ecuador posee una gran capacidad productora de café por la variedad de ecosistemas existentes y por su ubicación geográfica (Pizarro *et al.*, 2016); además, posee una amplia diversidad de climas que varían según la geografía y las temperaturas de cada región, ya sea por su altitud o ubicación, y principalmente por la presencia de la Cordillera de los Andes y la influencia marítima (Jiménez-Torres y Massa-Sánchez 2015).

2.1.2. Zonas de producción en el país

Las principales zonas productoras de café arábigo en el Ecuador están ubicadas en las provincias de Manabí, Loja, El Oro, Zamora Chinchipe, Morona Santiago, Pastaza, Bolívar, Chimborazo, Azuay, Cañar, Cotopaxi, Pichincha, Santo Domingo, Imbabura, Carchi, Los Ríos, Guayas Esmeraldas y Galápagos (INIAP, 2014).

2.2. Roya del café

La roya es la enfermedad más destructiva de la planta de café y tiene gran importancia económica a nivel mundial. Es ocasionada por el hongo *H. vastatrix* y ataca principalmente a las variedades que carecen de resistencia genética a la roya como: Caturra, Catuaí, Bourbon, Típica, Pache y otras susceptibles. Esta enfermedad ataca a las hojas maduras y cuando el ataque es severo también infecta hojas jóvenes provocando una intensa caída de hojas, de manera que reduce la capacidad fotosintética y puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria 2013).

La roya del café es una enfermedad que se presenta en altitudes de 600 a 1200 msnm, y se manifiesta en las plantas que poseen: falta de fertilización, uso inadecuado de fungicidas y variabilidad climática, factores que, entre otros, debilitan la planta haciéndola más susceptible a los ataques severos (Solórzano, 2013).

2.2.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Basidiomycotina

Clase: Teliomycetes

Orden: Uredinales

Familia: Pucciniaceae

Género: *Hemileia*

Especie: *vastatrix* Berkeley & Broome (García, 2013).

2.2.2. Origen y distribución de la roya del café

La enfermedad fue descubierta en el año 1861 en los alrededores del lago Victoria al este de África (Schiber, 1972) y poco después en 1867 fue encontrada en Ceilán (Sri Lanka), luego se extendió a gran parte del sureste de Asia y gradualmente invadió todas las regiones de África. En 1970, la temida enfermedad fue encontrada en el estado de Bahía (Brasil), luego en 1978 en Bolivia y en 1979 fue detectada la raza II de roya en las plantaciones de café en la provincia de Satipo, región Junín en el Perú (Scheiber *et al.*, 1984). Actualmente la roya amarilla se encuentra distribuida a través de todos los países productores de café y puede causar severas defoliaciones, con pérdidas sustanciales entre el 30 y 50 % en la producción (Silva *et al.*, 2006).

Los países de Centroamérica y América del Sur fueron afectados por la epidemia de la roya del café en 2012; en el 2013 en Perú y Ecuador, la cosecha fue impactada severamente por la enfermedad, afectando considerablemente las plantaciones de café generando reducción alarmante en el follaje y la reducción de la cantidad y la calidad de la producción (Avelino, *et al.*, 2014).

2.2.3. Ciclo de vida del agente causal de la roya del café

El hongo causante de la roya en el café permanece celularmente en un estado dicariótico aunque alguna vez puede darse una recombinación genética, básicamente reproducirse asexualmente (Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) 2013).

El ciclo de vida del hongo fitopatógeno puede dividirse en cuatro etapas: diseminación, germinación, colonización y esporulación.

Etapa de Diseminación.- Esta etapa inicia con una fase de liberación donde las uredosporas (estructuras reproductivas) se despegan de la hoja de café en presencia de salpicaduras provocadas por la lluvia; el viento, los insectos y el hombre facilitan la diseminación del hongo a cortas y largas distancias; por tanto, pueden desarrollarse nuevos focos de infección tan enormes como la disponibilidad misma de las plantas hospedantes y producen grandes cantidades de polvillo amarillo o naranja que se presentan a simple vista en el envés de las hojas de café (Villareyna, 2014).

Etapa de Germinación.- La llegada de la uredóspora al hospedero inicia la germinación que es el proceso infeccioso que emite de uno a cuatro tubos germinativos en un tiempo de 6 a 12 horas en condiciones favorables, tales como presencia de lluvia, por lo menos seis horas con temperaturas inferiores a 28 °C y superiores a 16 °C, poca luminosidad y en condiciones de humedad, consecuentemente permite crecer hasta encontrar estomas situados en el envés de las hojas maduras, luego penetrar al interior de la hoja e iniciar la infección de manera más estricta (Villareyna, 2014).

Etapa de Colonización. - Una vez que se encuentra en el interior de la hoja el hongo desarrolla unas estructuras llamadas haustorios que entran en contacto con las células de la planta y extraen los nutrientes para su crecimiento. Las células de café infectadas pierden su coloración natural, apreciándose en las hojas manchas cloróticas o amarillentas que corresponden a los síntomas de la enfermedad (Rivillas, *et.al.*, 2011).

Etapa de Esporulación o Reproducción. - Esta etapa empieza 30 días después de la colonización, donde el hongo alcanza su maduración y forma estructuras llamadas soros, los cuales son encargados de producir nuevas urediniosporas (forman la llamada fase de repetición de la roya), luego estas urediniosporas serán dispersadas para dar el nuevo inicio de su ciclo infeccioso. El tiempo transcurrido desde la infección hasta la producción de esporas se denomina periodo de latencia (Rivillas, *et.al.*, 2011).

2.2.4. Sintomatología

La enfermedad, durante la fase inicial de su desarrollo, se caracteriza por la presencia de pequeñas manchas redondas cloróticas y traslucidas de aproximadamente 1-3 mm de diámetro, localizadas en el envés de las hojas. En el haz, las hojas afectadas presentan manchas de una tonalidad aceitosa. Las lesiones gradualmente van incrementando su tamaño hasta alcanzar alrededor de 1 cm de diámetro, tomando en el envés un aspecto polvoriento de una tonalidad amarillo-anaranjada. Esta coloración se debe a la presencia de miles de uredósporas que constituyen las unidades reproductivas del patógeno. Lesiones con estas características se denominan comúnmente pústulas, las que con el tiempo se agrupan unas con otras pudiendo llegar a cubrir gran parte del área foliar de los cafetos afectados (Subero, 2005).

2.2.5. Daños de la roya del café

Las variedades arábicas son susceptibles a los ataques de la roya del café porque carecen de resistencia genética a la enfermedad; por tanto, ocasiona una disminución fuerte en la economía energética de la hoja quien es responsable de los procesos vitales como fotosíntesis, respiración y transpiración; de manera que afecta directamente al llenado y maduración del fruto (Campos, 2015). Si la roya del café ataca en etapas tempranas puede presentar reducción en el rendimiento; sin embargo, si la infección se presenta en etapas tardías, los daños se presentarán en los niveles de amarre de fruto del siguiente ciclo de cultivo (Campos, 2015).

2.2.6. Progreso de la enfermedad

La roya del café puede convertirse en epidemia cuando se esparce rápidamente y con alta frecuencia entre los individuos de un área de la siguiente manera:

Fase lenta. - La epidemia inicia con una infección en unas pocas hojas y no se visualizan los síntomas, sino que después de haber ocurrido el proceso de incubación del hongo se presenta en la hoja como una mancha pálida translúcida que se nota contra la luz y se observa la apariencia de una gota de aceite y los índices de infección son menores del 10 % en las hojas de café que son parte del inóculo residual (primario) que se mantuvo en las hojas durante la época de sequía (Campos, 2015).

En época de lluvia se producen los primeros soros que liberan nuevas esporas, las cuales permitirán la presencia de la roya del café en menos de 10 de cada 100 hojas en la planta (Rivillas *et.al.*, 2011).

Fase rápida o explosiva. - Es producto de los procesos de incubación y esporulación iniciados en la fase lenta, donde la roya del café inicia su dispersión de manera acelerada produciendo gran cantidad de inóculo, dispersándose dentro del árbol y entre los árboles del lote. En el período de 2 a 3 semanas la enfermedad puede llegar a estar presente en 30 o más hojas de cada 100 hojas de café de la planta (Rivillas *et al.*, 2011).

Fase terminal o máxima. - En esta fase la epidemia alcanza su máximo desarrollo llegando a su etapa final, las hojas de la planta de café que son atacadas severamente van cayendo debido a la alta severidad, de manera que reduce el número de hojas sanas como para continuar con la alta tasa de infección y reproducción, por lo que permite a la

enfermedad llegar a su máximo por agotamiento del hospedero y la epidemia termina (Rivillas *et al.*, 2011).

2.3. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad

La roya del cafeto está relacionada con factores bióticos (condiciones del hospedante) y factores abióticos (ambiente), los cuales se describen a continuación:

2.3.1. Factores bióticos

Existen variedades que poseen genes específicos de resistencia, las cuales si son infectadas por la raza de hongo no compatible se forma una zona de tumefacción que evita el avance del micelio, por lo tanto, no se presenta esporulación y el proceso de reproducción se interrumpe reduciendo el inóculo potencial (Subero, 2005).

Se ha determinado que a mayor área foliar mayor es el nivel de infección, por lo que a los cafetos con baja y alta densidad foliar se produce niveles máximos de 2 y 7 lesiones por hoja (Calderón, 2012).

2.3.2. Factores abióticos

La roya del cafeto realiza su ciclo biológico por la influencia de varios factores que se describen de la siguiente manera:

Lluvia, rocío, nubosidad y viento.- La lluvia es un factor que inicia la fase de liberación de las uredósporas a corta distancia, y a su vez; ayuda en la germinación hasta la penetración en la hoja del café, es decir, el ciclo del hongo se desarrolla en la época de lluvias; sin embargo, la lluvia no es el único factor que influye en el desarrollo de la roya del café sino que existen otras fuentes de agua libre como el rocío, que también facilita la germinación de esporas, y la nubosidad, que impide la germinación de las esporas de café porque no tiene contacto con la lluvia, y adicionalmente el viento, que permite la dispersión en seco de las esporas (Subero, 2005).

Temperatura. - Temperaturas de 22 °C a 24 °C son apropiadas para la germinación de las uredósporas; por encima de ellas se afecta más severamente la germinación que por debajo de estas. Temperaturas por debajo del óptimo 15 °C tienden a inhibir el crecimiento del hongo, prolongando el tiempo de germinación de las uredósporas, la formación de apresorios y la penetración y colonización del hospedante, haciendo más

largo el ciclo epidémico. En temperatura por encima del óptimo 28 °C se altera el metabolismo y disminuye el poder germinativo (Subero, 2005).

Efecto de luz. - La luz es un factor determinante sobre la germinación de las uredósporas del hongo, donde la ausencia de luz estimula la germinación y el crecimiento del tubo germinativo. Unas intensidades lumínicas superiores a 26,9 Lux reducen gradualmente el desarrollo de las lesiones y la germinación; en cambio, el período de oscuridad para alcanzar un máximo de germinación es de cuatro horas, siendo necesario nueve horas para un máximo de infección (Subero, 2005).

Efecto de humedad. - La disponibilidad de agua o balance hídrico es un factor que indirectamente influye sobre el desarrollo de la enfermedad, en función de la cantidad de tejido susceptible y disponible a la infección (Subero, 2005).

2.4. Principales microorganismos usados como agentes de control biológico

La introducción de microorganismos antagonistas, adaptados al micro hábitat de los fitopatógenos, es uno de los aspectos más relevantes para el éxito de un programa de control biológico (Hermosa *et al.*, 2012). En dicho contexto, diversos microorganismos se aíslan y seleccionan para ser usados como agentes biocontroladores de enfermedades en plantas (Kumar *et al.*, 2013). Por ello es importante aislar, propagar y evaluar cepas nativas, que ya están adaptadas a las condiciones ambientales de un determinado lugar. En el caso de hongos, los más utilizados en un programa de biocontrol son los de la clase *Hyphomycetes* (Gupta *et al.*, 2014), en las cuales se encuentra la especie del género *Trichoderma* (Villarino *et al.*, 2015; Zeilinger *et al.*, 2016).

2.5. Características generales de *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* comprenden un gran número de variantes de hongos, importantes principalmente como agentes de control biológico de enfermedad en plantas (Kumar *et al.*, 2015a). *Trichoderma* spp. (Teleomorfo: *Hypocrea*) es un habitante natural de los suelos, que se encuentra en todos los ecosistemas, colonizador de raíces; posee varios mecanismos de acción, utilizados para el control de enfermedades causadas por fitopatógenos, tales como: antibiosis, micoparasitismo, competencia, lisis, inducción a resistencia y promotor del crecimiento vegetal (Dinesh y

Prateeksha, 2015; Jiang *et al.*, 2016). Además de su importancia agronómica, los hongos del género *Trichoderma* actúan como descomponedores primarios de la materia orgánica (Amini *et al.*, 2015). El género se destaca por un rápido crecimiento, esporulación profusa, capacidad de crecimiento en diferentes sustratos y tolerancia a compuestos nocivos (Munir *et al.*, 2013; Cummings *et al.*, 2016).

2.5.1. Taxonomía del género *Trichoderma*

Casi todas las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y emiten grandes cantidades de pequeños conidios verdes o excepcionalmente hialinos, formados a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas (Munir *et al.*, 2013). Los conidióforos son muy ramificados (asemejándose a arbustos con forma piramidal) y están tabicados, y sus células contienen más de un núcleo. Los conidios son ovoides, con pared normalmente lisa (ocasionalmente rugosa) y un solo núcleo. En determinadas condiciones de estrés, ya sea nutricional o por desecación, el micelio se diferencia en unas estructuras asexuales de resistencia denominadas clamidosporas. Estas estructuras son globosas, con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, y tienen gran importancia en la supervivencia del hongo (Chaverri y Samuels, 2003).

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Persoon en 1794. La taxonomía se basó en criterios morfológicos, lo que supuso una gran confusión e imprecisión, debido a su gran similitud fenotípica, a la hora de asignar nombres a las nuevas especies (Schuster y Schmoll, 2010). El primer estudio importante, basado en criterios morfológicos, lo realizó Rifai (1969) quien estableció un cierto orden al género y definió nueve agregados específicos. Más tarde, Bisset (1991) revisó las especies de *Trichoderma* existentes y propuso cinco nuevas secciones dentro del género: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* e *Hypocrearum*.

La identificación según sus características culturales y morfológicas resultó una técnica laboriosa, con claves taxonómicas detalladas, técnicas de microscopía, con bastante conocimiento del género *Trichoderma* (Chaverri y Samuels, 2003; Druzhinina *et al.*, 2006). Desde entonces se han utilizado otros criterios para aclarar la situación taxonómica de *Trichoderma*: los perfiles de isoenzimas (Galarza *et al.*, 2015; Asis y Siddiquee, 2016) o distintas características fisiológicas o bioquímicas (González *et al.*, 2012; Cardoso Lopes *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2013).

2.5.2. Control biológico con *Trichoderma* en diferentes ambientes

Una de las características más interesantes de las poblaciones de *Trichoderma* es que tienen capacidades metabólicas muy diversas (Schuster y Schmoll 2010; Dinesh y Prateeksha, 2015). Las especies de este género son capaces de transformar una amplia variedad de materia orgánica de origen natural y xenobiótico, mediante la producción de gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan distintos tipos de polímeros, entre ellos polisacáridos como la celulosa, la quitina, la laminarina, la pectina, el almidón y el xilano (Kamala y Devi, 2012; Hermosa *et al.*, 2012; Knudsen y Dandurand, 2014; Vinale *et al.*, 2014). Debido a esto, las especies del género *Trichoderma* son los microorganismos de mayor interés biotecnológico y medioambiental (Gupta *et al.*, 2015; Kamala *et al.*, 2015).

Además de que *Trichoderma* coloniza las raíces de las plantas genera resistencia sistémica, y controlan a su vez ciertos patógenos aéreos (Martínez *et al.*, 2013; Panwar *et al.*, 2014). Otros trabajos demuestran la capacidad del hongo para destruir estructuras de resistencia y propagación de hongos fitopatógenos, como los esclerocios de *Sclerotinia cepivorum* Berk por *T. viride* (Gupta *et al.*, 2015). También ha sido empleada como recubrimiento de semilla, lo que evita la caída de plántulas (Kumar *et al.*, 2015b), o como inóculo para diversos sustratos, lo que reduce las enfermedades producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* W.C. Snyder & H.N. Hansen, y *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (Khan *et al.*, 2014).

Trichoderma ha demostrado ejercer un efecto promotor sobre el crecimiento vegetal (Brotman *et al.*, 2013) Esto podría ser provocado por la capacidad de *Trichoderma* de solubilizar metales, como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos en nutrientes asimilables por las plantas (Martínez *et al.*, 2013). Otro efecto indirecto podría ser la eliminación de la rizosfera, patógenos de menor incidencia, como es el caso de *Pythium*, sin los cuales las plantas alcanzarían su máximo potencial de desarrollo (Anoop y Bhai, 2014; Kumar *et al.*, 2015b). También produce un estímulo en el crecimiento (Brotman *et al.*, 2013; Srinivasa *et al.*, 2015). Existen evidencias de que hay factores difusibles, aún no identificados, que intervienen en el desencadenamiento de la respuesta de la planta (Hermosa *et al.*, 2012; Kamala y Devi, 2012).

El olor característico de ciertos aislados de *Trichoderma* proviene de una sustancia llamada 6-pentil- α -pirona, un compuesto volátil con buenas perspectivas para su uso en el biocontrol (Knudsen y Dandurand, 2014; Vinale *et al.*, 2014). Este compuesto ha demostrado tener actividad antifúngica y ser promotor del crecimiento vegetal (Srinivasa *et al.*, 2015).

2.6. Investigaciones realizadas en el control de la roya del café

Sucaticona (2018), en trabajo de investigación con el objetivo de la capacidad antagonista en cultivos *in vitro* de los hongos *Trichoderma* spp. y *Lecanicillium* spp. frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix*) aislados de las hojas de café y del suelo provenientes de los dos sectores de la provincia de Sandia en Perú, obtuvo resultados de diferentes tipos de hongos nativos de los cuales 5 tipos de hongos fueron identificados, así como *Trichoderma* spp. y *Lecanicillium* spp. y al hongo patógeno de la roya amarilla del café *H. vastatrix*, en cuanto al crecimiento del hongo de *Trichoderma* spp., hasta el llenado total de placa Petri, fue de 10 días, el crecimiento de este hongo inicia con una aparición de su micelio algodonoso de color blanquecino de forma circular y en la parte central empieza a tornarse de un color verde claro, las pústulas tienen una forma de cojín, solitarias y agregadas dispuestas en anillos concéntricos, al centro un verde pálido las colonias son algodonosas y la cara envés se observa de un color amarillo claro, microscópicamente también se muestran los conidióforos con una forma erecto hialino y ramificado y fiálides de color transparente.

El tiempo de crecimiento de *H. vastatrix* hasta el llenado de toda la placa Petri fue de 240 horas (10 días), su desarrollo inicia con un color naranja en la parte central y al borde con un color blanco algodonoso y con el tiempo comienzan a tornarse de un color naranja amarillento con una punta del micelio de color blanco. En cuanto al diámetro de crecimiento de los antagonistas del género *Trichoderma* spp., y *Lecanicillium* spp., frente a *Hemileia vastatrix* fue en un DCA presentando un diámetro de crecimiento máximo en las dos repeticiones significativo de 5.8 cm y 4.85 cm así mismo el otro hongo presentó un diámetro de crecimiento significativo de 5.2 cm y con una correlación de $r = 0.93$ lo cual indica que este género de hongo actuó de una forma positiva frente al hongo fitopatógeno *H. vastatrix*.

Rolz *et al.* (2013), observaron un posible antagonismo de *Trichoderma* sobre *Hemileia vastatrix* como resultado de una invasión de micelio de *Trichoderma* sobre la *H. vastatrix* en la lesión de la hoja, además (Vargas, 2014), observó una inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* por *Trichoderma harzianum* de 83,40%, *Trichoderma koningiopsis* con 77,45%, y de *Phyton 27* del 70,34%, así mismo indica que la inhibición del crecimiento radial de *Phoma terrestris* por *Trichoderma harzianum* fue de 86,86% , de *Trichoderma koningiopsis* fue 84,78% ; y de *Phyton 27* del 78,16% finalmente alcanzando un micoparasitismo de grado 4, por tal indica que pueden ser considerados como un recurso valioso en el control biológico de fitopatógenos.

Rodríguez & Veneros (2011), reportan que el hongo *T. harzianum* demostró en cultivos duales, ser un efectivo controlador biológico de hongos patógenos de frutos postcosecha de Carica “papaya”, inhibiendo el crecimiento del fitopatógeno mediante su capacidad antagónica, sin embargo Arbito (2017), estudio las pruebas de antagonismo de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp a tres temperaturas diferentes de 20, 25 y 30°C, en donde indica que el Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) fue entre el 40 al 78% así concluye que el hongo *Trichoderma* spp demostró su adaptabilidad a variaciones de temperaturas gracias a sus diversos mecanismos que les permite colonizar en diversos hábitats.

Guilcapi (2009), en trabajo de investigación con el efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café variedad caturra a nivel del vivero, obtuvo un 100 % de germinación a los 20 días de haber ubicado las semillas de café en cajas petri, esto se debió a que las semillas se encontraban viables, con pocos días de almacenamiento y con las condiciones controladas en laboratorio tanto en temperatura como de humedad, dándole un ambiente óptimo para este proceso y en cuanto a la emergencia se observó que el tratamiento con (*T. harzianum*) tuvo el 97,9 % con el mayor número de plantas emergidas, mientras TF (testigo finca) obtuvo el 83,8 % con el índice más bajo de emergencia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

La investigación se la realizó en el período comprendido desde agosto de 2019 a marzo de 2020, y se desarrolló en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, Ecuador.

La provincia de Loja, Ecuador, se encuentra al sur de la sierra ecuatoriana entre los $03^{\circ} 19' 46''$ a $04^{\circ} 45' 54''$ de latitud sur y $79^{\circ} 05' 86''$ a $80^{\circ} 29' 58''$ de longitud oeste. El área total que ocupa es de $10\,790\text{ km}^2$, equivalente al 4 % de la superficie total del Ecuador (IGME, 2015). Debido a su relieve característico y su marcada posición entre la cuenca húmeda amazónica y el desierto costero de Sechura del Perú, la provincia de Loja muestra una gran variedad de climas, y como resultado numerosas zonas ecológicas, cada una caracterizada por su vegetación típica (Valarezo, 2004).

La zona de estudio se localizó en un lugar representativo en el cultivo de café en SAF (Sistemas Agroforestales) de la provincia de Loja: Chaguarpamba tiene una extensión territorial de $311,7\text{ km}^2$, con una altitud promedio de 1490 msnm su temperatura promedio es de 24°C (Figura 1). Dentro de esta zona se seleccionaron tres sectores al azar y en cada sector se recolectaron muestras de suelo de la rizosfera y 10 hojas con pústulas de roya de color naranja intenso (estado intermedio) y lesiones completamente desarrolladas con apariencia naranja pálido (estado avanzado). La zona seleccionada para los muestreos fue georreferenciada mediante la utilización del Sistema de Posicionamiento Global (GPS) y ArcGis versión 9 (Anexo 1).

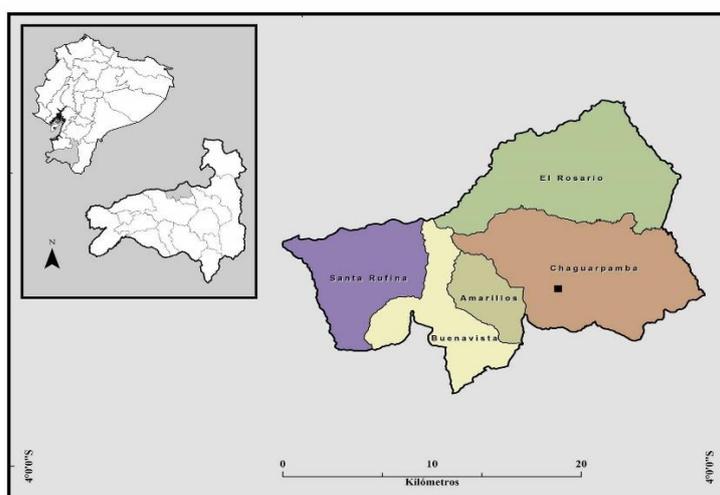


Figura 1. Ubicación geográfica del sitio de muestreo en el cantón Chaguarpamba

3.2. Materiales

Equipos: estufa de convección natural MEMMERT BE 400, balanza analítica, cámara de flujo laminar, agitador vórtex, incubadora digital (Poleko Serie: SN5SE111205, Polonia), Esterilizador de vapor de alta presión autoclave Vertical 35 litros LS-35LD, micropipeta, incubadora Shaker (Heidolph, 111206890, Polonia), microscopio (Olympus Serie: ID81517, Alemania).

Material de laboratorio: vaso de precipitación, pinza metálica, bisturí, papel de filtro estéril Whatman # 1, tubos de ensayo, placas de Petri, Erlenmeyer, asas plásticas y metálicas, sacabocados de 1 mm, bisturí Cámara de Neubauer, tubos eppendorf, Los contenedores de (18 x 12) cm

Sustancias: agua destilada, alcohol al 70 %, hipoclorito de sodio al 0,5 y 1 %,

Insumos: Glucosa, Agar, Caldo Papa Dextrosa (CPD) y papa.

De campo: fundas ziploc, pala, podadora.

Programas: IBM-SPSS Statistics versión 22, imagen J 3.0.

3.3. Metodología del primer objetivo “Identificar mediante características morfoculturales los aislados de *Trichoderma spp*”.

3.3.1. Sitios de muestreo

Las muestras utilizadas para la presente investigación se obtuvieron del suelo rizosférico, colectados en la provincia de Loja en un lugar representativo del cultivo de café en SAF Chaguarpamba. En el sitio de muestreo se colectaron tres muestras al azar de aproximadamente 1 kg de tierra a 10 cm de profundidad, descartado los primeros 5 cm de superficie de suelo. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico (ziploc) al Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, donde las muestras se mezclaron, homogenizaron y se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

3.3.2. Características morfoculturales

Los hongos rizosféricos se aislaron mediante la técnica de diluciones seriadas o decimales (El-Komy *et al.*, 2015), la cual consistió en diluir 1 g de suelo en un tubo de ensayo de vidrio, con 9 mL de agua destilada estéril; seguidamente, se agitó durante cinco minutos. De la primera dilución se tomó 1 mL y se depositó en un tubo de ensayo con tapa rosca, que contenía 9 mL de agua destilada estéril, se agitó durante 30 segundos en un agitador vórtex. Este procedimiento se repitió cinco veces, hasta obtener la solución 10^{-5} , colocar en el vórtex constantemente para que el suelo no se asiente en el tubo y se etiqueto adecuadamente las muestras.

Se preparó medio PDA (Papa Dextrosa Agar) para un litro de medio de cultivo para hongo: en un recipiente se realizó el pelado de papa, luego se realizó el pesado 250 g, luego lavarlas, cortarlas en trozos y hacerlas hervir en 500 mL de agua destilada y tratar de aplastar los trozos grandes de papa tratando de que quede echo puré y luego se filtró, en un vaso de precipitación con 500 mL de agua destilada diluir 18 g de agar y 10 g de glucosa, luego se mezcló con el caldo de papa y se procedió a distribuirlos en un matraz de 1000 mL esto se llevó al autoclave a una temperatura de 120 °C durante 15 min a 14 libras de presión (Cañedo, 2004).

De las soluciones 10^{-5} , con la ayuda de la micropipeta se tomó 1 mL de los tubos de ensayo y se colocaron en placas de Petri con medio selectivo PDA (agar papa dextrosa) (El-Komy *et al.*, 2015), enseguida se incubó las placas de Petri a 28 °C por 48 horas.

Crecieron varias colonias de hongos, algunas con características morfológicas propias del genero *Trichoderma* spp., como es la coloración verde brillante (Michel-Aceves, 2001). Los hongos que crecieron fueron aislados y purificados con ayuda de una Asa bacteriológica en placas de Petri con medio PDA (agar papa dextrosa).

Una vez obtenidas las cepas puras de *Trichoderma*, con la ayuda de un sacabocados de 1 mm de diámetro se aisló en 10 cajas con medio PDA (agar papa dextrosa) después se incubo a 28 °C, para revisar sus características morfológicas macroscópicas cada 24 horas, tomando en cuenta su aspecto, color, diámetro y superficie de la colonia desarrollada en medio PDA. (Chaverri y Samuels, 2003, Insaurrealde *et al.*, 2017).

3.3.3. Conteo de esporas de *Trichoderma*

Se preparó Caldo Papa Dextrosa (CPD) para un litro de medio de cultivo para hongo: en un vaso de precipitación diluir 24 gr de (CPD) en 1000 mL de agua estéril, luego se llevó a la autoclave a una temperatura de 120 °C durante 15 min a 14 libras de presión (Cañedo, 2004).

Para el conteo, medición y caracterización de las estructuras reproductivas (micro conidios) se utilizó 10 tubos de ensayo con 5 mL de Caldo Papa Dextrosa (CPD), en los cuales se realizó el raspado de las cajas Petri que tenían *Trichoderma* y se las colocó en tubos de ensayo que contienen CPD y se incubaron a 28 °C a 250 rpm en una incubadora tipo Shaker por 120 horas. Después de observar un buen crecimiento del aislado y trascurrido las 120 horas de incubación en medio líquido, se filtró 1 mL de cada una de los aislados en tubos eppendorf, una vez obtenida la suspensión de esporas, se prosiguió al conteo de las Unidades Formadoras de Colonias, utilizando una Cámara de Neubauer en un microscopio, se realizó el conteo de la cantidad de conidios con un aumento de 40x. Para el cálculo de la concentración final de UFC se utilizó la formula descrita por Rojas-Triviño (2011).

$$CCN = \sum n (5 \times 10\ 000)$$

Dónde: **CCN** = Concentración en la cámara de Neubauer; $\sum n$ = Suma del conteo de celdas en los cinco cuadrantes en la cámara de Neubauer; (5 X 10 000) = Constante

3.3.4. Medición de esporas de *Trichoderma*

Luego se realizaron mediciones de 100 microconidios elegidas al azar para determinar el tamaño promedio de las mismas (Vengadaramana y de Costa, 2014).

El valor micrométrico usado fue de 1 µm en el objetivo de 40x y de esta forma se determinó el tamaño de las estructuras reproductivas.

Se utilizó la formula TCR (mm/día) propuesta por Baldrian y Gabriel (2002), para el cálculo de los valores correspondientes

$$TCR = \frac{(Df - Di)}{(Tf - Ti)}$$

Dónde: **TCR**: Tasa de crecimiento radial; **Df**: Diámetro final (mm); **Di**: Diámetro inicial (mm); **Tf**: Tiempo final (días); **Ti**: Tiempo inicial (días)

Los valores de diámetros inicial (**Di**) y final (**Df**), así como los tiempos iniciales (**Ti**) y final (**Tf**) correspondieron a la diferencia de un día en crecimiento y tiempo transcurrido.

En el análisis estadístico se utilizó el paquete IBM-SPSS Statistics versión 22. Se evaluó la tasa de crecimiento radial (TCR), cuantificación y mediciones de las estructuras reproductivas. En todos los casos se verificaron los supuestos de homogeneidad y normalidad de las varianzas, en caso de cumplirse los supuestos, se realizaban pruebas paramétricas, con el análisis del ANOVA y la posterior comparación de medias, mediante prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) (Leech *et al.*, 2005).

3.4. Metodología para el segundo objetivo “Evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de *Trichoderma* spp. para el control de la roya bajo condiciones *in vitro*”

3.4.1. Desprendimiento y variables evaluadas para la eficacia del biocontrol

Con la *Trichoderma* ya caracterizada en las placas de Petri, nos trasladamos a la cámara de flujo laminar y desprendimos de 5 placas de Petri la *Trichoderma* y se colocó en 60 mL de agua destilada, luego realizamos el conteo en la cámara de Neubauer, la cual se le añade 10 μ L de la muestra para una mejor visualización, en la cual contaremos en los cinco cuadrantes. El cálculo de la concentración final de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó la fórmula descrita por Rojas-Triviño, (2011).

$$CCN = \sum n (5 \times 10\ 000)$$

Dónde: **CCN** = Concentración en la cámara de Neubauer; $\sum n$ = Suma del conteo de celdas en los cinco cuadrantes en la cámara de Neubauer; (5 X 10 000) = Constante

3.4.2. Desprendimiento, desinfección e inoculación de hojas de café

De las hojas recolectadas se desprendió la roya con la ayuda de un bisturí y se las vertió en 5 mL de agua destilada en un tubo de ensayo la cual se la sometió a vortex para que se homogenizara la muestra, luego nos dirigimos hacer un conteo de las uredósporas en la cámara de Neubauer, la cual se le añade 10 μ L de la muestra para una mejor visualización, en la cámara contaremos en los cinco cuadrantes con un aumento de 40x.

El cálculo de la concentración final de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó la fórmula descrita por Rojas-Triviño, (2011).

$$CCN = \sum n (5 \times 10\ 000)$$

Dónde: **CCN** = Concentración en la cámara de Neubauer; $\sum n$ = Suma del conteo de celdas en los cinco cuadrantes en la cámara de Neubauer; (5 X 10 000) = Constante

Desinfección e Inoculación de hojas de café para eliminar cualquier agente patógeno de las 100 hojas se desinfectaron sumergiéndolas durante 45 segundos en alcohol al 70 % y 45 segundos en hipoclorito de sodio al 0,5 %, luego se realizó un triple lavado en agua destilada para eliminar cualquier residuo (Shiomi *et al.*, 2006).

Una vez desinfectadas las hojas, se las llevó a la cámara de flujo laminar y se las colocó con una pinza en los contenedores de (18 x 12) cm que contenían papel filtro esterilizado ya humedecido.

Al momento de la inoculación para el primer tratamiento (T1) se utilizó una concentración de 1×10^6 uredósporas por mL, con la ayuda de la micropipeta se le añadió a cada hoja 240 μ L de *H. vastatrix* con 50 repeticiones. Para el tratamiento (T2) se utilizó una concentración de 1×10^6 uredósporas por mL con la ayuda de la micropipeta se le añadió a cada hoja 240 μ l de *H. vastatrix* a 50 repeticiones, a las 24 horas de haber aplicado la roya se le aplico 240 μ l de *Trichoderma*, para observar el efecto. Los contenedores de (18 x 12) cm con las hojas dentro se colocaron en una incubadora artesanal, se monitoreo cada 48 h, para observar las pústulas de roya y su control *Trichoderma* y también poder humedecer el papel filtro. Los tratamientos se mantuvieron a fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad.

3.4.2.1. Variables medidas sobre la hoja de café

Área de lesión (AL). -El AL se midió a partir de los primeros síntomas de lesión. Se tomaron fotografías de cada hoja, cada dos días y mediante el software Image J 3.0 se calculó el área en mm / hoja.

Es preciso resaltar que la metodología escrita anterior, se aplicó tanto para las hojas de café inoculada con roya, como para los inoculados con *Trichoderma*.

Modo de evaluación

Su evaluación comenzó el día 02-12-2019 y término el 16-12-2019 y el método que se utilizo fue evaluar cada 48 horas el tratamiento.

Se utilizó la formula eficacia del biocontrol

$$EB (\%) = \left[\frac{STB - STC}{STC} \right] \times 100$$

Dónde: **STC** es el índice de severidad en tratamiento control al final del periodo de evaluación y **STB** es el índice de severidad en tratamiento de biocontrol (Akram *et al.*, 2013).

3.5. Metodología para el tercer objetivo “Evaluar la contribución de los aislados de *Trichoderma* spp. como promotores del crecimiento vegetal bajo condiciones de invernadero

3.5.1 Desinfección e inoculación de la semilla de café con tres tratamientos

Para eliminar cualquier agente patógeno de las semillas de café se desinfectaron sumergiéndolas durante 60 segundos en hipoclorito de sodio al 1 %, luego se realizó un triple lavado en agua destilada para eliminar cualquier residuo (Shiomi *et al.*, 2006). Ya desinfectadas las semillas, se las llevó a la cámara de flujo laminar y se las colocó con una pinza en placas de Petri que tienen papel filtro esterilizado ya humedecido.

Al momento de la inoculación por inmersión de la semilla, para el tratamiento (T1) se utilizó agua destilada con 240 µl a cada semilla con 50 repeticiones. Para el tratamiento (T2) se utilizó una concentración de 1×10^6 uredósporas por mL, con la ayuda de la micropipeta se le añadió 240 µl de *Trichoderma* a cada semilla con 50 repeticiones. Para el tratamiento (T3) se utilizó una concentración de 25 gr de ANA (ácido naftalenacético), la cual se la disolvió en 60 mL de agua destilada y con la ayuda de la micropipeta se le añadió 240 µl a cada semilla con 50 repeticiones, a los tratamientos se los procedió a llevar a invernadero y se los monitoreo cada 48 h para ver el efecto de los tratamientos y humedecer las semillas de las placas de Petri (Shiomi *et al.*, 2006).

3.5.2. Evaluación del mejor aislado aplicados a las semillas de café

Se utilizó un invernadero artesanal (microtúnel) con plástico en el cual se evaluó cada 48 horas, desde su siembra el día 02 de diciembre del 2019 hasta el final de la evaluación el día 21 de febrero del 2020, se evaluó su porcentaje germinativo y se midió el crecimiento radicular CR (mm/día). Los datos obtenidos de la severidad se comprobaron por medio de análisis descriptivos (Leech *et al.*, 2005).

En el análisis estadístico se utilizó el paquete IBM-SPSS Statistics versión 22, y se utilizó análisis descriptivos en los casos que se lo requiera. Se analizó la TCR, cuantificación y mediciones de las estructuras reproductivas. En todos los casos se verificaron los supuestos de homogeneidad y normalidad de las varianzas, en caso de cumplirse los supuestos, se realizaban pruebas paramétricas, con el análisis del ANOVA y la posterior comparación de medias, mediante prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) (Leech *et al.*, 2005).

4. RESULTADOS

4.1. Resultado para el primer objetivo

“Identificar mediante características morfo-culturales los aislados de *Trichoderma* spp”

4.1.1. Características morfo-culturales

De los aislados del suelo rizosférico del cantón Chaguarpamba a 28 °C por 48 horas en incubadora, se encontraron tres hongos de los cuales se pudo identificar: *Trichoderma* spp, *Penicillium* spp y un hongo hiperparásito (sin confirmar molecularmente),

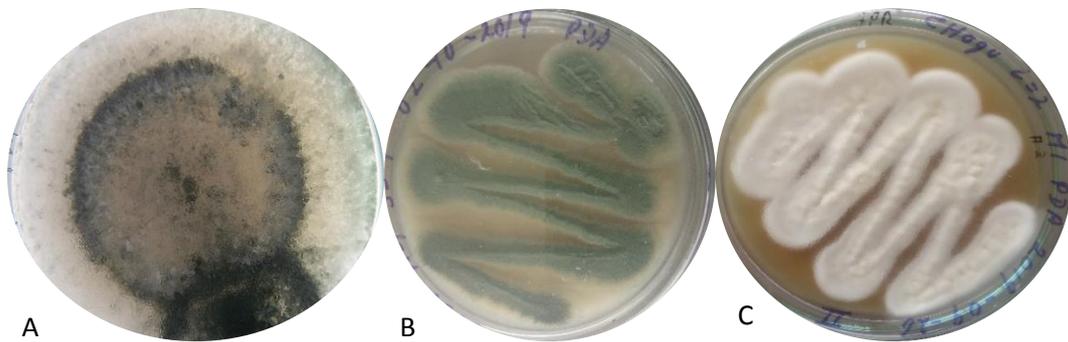


Figura 1. Identificación de los aislados *Trichoderma* spp (A), *Penicillium* spp (B) y un hongo hiperparásito (sin confirmar molecularmente) (C).

Las colonias de *Trichoderma* presentaron una expansión rápida a las 48 horas a 28 °C debido a que estuvo en su fase de crecimiento exponencial y asimilación de nutrientes en el cual se presentó un TCR 1.88 mm, con su micelio algodonoso y su color amarillo blanquecino tanto en anverso como en reverso, posteriormente a las 96 horas a 28 °C el micelio logro cubrir la superficie del medio de cultivo agar papa dextrosa con un TCR 0.9 mm (Figura 2), en el anverso de la caja de Petri observamos que *Trichoderma* aumento su proceso de esporulación tomando un color verde oliva de textura granular mientras que en el reverso de las colonias se pudo observar una coloración amarillo-blanquecino (Tabla 1), esto ocurre debido a la producción de cristales de color amarillento, podemos observar el crecimiento en las cajas de Petri como se muestra en el (anexo 3).

Tabla 1. Características morfo culturales de los aislados de *Trichoderma* spp colectados en la zona productiva de café en la provincia de Loja, Ecuador

Aislado / hora	Origen del aislado	Color de la colonia		Tipo de micelio	TCR (mm)
		Anverso	Reverso		
CHAGU / 48	Chaguarpamba	Amarillo-Blanquecino	Amarillo-Blanquecino	algodonoso	1.88a
CHAGU / 24	Chaguarpamba	Blanquecino	Blanquecino	algodonoso	1.015b
CHAGU / 72	Chaguarpamba	Blanco - Verdoso	Amarillo-Blanquecino	Algodonoso - granular	0.135c
CHAGU / 96	Chaguarpamba	Verde oliva	Amarillo-Blanquecino	granular	0.9c

Leyenda: Chaguarpamba (CHAGU), (n = 10).

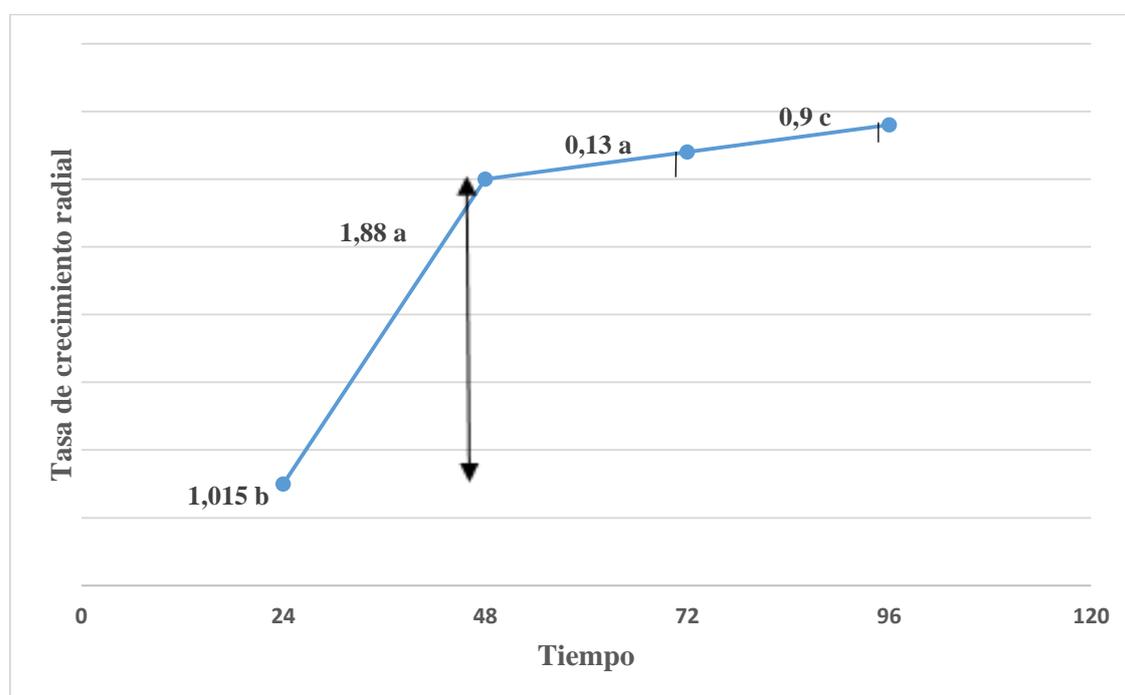


Figura 2: (TCR), tasas de crecimiento radial, las letras distintas en cada fila difieren según la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$), (n = 10).

4.1.2. Conteo de esporas de *Trichoderma*

En el conteo de esporas se puede observar que no existe una diferencia significativa en la cual se utilizó análisis descriptivo entre sus valores, siendo su valor menor 4.45×10^7 esporas / mL y su valor mayor es de 5.22×10^7 esporas / mL es los cuales se puede decir que los números de conidios por cada aislado no varía.

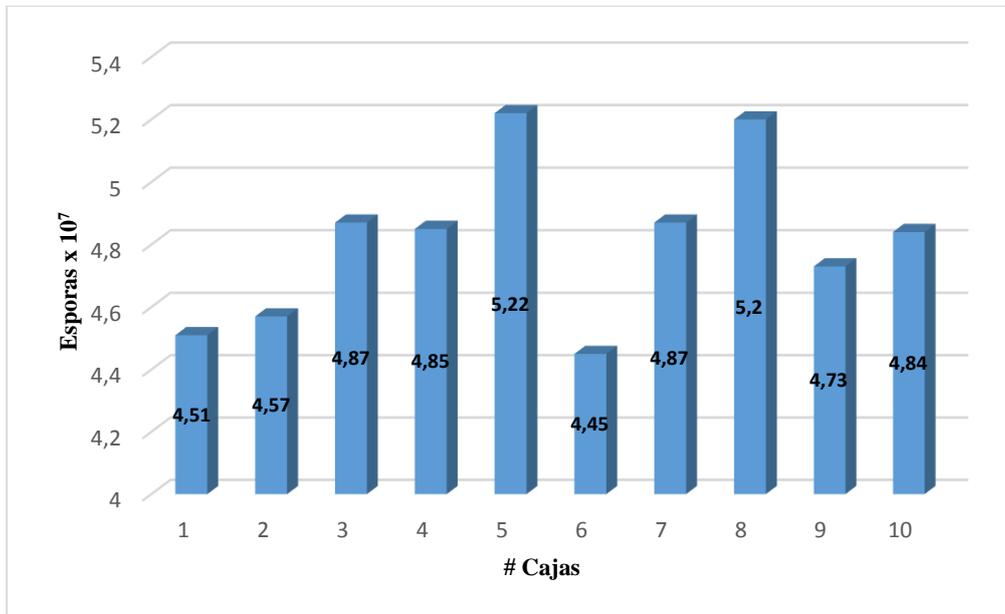


Figura 3: Conteo de esporas / mL en cada uno de los aislados

4.1.3. Medición de esporas de *Trichoderma*

Se observa que los microconidios a las 120 horas después de su siembra no tienen diferencia en cuanto a sus mediciones, sus esporas midieron de largo 6 y 6.5 mm y de ancho 5.75 y 6.5 mm estos valores no se encuentran diferencias uno de otros porque es la misma cepa de *Trichoderma* y del mismo sitio de muestro.

Tabla 2. Mediciones de las esporas de *Trichoderma* spp en el microscopio

Largo		Ancho	
10	6.5 a	8	6.5 a
9	6.5 a	7	6.5 a
4	6.5 a	6	6.5 a
3	6.5 a	9	6.25 a
1	6.5 a	5	6.25 a
8	6.25 a	2	6.25 a
6	6.25 a	10	6 a
5	6.25 a	4	6 a
2	6.25 a	3	6 a
7	6 a	1	5.75 a

Las letras en cada fila no difieren según la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) (n=100).

4.2. Resultado para el segundo objetivo

“Evaluar la capacidad biocontroladora de aislados de *Trichoderma* spp. para el control de la roya bajo condiciones *in vitro*”

4.2.1. Desprendimiento, desinfección e inoculación de hojas de café

En la figura 4, se observa que el hongo *Trichoderma* spp presenta a las 48 horas un porcentaje de biocontrol de 12 % mientras transcurre los días se va haciendo más visible el porcentaje de biocontrol, por lo mismo que a las 288 horas después de haber aplicado *Trichoderma* tenemos una eficacia de biocontrol de 93 % frente al crecimiento radial de roya (*H. vastatrix*), (anexo 4).

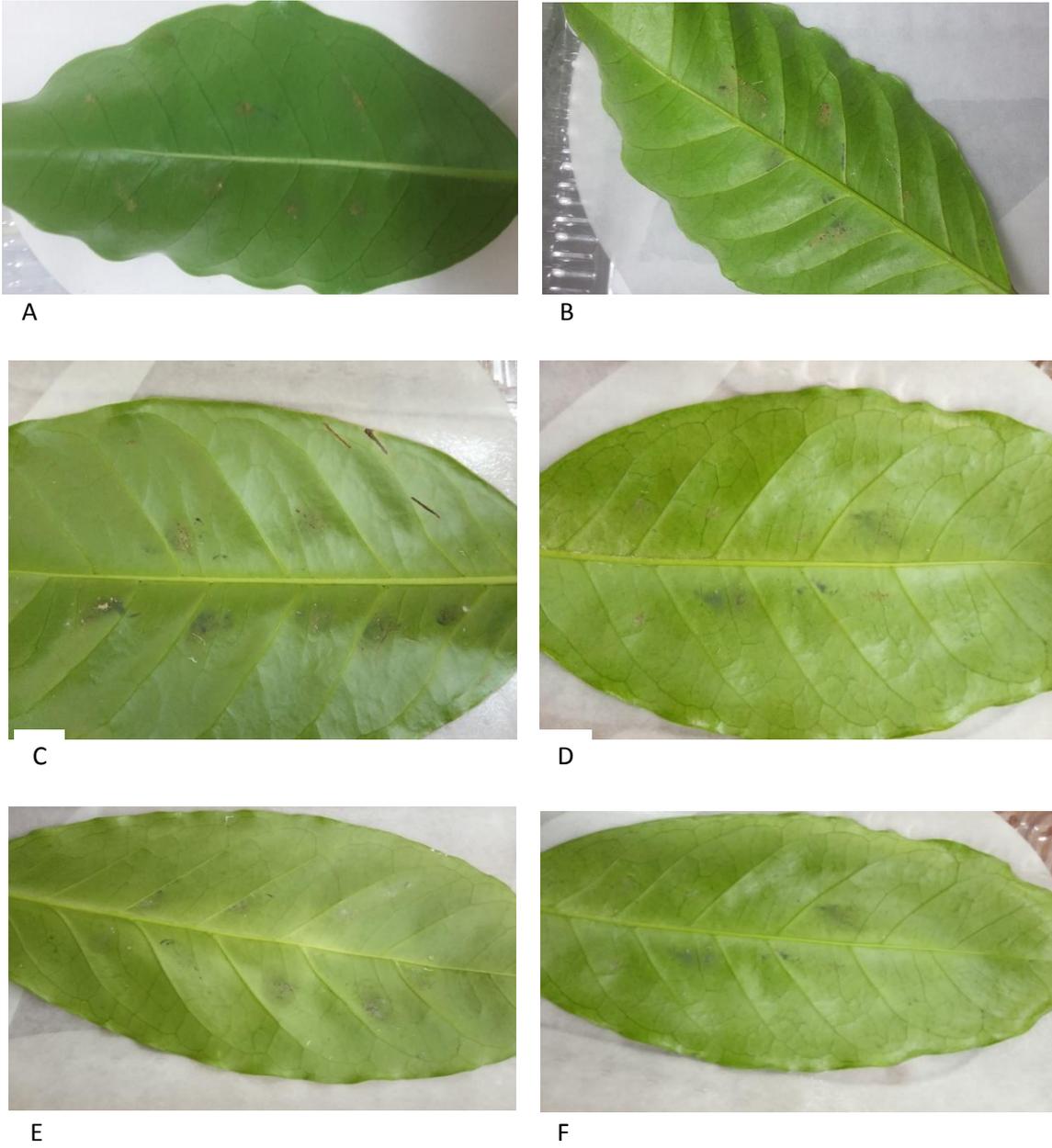


Figura 4. Análisis del biocontrol de *Trichoderma* spp sobre la roya bajo condiciones *in vitro*, figura: (A) 48 horas, figura: (B) 96 horas, figura: (C) 144 horas, figura: (D) 192 horas, figura: (E) 240 horas, figura: (F) 288 horas.

4.2.2. Desprendimiento y variables evaluadas para la eficacia del biocontrol

En la figura 5, se puede apreciar que a las 288 horas de haber aplicado *Trichoderma* tuvo un efecto positivo con un 93 % de efectividad ante la roya (*H. vastatrix*.)

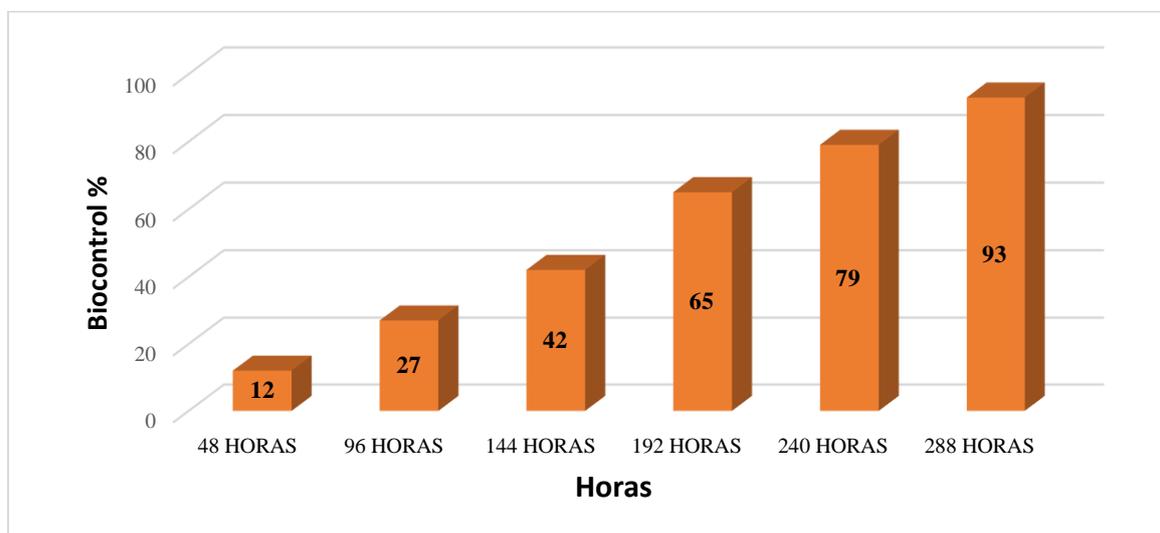


Figura 5. Eficacia del biocontrol de *Trichoderma* frente a roya (*H. vastatrix*)

4.5. Resultado para el Tercer Objetivo

“Evaluar la contribución de los aislados de *Trichoderma* spp. como promotores del crecimiento vegetal bajo condiciones de invernadero”

4.5.1. Desinfección Inoculación de la semilla de café con tres tratamientos

Al evaluar los diferentes tratamientos observamos que el mejor tratamiento (T1) es con agua con un porcentaje de germinación de 92 % mientras que el tratamiento (T3) ANA su poder germinativo es de 88 % y el tratamiento (T2) *Trichoderma* con un poder de germinación de 68% siendo este muy bajo en comparación de los otros tratamientos.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de las semillas de café con tres tratamientos en condiciones bajo invernadero

Tratamiento (T)	Germinación %
(T1) agua	92
(T2) <i>Trichoderma</i>	68
(T3) ANA	88

4.5.2. Evaluación del mejor aislado aplicados a las semillas de café

Basados en el crecimiento radicular y según los resultados de análisis estadístico, se logró identificar el mejor tratamiento de rápido crecimiento fue agua, el cual en el mes de enero tuvo una temperatura promedio de 22.3 °C con un CR 0.66 mm, ANA un CR 0.24 mm, mientras que *Trichoderma* en la primera semana se presentó un CR 0.00 mm. A los 77 días después de la siembra, final de la evaluación con una temperatura promedio del mes febrero de 22.5 °C el tratamiento con agua se obtuvo un CR 24.9 mm, ANA tuvo un CR 22.1 mm, en cambio *Trichoderma* obtuvo un CR 13.5 mm, se puede observar que *Trichoderma* tuvo un menor poder germinativo en comparación con agua y ácido naftalenacético, (anexo 5).

Tabla 4: Evaluación de los aislados de *Trichoderma* spp como promotor del crecimiento vegetal

		DDS										
		57	59	61	63	65	67	69	71	73	75	77
		CR	CR									
AGUA	1	0.66 a	1.6 a	3.56 a	4.96 a	6.86 a	10.6 a	12.8 a	15.3 a	20.4 a	22.6 a	24.9 a
ANA	3	0.24 b	0.86 b	2.32 a	3.52 a	4.94 a	8.48 a	10.5 a	12.7 a	17.8 a	19.9 a	22.1 a
TRICHO	2	0 b	0 c	0.54 b	1.38 b	2.38 b	4.94 b	6.1 b	7.42 b	10.6 b	12 b	13.5 b

Leyenda: Días después de la siembra (**DDS**), crecimiento radicular (**CR**), ácido naftalenacético (**ANA**), *Trichoderma* (**TRICHO**), las letras distintas en cada fila difieren según la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) (n = 150).

5. DISCUSIONES

Los suelos del cultivo de café en SAF del cantón Chaguarpamba de la provincia de Loja, mediante el aislamiento de suelo presentaron diferentes tipos de hongos. (Anexo 6) pero sin embargo solo un total de 3 tipos de hongos fueron identificados, así como *Trichoderma* spp, *Penicillium* spp y el hongo hiperparásito de la roya (aún sin confirmar molecularmente). Teniendo en cuenta estudios realizados anteriormente por Robles (2017) donde aisló y encontró cepas de *Trichoderma* spp en el cultivo de babaco en los suelos del cantón Loja, donde está presente en forma natural el hongo del género *Trichoderma*, lo cual coincide con lo reportado por Lani *et al.* 2014 quienes mencionan que se pueden obtener aislados de *Trichoderma* spp., en praderas, bosques, desiertos, en suelos de diferentes zonas climáticas, en materia vegetal muerta, en raíces, en semillas, entre otros.

La cepa pura de *Trichoderma* spp tuvo un crecimiento rápido, a las 48 horas presento una TCR de 1.88 mm esto debido a que el hongo tuvo una mayor capacidad de expansión por que se encontraba en su etapa juvenil, presentando un micelio algodonoso y su color amarillo blanquecino tanto en anverso como en reverso, a las 96 horas a 28 °C el micelio logro cubrir la superficie del medio de cultivo agar papa dextrosa. Estas características mencionadas son similares a lo descrito por Michel-Aceves (2001) en donde menciona que los géneros de *Trichoderma* se caracterizan por presentar conidióforo hialino muy ramificado y con una coloración verde blanquecino. Además, estudio realizado por Vallejo (2014) en el cantón de Ambato en los sustratos de quinua, arroz y cebada encontraron un crecimiento superior de 25.089 mm de TCD (Tasa de crecimiento diario) de *Trichoderma* spp en medio de cultivo agar papa dextrosa, mientras que, en los medios de Cultivo Maíz Dextrosa Agar y Trigo Dextrosa Agar, obtuvieron un crecimiento diario de 20,220 mm y 20,111 mm respectivamente. Asimismo, un estudio realizado en la Universidad Nacional del Antiplano de Perú por Sucaticona (2018), reporta un crecimiento y llenado total de la caja Petri en 10 días donde presento un buen crecimiento, con su coloración verde oscuro y con un micelio blanquecino algodonoso.

En cuanto al conteo de esporas de la cepa de *Trichoderma* spp se utilizó análisis descriptivo en la cual se presentó un 5.22×10^7 esporas / mL a los 5 días a 28 °C, estos resultados fueron superiores a los reportados por Poalacin (2015) en los que reporta el

máximo crecimiento, se obtuvo a los 12 días de incubación $1,5 \times 10^7$ esporas / mL a 25 °C y 28 °C mientras que cuando se trabaja a temperatura ambiente de 21°C donde se reporta $1,4 \times 10^7$ esporas / mL a los 14 días siendo esto significativo. Esto indica que cuando se modifica la variable temperatura varía el tiempo de producción de esporas *Trichoderma* spp.

En relación a la medición de esporas de *Trichoderma* spp, se obtuvo una medición de largo 6 y 6.5 mm y de ancho 5.75 y 6.5 mm donde no se encuentran diferencias significativas debido a que es una sola cepa, estas características mencionadas son similares a lo descrito por Michel-Aceves (2001) en donde indica que el género *Trichoderma* se caracteriza por presentar conidios hialinos de 1 célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales.

Dentro de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp en el control de la roya en condiciones *in vitro* se obtuvo una efectividad de 93 % a las 288 horas de aplicación, esto puede ser por la expansión rápida de *Trichoderma* spp que le da una ventaja en la competencia por nutrientes y espacio sobre la roya siendo esto resultados positivos lo cual coinciden con los resultados obtenidos por Fernández y Suárez (2009) y Martínez-Álvarez, *et al* (2012) quienes señalan que especies de *Trichoderma* producen sustancias antifúngicas que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos patógenos. Además, un estudio realizado en la Universidad Nacional del Antiplano en Perú por Chambe (2020), reporta datos de incidencia de roya con un 93.33 % y 90.67 %, donde *Trichoderma* no tuvo la actividad antagonista frente al hongo de la roya amarilla del café durante los 10 primeros días de aplicación.

Harman (2000), indica que el mecanismo de *Trichoderma* se inicia con una presión mecánica a la hifa del patógeno, retracción de la membrana plasmática de la pared, degradación de la pared celular por acción de quitinasas del antagonista, penetración a la hifa del patógeno y asimilación del contenido celular, desorganización del citoplasma y finalmente inhibe la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo.

En la germinación de las semillas de café se presentó mejores resultados con el tratamiento T1 agua con 92 %, seguido por T3 ANA con un 88 % y el T2 *Trichoderma* con un 68 % de poder germinativo, con una temperatura 22, 2 °C a los 57 días después de la siembra. Estos resultados fueron similares a los reportados por Santana, *et al* (2003) donde obtuvieron un porcentaje de germinación de 68,3 % y 65,8 % de

germinación con tratamientos de *Trichoderma* a los 60 días después de la siembra. Además, un estudio realizado por Guilcapi (2009) en el cantón Riobamba reporta un 100 % de germinación de semillas de café en un tiempo de 12 y 15 días donde las semillas se encontraban viables y por las condiciones controladas en el laboratorio en este caso los resultados son positivos porque *Trichoderma* es un hongo celulolítico y al degradar el pergamino que recubre el endospermo de la semilla acelera la germinación.

En cuanto a la emergencia de la raíz se midió por 4 semana cada 48 horas, y se pudo observar que el mejor tratamiento fue el tratamiento T1 agua en el cual se obtuvo un crecimiento radicular de 24,9 mm, seguido por el T3 ANA con un CR 22.1 mm y el T2 *Trichoderma* con un CR 13.5 mm de crecimiento radicular. Estos datos determinan que al incorporar agua directamente a las semillas se obtuvo los mejores resultados esto podría ser por un microclima controlado, en comparación con Guevara *et al*, (1992) reporta datos que los niveles de agua del sustrato no tuvieron mayor influencia sobre la germinación y que no se observó diferencias en la tasa de absorción de agua en presencia o ausencia.

En cuanto a la aplicación de *Trichoderma* se podría decir que, si estimula el crecimiento, pero el proceso es lento; esto concuerda con Benavides (2006), que al aplicar *Trichoderma* se obtuvo altos rendimientos a nivel de semillero en lo que corresponde a la etapa de emergencia; también Santana (2003), menciona que, al analizar el comportamiento de la germinación en café, se obtuvo los mayores porcentajes en los tratamientos con el hongo *Trichoderma*. Además, esto se corresponde con los resultados obtenidos por Rodríguez y Blanco (1992); Salazar y González (1994); Chung y Baker (1986); Viridi (1986); Dhanwant y Maninder (1985) y Cupull *et al* (2000). Quienes reportaron incremento en el crecimiento y desarrollo que se atribuyen a la obtención de un mayor desarrollo radical, estimulado por el complejo enzimático que se origina en la rizosfera de las plantas, en general todas las especies de *Trichoderma* son buenos productores de celulosa.

En el tratamiento T3 con ANA se obtuvo un crecimiento radicular de 22.1 mm, siendo estos resultados superiores en comparación con los resultados reportados por Cruz (2019), donde obtuvo un crecimiento de raíces de 1,75 mm.

6. CONCLUSIONES

- De la identificación de hongos del suelo del café en SAF del cantón Chaguarpamba: *Trichoderma* spp, *Penicillium* spp y el hongo hiperparásito (sin confirmar molecularmente) de la roya, se puede decir que *Trichoderma* spp. tuvo un crecimiento extraordinario con sus características propias como son micelio algodonoso y su color amarillo blanquecino tanto en anverso como en reverso.
- En el conteo de esporas de *Trichoderma* spp. se obtuvo valores elevados ya que este género se destaca por un rápido crecimiento, esporulación profusa, capacidad de crecimiento en diferentes sustratos y tolerancia a compuestos nocivos.
- Al evaluar la capacidad biocontroladora en hojas in vivo de *Trichoderma* spp obteniendo buenos resultados como control para *Hemileia vastatrix* a las 288 horas de aplicación, con una eficacia de biocontrol de 93 % inhibiendo el crecimiento radial de la roya esto puede ser porque *Trichoderma* spp. tiene sustancias antifúngicas.
- En relación al porcentaje de germinación de la semilla con el tratamiento T1 agua, T2 *Trichoderma* y T3 ANA, se observó que el mejor tratamiento fue con la aplicación de agua.

7. RECOMENDACIONES

- En la fase de germinación de las semillas se recomienda evaluar con nuevas concentraciones de agua, ANA y *Trichoderma*, más elevadas a las que se aplicaron en el proyecto de investigación y aplicar *Trichoderma* spp al cultivo de café cuando el porcentaje de incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* se encuentre en primera fase (inicial).
- Realizar la aplicación del hongo antagonista *Trichoderma* al cultivo de café establecido en el campo para observar el comportamiento del hongo antagonista frente a la roya esto con la finalidad controlar *Hemileia vastatrix*.
- Realizar más trabajos de investigación de *Hemileia vastatrix* y *Trichoderma* spp en el cultivo de café, como por ejemplo cepas nativas de *Trichoderma* de la zona en diversos sustratos como pulpa de café, cascara de naranja, granos maíz, rastrojos de cosecha, etc.
- Divulgar los resultados del presente proyecto de investigación debido a que es una buena posibilidad desde un punto de vista orgánico y preventivo para el medio ambiente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional USAID (2013). Del Pueblo de los Estados Unidos de América. Enmienda al eg-persuap inclusión de fungicidas para el control de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.).
- Akram W, Hussain Z, Ahmad N, Hussain I. 2013. Does agriculture credit affect production efficiency? Frontier production function approach. Pakistan Economic and Social Review, 51, 179–190
- Amini Y., Mohammadi A. y Zafari D. (2015). Identification of *Trichoderma* species in south Khorasan province, eastern desert region of Iran. International Journal of Biosciences. pp. 224-229.
- Andreu, R. C. y S. R Cupull (2000): Un manejo integrado de *Alternaria solani* causante de la Alternariosis del tomate.
- Anoop K. y Bhai S. (2014.). Evaluation of antagonistic potential of indigenous *Trichoderma* isolates against *Pythium aphanidermatum* (edson) fitz. causing rhizome rot in turmeric (*Curcuma longa* L.). Journal of Science. pp. 99-105.
- Arbitto, M. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. Tesis, pag. 1-76.
- Asis A. (2016) y Siddiquee S. Identification of *Trichoderma* species from wet paddy field soil samples. Transactions on Science and Technology. pp. 1-7.
- Avelino, J., y Rivas, G. G. (2013). La roya anaranjada del cafeto.
- Badii, M. H., L. O. Tejada, A. E. Flores, C. E. Lopez y H. Quiróz. 2000. Historia, fundamentos e importancia. pp. 3-17. En: M. H. Badii, A. E. Flores y L. J. Galán (eds.). Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico. Universidad Autónoma de Nuevo Leon (UANL), Monterrey.
- Baldrian P. y Gabriel J. Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. Mycologia. 94 (3): 428-36. 2002.
- Barnett H. y Hunter B. (1987) Illustrated genera of imperfect fungi. 4ta. Edición. Editorial MacMillan Publishing Company. Estados Unidos de América. p. 234.
- Benavides, 2006 Evaluación de Solarización y *Trichoderma harzianum* para el control de *Sclerotinia Sclerotium* de Bary, y el complejo Damping off, *Fusarium* spp., *Phyitium* spp., en lechuga (*Lactuca sativa*) in vitro y en semillero. Tesis para optar por el título de Ingeniería Agronómica. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Facultad de Recursos Naturales. Chimborazo, Ecuador p. 37
- Bissett J. A. (1991). revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany. pp. 2418-2420.

- Brotman Y., Landau O., Cuadros-Inostroza A., Takayuki T., Fernie A., Chet I., Viterbo A. y Willmitzer L. (2013). *Trichoderma*-Plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLOS Pathogens*. pp. 1-15.
- Calderón, G. (2012). Epidemiología de la roya del café causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., en la región central y sur occidental de Guatemala, C.A. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Agronomía Instituto de Investigaciones Agronómicas. Guatemala. p. 35.
- Campos, O. (2015). Manejo integrado de la Roya anaranjada *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Boletín Técnico (Centro de Investigación en Café) CEDICAFÉ. Guatemala.
- Cardoso Lopes F., Steindorffa A., Geraldine A., Brandão A., Monteiro V., Júnior M., Coelho A., Ulhoa C. y Silvae R. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biología fúngica*. pp. 815- 824.
- Casanova-Lugo, F., J. Petit-Aldana, F. Solorio-Sánchez, D. Parsons, and L. Ramírez-Avilés. (2014). Forage yield and quality of *Leucaena leucocephala* and *Guazuma ulmifolia* in mixed and pure fodder banks systems in Yucatan, Mexico. *Agrofor. Syst.* pp. 29-39
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., y Aguilar, C. (2015). Efectividad *in vitro* de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, pp. 49-562.
- Chambe Elva (2020). Control Biológico (*Trichoderma* spp.) y químico de roya amarilla (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) del cafeto (*Coffea arabica* L.) en la provincia de Sandia. Tesis para optar por el título de ingeniero agrónomo. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ciencias Agrarias. Puno, Peru. pp 48-57
- Chandra M., Kalra A., Neelam S., Rajender S. y Sangwa_S. (2013). Biochemical and proteomic characterization of a novel extracellular b-Glucosidase from *Trichoderma citrinoviride*. *Molecular Biotechnology*. pp.289-299.
- Chaverri P. y Samuels G. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, *Hypocreales*, *Hypocreaceae*): species with green ascospores. *Studies in Mycology*. pp.1-114.
- Chung, C. H. and R. Baker (1986): "Increased growth plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*". *Enfermedad de las plantas* 70: 145-148.
- Correa, G. (2014) Los fungicidas sistémicos en la prevención y control de la Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.), en el Cantón las Lajas, Provincia de el

- Oro. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Machala, Ecuador. pp 18-40
- Cruz, A. (2019). Micropropagación de *Theobroma cacao* L. “Cacao nativo” para conservación de germoplasma en Jaén – Perú.
- Cummings N., Ambrose A., Braithwaite M., Bissett J., Roslan H., Abdullah J., Stewart A., Agbayani F., Steyaert J. y Hill R. (2016). Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian, Borneo. Mycology Progress. pp. 2-14.
- Cummings, J. A., I. M. Parker, and G. S. Gilbert. (2012). Allelopathy: a tool for weed management in forest restoration. Ecología Vegetal. pp. 1975-1989.
- Cupull, S. R. ; C. C. Sánchez; C. Andreu,; María del C. Cupull y Pérez, N. C. (2000): “Efecto de *Trichoderma* y *Azotobacter* en el control de *Rhizoctonia solani* y la estimulación del crecimiento de posturas de cafetos”. Revista de Fitopatología y Entomología XVII (66): pp 203- 206
- Dhanwant, K. S. y K. K. Manindor (1985): “Celulases of *Trichoderma longibrachiatum* mutants”. Acta Microbiologica Polónica. 34 (1): pp 33-38.
- Dinesh R. y Prateeksha M. (2015). A review on interactions of *Trichoderma* with plant and pathogens. Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences. pp. 20-23.
- Druzhinina I., Kopchinskiy A. y Kubicek C. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience. pp. 55-64.
- El-Komy M., Saleh A., Eranthodi A. y Molan Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato Fusarium wilt. The Plant Pathology Journal. 31 (1): 50-60. 2015
- Fernández Barbosa, R. J., y Suárez Meza, C. L. (2009). antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai AGAINST *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en frutas de la pasión (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio colombiano zona bananera. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 62(1): 4743-4748.
- Galarza. L. Akagi Y., K., Sun Kim Ch., Maekawa N., Itai A., Peralta E., Santos E. y Kodama M. (2015). Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. Revista de patología vegetal general. pp. 1-10.
- García, D. (2013). Incidencia y severidad de la roya del café y evaluación de alternativas químicas para su control. Escuintla. Tesis. Universidad Rafael Landívar. Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas. Sede Regional de Escuintla. p. 98.
- González I., Infante D., Martínez B., Arias Y., González N., Miranda I. y Peteira B. (2012). Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp.

- promisorias como agentes para el control biológico. *Biología Aplicada*. pp. 7-11.
- Guevara, E.; Herrera, J.; Alizaga, R. 1992. Efecto de la cianamida hidrogenada en la semilla de café (*Coffea arabica*) cv. caturra. Influencia sobre él, metabolismo germinativo. *Agronomía Costarricense* 16(2): 177-185
- Guilcapi, E. (2009). Efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viridae*, en la producción de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad caturra a nivel del vivero. Tesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. p. 48.
- Gupta S., Singh R., Rajik M., Biswas S. y Kumar V. (2015). Antagonistic evaluation of different biocontrol agents against *Fusarium udum*, causing wilt of arhar (*Cajanus cajan* L.). *Agriways*. pp. 29-30.
- Gupta V., Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay R., Druzhinina I. y Tuohy M. (2014). *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Editorial Elsevier. Amsterdam, Netherlands. p. 569.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*. 84(4): pp.377-393
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I. y Monte E. (2012). Efectos beneficiosos para las plantas de *Trichoderma* y de sus genes. *Microbiología*. pp. 17-25.
- Herrera, JC; Alvarado, G; Cortina, H; Combes, MC; Romero, G; Lashermes, P. 2009. Genetic analysis of partial resistance of coffee leaf rust (*Hemileia vastarix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica* 167: 57-67.
- ICAFFE. (2001). Informe de la actividad cafetalera de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Insaurrealde, L., Sanabria Velázquez, A., Verdina, D., Sotelo, P. y Barúa, J. (2017). Isolation and characterization of native *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi in Paraguay. In IV Congreso Nacional de Ciencias Agrarias. FCA/UNA (ed.). Asunción, PY: FCA/UNA, p. 1071-1074.
- Instituto Geográfico Militar (IGME). (2015). Mapa Américas 1:250 000. Machala y Macará. Editorial Instituto Geográfico Militar, Quito, Ecuador. p.98.
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. (2014). Café Arabigo.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2019). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), 2018. Quito, Ecuador.
- International Coffee Organization (ICO). (2018). Informe del mercado del café junio 2018.

- Jaklitsch and Voglmayr, 2014 W.M. Jaklitsch, H. Voglmayr. (2013). New combinations in *Trichoderma* (*Hypocreaceae*, *Hypocreales*) Mycotaxon, pp. 143-156.
- Jaklitsch, W. M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology* 63:1-91. doi: 10.3114/sim.2009.63.01
- Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. 2008. Three European species of *Hypocrea* with reddish brown stromata and green ascospores. *Mycologia*. pp. 796-815.
- Jaklitsch, WM.(2011). Especies europeas de *Hypocrea* parte II: especies con ascosporas hialinas. *Diversidad fúngica*. pp. 1-250.
- Jiang Y., Jin-Liang W., Chen J., Li-Juan M., Xiao-Xiao F. Chu-Long Z. y Fu-Cheng L. (2016). *Trichoderma* Biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. pp. 1-14.
- Jiménez-Torres, A., y Massa-Sánchez, P. (2015). Producción de café y variables climáticas: el caso Espindola, Ecuador. *Economía*, 40(2): 117–137.
- Kamala Th. y Devi I. (2012). Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*. pp. 8491-8499.
- Kamala Th., Devi I., Sharma K. y Kennedy. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *Biological Medical Research International*. pp. 1-21.
- Khan M. Ashraf S., Rasool F., Salati K., Mohiddin F. y Haque Z. (2014). Field performance of *Trichoderma* species against wilt disease complex of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri and *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. pp. 447-454.
- Knudsen G. y Dandurand L. (2014). Ecological complexity and the success of fungal biological control agents. *Advances in Agriculture*. pp. 1-11.
- Kumar A., Kumar R. y Garampalli H. (2013). Screening of indigenous potential antagonistic *Trichoderma* species from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. pp. 42-47.
- Kumar P., Gaur V. y Rani R. (2015a). Evaluation of antagonists against *Macrophomina phaseolina* causing root rot of groundnut. *African Journal of Microbiology Research*. pp. 155-160.
- Kumar V., Shahid M., Srivastava M., Singh A., Panday S y Kumar M. Screening (2015b). *Trichoderma* species for virulence efficacy on seven most predominant phytopathogens. *African Journal of Microbiology Research*. pp. 793-799.

- Lani L., Mar. A., Lopez, C., Aganon P., Juico P. Isolation of *Trichoderma* species from carabao manure and evaluation of its beneficial uses. *International Journal of Scientific & Technology Research*. 3(8): 190-199. 2014.
- Leech, M. L., Singh, S., Jain, A. K., Klemperer, S. L., and Manickavasagam, R. M., (2005). The onset of India Asia continental collision: Early, steep subduction required by the timing of UHP metamorphism in the western Himalaya: *Earth and Planetary Science Letters*, v. 234, pp. 83–97.
- Martínez Álvarez, P., Alves Santos, F. M., y Diez, J. J. (2012). Interacciones *in vitro* e *in vivo* entre *Trichoderma viride* y *Fusarium circinatum*. *Silva Fenn*, 46, 303-316.
- Martínez B., Infante D. y Reyes Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*. pp. 1-11
- Mesa, N., Medrano, J., Martínez, M., Grave, M y Cabrera, Y. (2016). Efecto anticariogénico del café. *Correo científico médico de Holguín*, 21 (3), 888- 898.
- Michel-Aceves. (2001). Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euscomycetes hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). pp. 22-50.
- Michel-Aceves A., Otero-Sánchez M., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A. y AlarcónCruz N. (2013). Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuate. *Avances en Investigación Agropecuaria*. pp. 89-107.
- Michel-Aceves, A.C., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, M.E., Mesina-Escamilla, J.C. y Samuels, G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154–160.
- Montagnini, F., Somarriba, E., Murgueitio, E., Fassola, H., y Eibl, B. (2015). *Sistemas Agroforestales. Funciones Productivas, Socioeconómicas y Ambientales. Serie técnica. Informe técnico 402*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Editorial CIPAV, Cali, Colombia. 454p.
- Munir S., Jamal Q., Bano K., Sherwani S., Bokhari T., Khan T., Khan R., Jabbar A. y Anees M. (2013). Biocontrol ability of *Trichoderma*. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. pp. 1246-1252.
- Murthy, P. S., y Madhava Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition.
- Panwar V., Aggarwal A., Singh G., Verma A., Sharma I. y Saharan M. (2014). Eficacia de la pulverización foliar de aislados de *Trichoderma* contra *Fusarium*

graminearum que causa el tizón de la espiga del trigo. Revista de investigación del trigo. pp. 59-63.

- Pizarro, J., Barrezueta, S., y Prado, E. (2016). Análisis de canales de comercialización y consumo de café (*Coffea arabica*) en la ciudad de Machala, Ecuador. Revista Caribeña de Ciencias Sociales, 3.
- Poalacin, J. M. (2015). Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma Hamatum* en sustrato sólido. Trabajo de grado para la obtención del título de Ingeniera Química. Universidad Central del Ecuador Facultad de Ingeniería Química Carrera de Ingeniería Química. Quito, Ecuador. pp. 46-66
- Ponce, L., Acuña, I., Proaño, P., y Orellana, K. (2018). El sistema agroforestal cafetalero. Su importancia para la seguridad agroalimentaria y nutricional en Ecuador. Revista Cubana de Ciencias Forestales, Vol 6. N°1. pp. 116-129
- Rifai M. A. (1969). revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Paper. pp. 1-56.
- Rivillas, C. et.al., (2011). La roya del cafeto en Colombia. Impacto, manejo y costos del control resultados de investigación. Centro Nacional de Investigación de Café (CENICAFE). Chinchiná-Caldas-Colombia.
- Robles Ángel, (2017). Etiología de la Marchitez Vascular del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona* Badillo) y control biológico en el sur de Ecuador. Tesis Presentada En opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara, Cuba pp. 47-85.
- Rodríguez, V. y A. Blanco (1992): Eficiencia del *Azotobacter chroococcum* en la producción de posturas de *Coffea arabica* L. Instituto Superior de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, RS
- Rojas-Triviño, A. 2011. Conceptos y Práctica de Microbiología General. Editorial: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Palmira, Colombia. 161 p.
- Rodríguez, M., & Veneros, R. (2011). Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de Zonas de distribución del distrito de Trujillo (Perú). Rev. REBIOL, 2(31).
- Rolz, C., De Leon, L., & Paniagua, O. (2013). Evidencia de un atonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (Roya del café). Rev. 25 de la Universidad del Valle de Guatemala, 61-65.
- Romero, G; Vasquez, L; Lashermes, P; Herrera, JC. 2014. Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timo hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). Plant Breeding. 133:121-129.

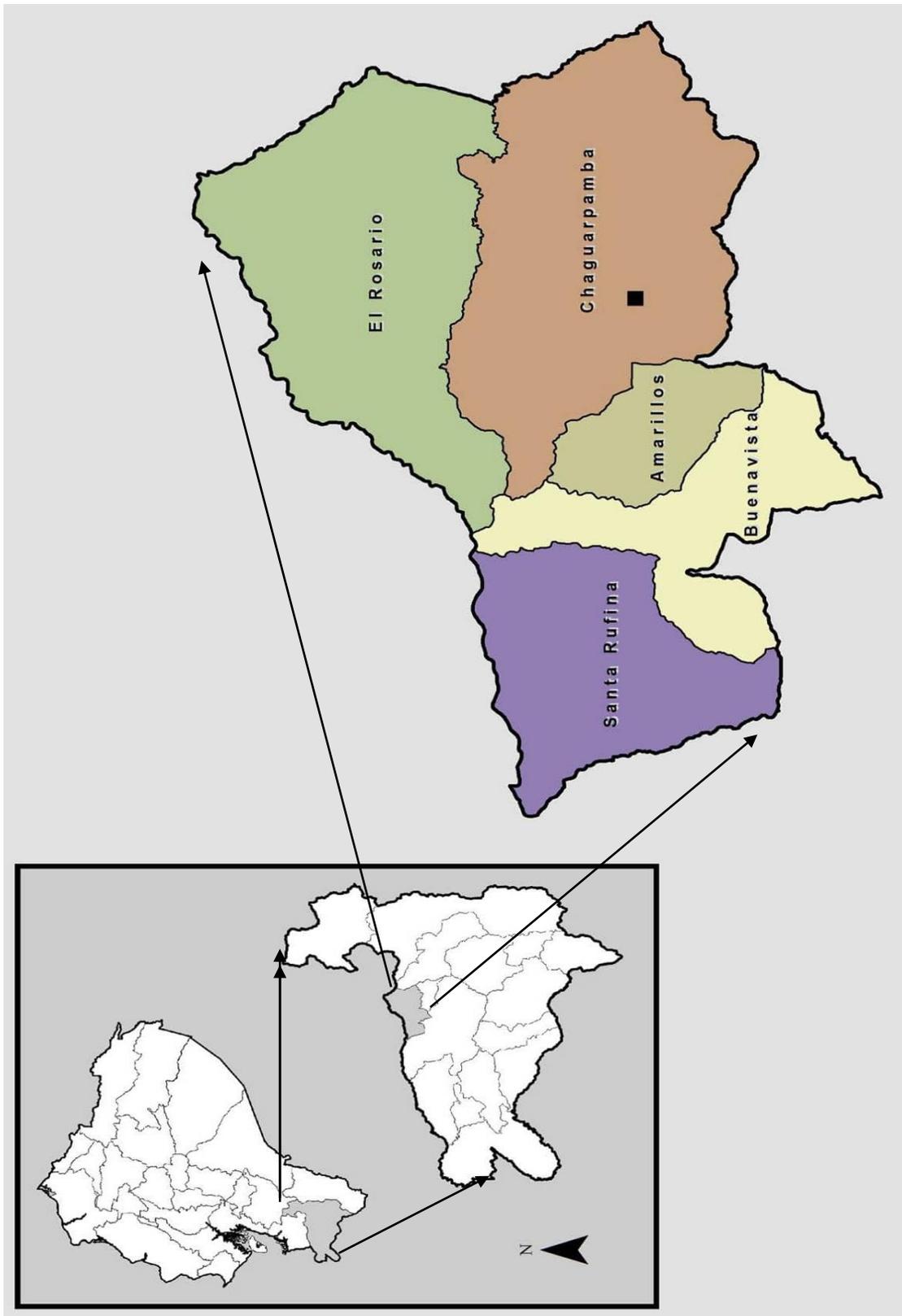
- Rudy, B. G. Fishell, S. Lee, J. Hjerling-Leffler. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.*, pp. 45-61.
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., y Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* vol. 5 no. 7, pp. 1325-1332.
- Salazar, O. y F. González (1994): "Influencia de la aplicación del *Azotobacter* en la producción de 2 variedades de cebolla en épocas tempranas". *Agricultura Tropical* 15(3): 661.
- Santana, R., 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinacion, en el desarrollo de posturas de cafeto y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. p. 22.
- Schiber, E. 1972. Economic impact coffee rusting Latin America. *Annu. Rv. Phytopatol.* 10: 491-510.
- Schieber, E; Zentmyer, GA. 1984. Coffee rust in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 68(2): 89-93.
- Schuster A. y Schmoll M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiological and Biotechnology*. pp. 787-799.
- Shiomi D, Yoshimoto M, Homma M, Kawagishi I (2006). Helical distribution of the bacterial chemoreceptor via colocalization with the Sec protein translocation machinery. pp. 894–906.
- Silva, MC; Várzea, V; Guimarães, LG; Azinheira, HG; Fernandez, D; Petitot, A. 2006. Resistencia del café a las principales enfermedades: roya y enfermedad del cafeto. *Braz. J. Fisiología.* 18, 119–147.
- Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (2013). Ficha técnica Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley y Broome). SINAVEF
- Solórzano, C. (2013). La roya del café sus efectos directos en la pérdida de empleo y emigración. *Boletín N°2.* Guatemala.
- Srinivasa G. Nageswara N., Reddy R. y Surekha Ch. (2015). Induction of plant systemic resistance in legumes *Cajanus cajan*, *Vigna radiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* – A *Trichoderma viride* mediated reprogramming of plant defense mechanism. *International Journal of Recent Scientific Research*. pp. 4270-4280.
- Subero, L. (2005). Información del café (INFOCAFES). La roya del cafeto.
- Sucaticona Fanny (2018). Actividad Antagónica in vitro de los hongos *Trichoderma* spp y *Lecanicillium* spp. Frente al hongo de la roya amarilla del café (*Hemileia*

- vastatrix*) en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el título profesional de licenciada en biología. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ciencias Biológicas. Puno, Perú pp. 47 – 59.
- Valarezo C. (2004). Gestión de la fertilidad del suelo en el trópico húmedo, en la Región Amazónica Ecuatoriana y bajo sistemas agroforestales. Editorial Universidad Nacional de Loja. Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios. Loja, Ecuador. p. 141
- Vallejo, M. (2014). Caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal. Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Agroecología y Ambiente. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tungurahua, Ecuador: pp 38-72.
- Vargas, R. (2014). Antagonismo de *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma harzianum* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae Y *Phoma terrestris* in vitro. Tesis, pp. 14- 118.
- Vengadaramana A. y de Costa D. Morphological and pathogenic variations of the causal organisms of leaf twister disease of red onion (*Allium cepa* L.) in Jaffna district of Sri Lanka. Tropical Agricultural Research. 25 (3): 412-431. 2014.
- Villarino M., Cal A. de, Melgarejo P., Larena I. y Espeso E. (2015). The development of genetic and molecular markers to register and commercialize *Penicillium rubens* (formerly *Penicillium oxalicum*) strain 212 as a biocontrol agent. Microbial Biotechnology. pp. 89-99.
- Villarreyna, R. (2014). Análisis de las condiciones de manejo que propiciaron el impacto de la roya (*Hemileia vastatrix*) en la zona cafetalera de los municipios de Jinotega, el Tuma-La Dalia y San Ramón, Nicaragua. Tesis de posgrado en Magister Scientiae Sistemas Agrícolas Sostenibles. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Escuela de Posgrado Turrialba, Costa Rica. pp. 98-109.
- Vinale F. Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Woo S., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Ruocco M., Lanzuise S., Manganiello G. y Lorito M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. The Open Mycology Journal. pp. 127-139.
- Virdi, G. S. (1986): Studies on some coprophelorus fungi. M. Sc. Thesis Guru Nanak dev University Amritsav, India, Acta microbiológica Polonica 35 (1 y 2): 92-93.
- Viteri Flórez, P. A., Castillo Guerra, D. A., y Viteri Rosero, S. E. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. pp. 362-367.

- Viteri Salazar, O., Ramos-Martín, J., y Lomas, P. L. (2018). Livelihood sustainability assessment of coffee and cocoa producers in the Amazon region of Ecuador using household types. *Journal of Rural Studies* 62: 1–9.
- Watanabe T. (2002). Atlas pictórico de hongos del suelo y de las semillas: morfologías de hongos cultivados y clave de las especies. 2da. Edición. Editorial CRC PRESS. Estados Unidos de América. pp. 506.
- Whipps, J. (2001). Interacción microbiana y biocontrol en la rizosfera. pp. 487-511.
- Zambolim, L., Vale, F.X.R., Pereira, A.A. y Chaves, G.M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: Vale, F.X.R. y Zambolim, L. (Eds.) Controle de doenças de plantas. Viçosa, Minas Gerais. Suprema Gráfica e Editora. 1997. pp.83-180.
- Zeilinger, S., S. Gruber, R. Bansal, and P.K. Mukherjee. 2016. Secondary metabolism in - chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews* 30(2):74-90

9. ANEXO

Anexo 1. Ubicación de la zona de estudio, Ecuador, Loja, Chaguarpamba.



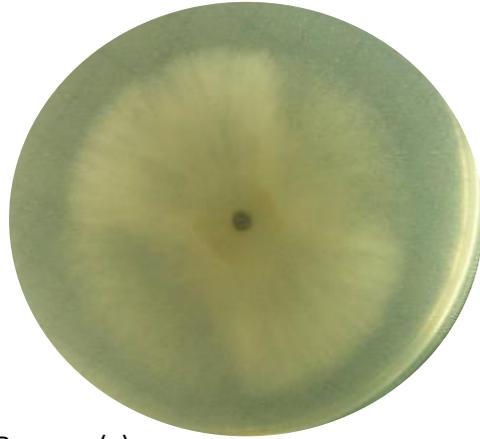
Anexo 2 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo

Ubicación Geográfica			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Latitud	649675	649648	649659
Longitud	9570518	9570518	9570518
Altitud	1523	1524	1528

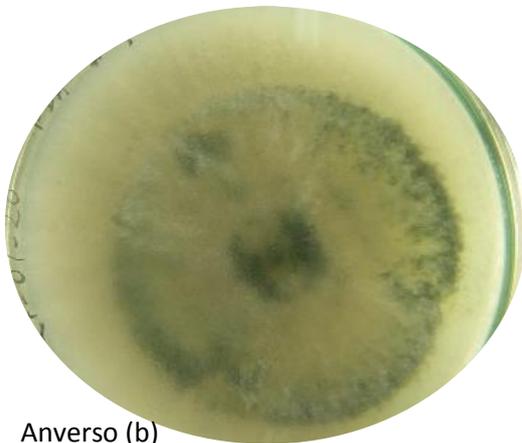
Anexo 3. Características de *Trichoderma*, color de la colonia anverso y reverso, tipo de micelio, tasa de crecimiento radial TCR, figura (a) 48 horas, figura (b) 72 horas, figura (c) 96 horas.



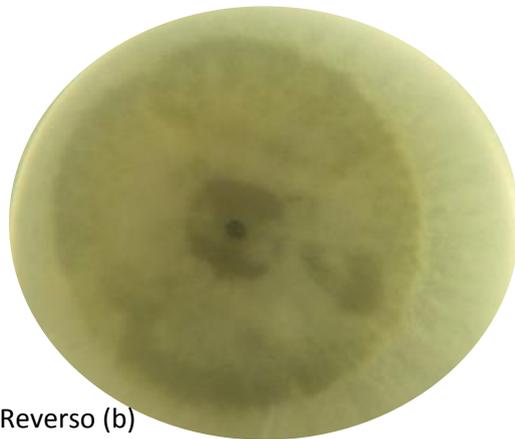
Anverso (a)



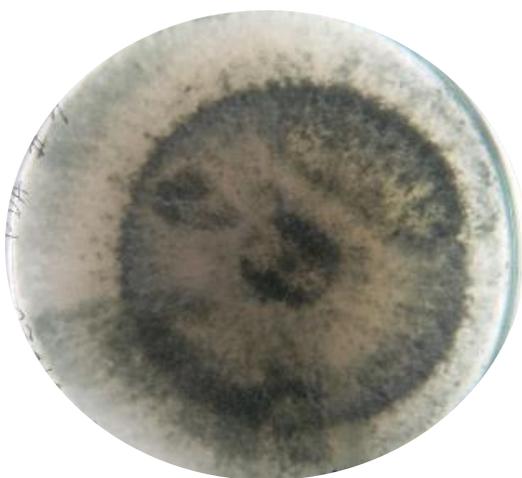
Reverso (a)



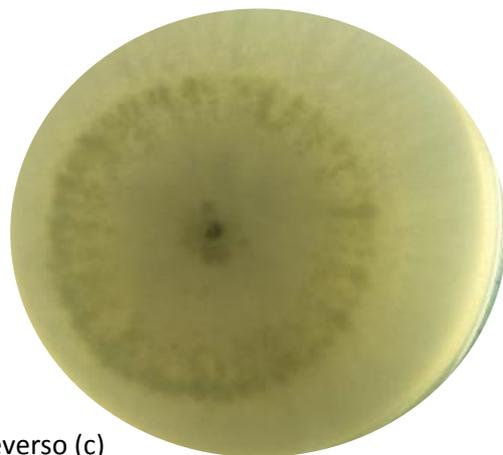
Anverso (b)



Reverso (b)



Anverso (c)



Reverso (c)

Anexo 4. Porcentaje del biocontrol de *Trichoderma* spp sobre la roya bajo condiciones *in vitro* cada 24 horas

	48 HORAS	96 HORAS	144 HORAS	192 HORAS	240 HORAS	288 HORAS
1	10	27	42	62	75.0	89
2	6	23	45	65	79.0	91
3	15	25	43	63	74.0	92
4	11	23	40	65	78.0	91
5	12	21	34	69	71.0	93
6	12	20	42	64	72.0	91
7	16	20	45	63	73.0	89
8	11	27	41	61	76.0	87
9	13	27	43	62	79.0	89
10	12	28	46	68	75.0	86
11	16	22	42	69	74.0	89
12	14	24	41	65	78.0	90
13	12	23	40	64	71.0	91
14	11	25	48	63	79.0	93
15	13	26	42	65	75.0	92
16	12	27	46	64	76.0	94
17	15	21	45	65	79.0	92
18	12	19	43	65	76.0	93
19	17	20	42	62	73.0	89
20	13	23	41	63	71.0	87
21	16	25	40	61	71.0	93
22	11	27	45	68	72.0	91
23	16	26	42	69	75.0	92
24	12	27	46	67	79.0	93
25	15	29	44	62	71.0	90
26	13	28	45	68	70.0	92
27	15	27	41	65	79.0	87
28	12	21	42	62	72.0	89
29	17	20	40	63	77.0	93
30	11	23	43	65	75.0	92
31	13	27	42	64	76.0	93
32	11	25	41	61	79.0	91
33	12	26	45	62	78.0	95
34	19	28	46	65	79.0	89
35	12	27	40	62	75.0	92
36	14	20	42	68	74.0	93
37	15	21	43	65	75.0	94
38	12	27	45	65	74.0	93
39	14	23	47	65	71.0	92
40	13	25	41	61	72.0	93
41	12	29	45	63	73.0	89
42	12	24	49	67	76.0	93
43	15	21	48	69	73.0	92
44	12	26	42	64	72.0	91
45	16	24	45	68	78.0	93
46	13	25	46	63	79.0	89
47	12	21	42	63	72.0	93
48	17	28	46	62	70.0	93
49	12	20	41	61	79.0	89
50	18	27	45	65	71.0	90
%	12	27	42	65	79	93

Anexo 5. Los tratamientos (T1) agua, (T2) *Trichoderma* spp, y (T3) ANA (ácido naftalenacético), de *Trichoderma* spp, como promotor del crecimiento vegetal, foto primer día de evaluación y ultimo día de evaluación



Agua (a), primer día de evaluación



Agua (a), último día de evaluación



Trichoderma (b), primer día de evaluación



Trichoderma (b), ultimo día de evaluación



ANA ácido naftalenacético (c), primer día de evaluación



ANA ácido naftalenacético (c), ultimo día de evaluación

Anexo 6. Cepa madre (a), hongo hiperparásito (sin confirmar molecularmente) (b), *Penicillium* (c), *Trichoderma* spp (d).



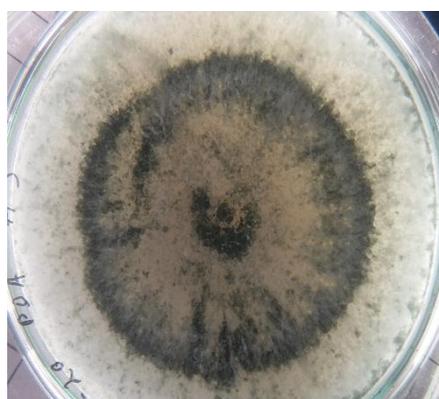
a



b



b



c