

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANTO DOMINGO

“USO DEL CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO EN EL CAMPO PARA EL  
COMBATE DE LA PUDRICIÓN DE FLECHA EN EL CULTIVO DE PALMITO  
(*Bactris gasipaes* H.B.K.) EN LA ZONA DE SANTO DOMINGO.”

MAYRA PATRICIA RONQUILLO NARVÁEZ

INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

2008



ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
SANTO DOMINGO

“USO DEL CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO EN EL CAMPO PARA EL  
COMBATE DE LA PUDRICIÓN DE FLECHA EN EL CULTIVO DE PALMITO  
(*Bactris gasipaes* H.B.K.) EN LA ZONA DE SANTO DOMINGO.”

MAYRA PATRICIA RONQUILLO NARVÁEZ

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
AGROPECUARIO.

SANTO DOMINGO– ECUADOR  
2008

“USO DEL CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO EN EL CAMPO PARA EL  
COMBATE DE LA PUDRICIÓN DE FLECHA EN EL CULTIVO DE PALMITO  
(*Bactris gasipaes* H.B.K.) EN LA ZONA DE SANTO DOMINGO.”

MAYRA PATRICIA RONQUILLO NARVÁEZ

REVISADO Y APROBADO

---

MAYO. ESP. ING. RENÉ GONZÁLEZ V.  
DIRECTOR DE CARRERA  
DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

---

Ing. Gustavo Núñez J. Msc.  
DIRECTOR

---

Ing. Javier Tumbaco M.  
CODIRECTOR

---

Ing. Vinicio Uday P.  
BIOMETRISTA

---

UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

“USO DEL CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO EN EL CAMPO PARA EL COMBATE DE LA PUDRICIÓN DE FLECHA EN EL CULTIVO DE PALMITO (*Bactris gasipaes* H.B.K.) EN LA ZONA DE SANTO DOMINGO.”

MAYRA PATRICIA RONQUILLO NARVÁEZ

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO.

	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Gustavo Núñez J. MSc. DIRECTOR	_____	_____
Ing. Javier Tumbaco M. CODIRECTOR	_____	_____

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA UNIDAD.

---

UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

## **DEDICATORIA**

A las dos personas que  
más amo en mi vida: mis padres.

Para ellos va todo mi  
esfuerzo y dedicación.

A mis queridos hermanos,  
por brindarme su cariño.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios nuestro señor, por brindarme sabiduría y la fuerza necesaria para alcanzar mis metas. Por llenarme de bendiciones, haciendo de mi vida una hermosa realidad.

A mis padres, hermanos y demás familiares por su apoyo y cariño incondicional, gracias por estar junto a mi.

A mí querida ESPE y su Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Santo Domingo, porque hicieron de mi vida universitaria una experiencia enriquecedora e inolvidable y por el apoyo total que me brindaron durante toda la investigación.

A los ingenieros: Gustavo Núñez y Javier Tumbaco por ser mis guías y colaboradores en el trabajo de tesis.

A los doctores: Freddy Carrera y Eduardo Argoti por su valioso aporte en la fase de laboratorio de la investigación.

A INAEXPO, prestigiosa empresa que me abrió sus puertas y me dio la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis, brindándome apoyo y colaboración de principio a fin.

Al Ing. Carlos Quezada, por confiar en mí y por el apoyo constante durante la realización de esta investigación.

Al señor Víctor Manuel Quirola propietario de la hacienda QUIROPALMA, un eterno agradecimiento por el apoyo y las facilidades brindadas durante la realización y culminación de mi tesis.

A mis amigos y colaboradores de la Comuna Dos de Agosto por inyectarme esa alegría y sencillez que les caracteriza, haciendo inagotables mis días de trabajo.

## **AUTORIA**

Todos los criterios emitidos en la presente investigación, son de absoluta  
responsabilidad del autor.

Mayra Ronquillo Narváz



## ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. ENFERMEDAD PUDRICIÓN DE FLECHA DEL PALMITO	5
2.1.1. Sintomatología	5
2.1.2. Agentes Causales	7
2.1.2.1. <i>Fusarium moniliforme</i>	8
2.1.2.2. <i>Phytophthora palmivora</i>	9
2.1.2.3. <i>Erwinia</i> sp.	11
2.1.3. Manejo de la Enfermedad	13
2.2. CONTROLADORES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD PUDRICIÓN DE FLECHA DEL PALMITO	14
2.2.1. Fungicidas Químicos	15
2.2.1.1. Fosetil Al	15
2.2.1.2. Sulfato de cobre pentahidratado	15
2.2.1.3. Hymexazol	16
2.2.2. Fungidas Biológicos	17
2.2.2.1. Trichoeb	18
2.2.2.2. Biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp.	19
2.3. PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL	23
2.3.1. Tipos de Producción	24
2.3.1.1. Producción artesanal de biopreparados a base de <i>Trichoderma</i> spp.	24
2.4. LIOFILIZACIÓN	27
2.4.1. Proceso de Liofilización	28

2.4.1.1.	Congelación	29
2.4.1.2.	Secado	29
2.4.1.3.	Almacenamiento	30
2.5.	MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN)	30
2.5.1.	Enzimas de Restricción de ADN	31
2.5.2.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	33
2.5.3.	Etapas de la PCR	33
2.5.4.	Secuenciación de ADN	35
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
V.	CONCLUSIONES	105
VI.	RECOMENDACIONES	107
VII.	RESUMEN	109
VIII.	SUMARIO	111
IX.	BIBLIOGRAFÍA	113
X.	ANEXOS	120

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N<sup>o</sup></b>	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Tabla de diferentes especies de hongos fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i> spp.	23
<b>Cuadro 2.</b> Tabla de resumen de los procesos y herramientas empleados en biología molecular.	32
<b>Cuadro 3.</b> Ubicación geográfica de la zona experimental	37
<b>Cuadro 4.</b> Establecimiento de los tratamientos para el ensayo de Crecimiento Micelial	46
<b>Cuadro 5.</b> Establecimiento de los tratamientos para el ensayo de Determinación de Antagonismo.	47
<b>Cuadro 6.</b> Establecimiento de los tratamientos para la evaluación de controladores químicos y biológicos en campo.	48
<b>Cuadro 7.</b> Esquema del ADEVA del DCA	50
<b>Cuadro 8.</b> Esquema de Coeficientes de correlación y regresión.	51
<b>Cuadro 9.</b> Esquema del ADEVA del DBCA	51
<b>Cuadro 10.</b> Tabla de escala de calificación para seleccionar aislamiento de <i>Trichoderma</i> con actividad antagonista.	53
<b>Cuadro 11.</b> Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. con regiones del ribosoma 5.8s	62
<b>Cuadro 12.</b> Análisis de Varianza para el crecimiento radial de cepas de <i>Trichoderma</i> en los 2 días de evaluación.	68
<b>Cuadro 13.</b> Prueba de Tukey al 5% para el crecimiento radial de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los 2 días.	69
<b>Cuadro 14.</b> Características del crecimiento de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	71
<b>Cuadro 15.</b> Regresión y correlación entre el tiempo de evaluación en días y el crecimiento radial en mm de <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> dentro de cada cepa de <i>Trichoderma</i> spp, en la prueba de antagonismo de laboratorio.	74

<b>Cuadro 16.</b>	Regresión y correlación entre el tiempo de evaluación en días y el crecimiento radial en mm de cada cepa de <i>Trichoderma spp</i> , en la prueba de antagonismo de laboratorio en contra de <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> .	75
<b>Cuadro 17.</b>	Resultados de la comparación de cepas nativas de <i>Trichoderma spp.</i> con especies de <i>Trichoderma</i> almacenadas en el BLAST	81
<b>Cuadro 18.</b>	Promedio del porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación durante nueve evaluaciones cada quince días después de cada programa de aplicación.	86
<b>Cuadro 19.</b>	Análisis de la Varianza para la variable porcentaje de incidencia en nueve evaluaciones.	87
<b>Cuadro 20.</b>	Prueba de Tukey al 5 % para la variable porcentaje de incidencia.	88
<b>Cuadro 21.</b>	Comparaciones Ortogonales entre el tratamiento testigo y resto de tratamientos.	91
<b>Cuadro 22.</b>	Promedio del porcentaje de incidencia en la segunda generación en nueve evaluaciones cada 15 días después de cada programa de controladores.	91
<b>Cuadro 23.</b>	Análisis de la Varianza para la variable porcentaje de incidencia de la segunda generación en nueve evaluaciones.	92
<b>Cuadro 24.</b>	Prueba de DUNCAN al 5 % para la variable porcentaje de incidencia de la segunda generación.	93
<b>Cuadro 25.</b>	Comparaciones ortogonales entre el tratamiento testigo y el resto de tratamientos.	95
<b>Cuadro 26.</b>	Comparación de características óptimas de suelo para palmito con los resultados del análisis de suelo en la zona de estudio	96
<b>Cuadro 27.</b>	Comparación de características óptimas foliares para palmito con los resultados del análisis de suelo en la zona de estudio	98
<b>Cuadro 28.</b>	Cateo de raíces realizado en plantas sanas y enfermas al inicio de la fase de campo	101

**Cuadro 29.** Cateo de raíces realizado en plantas sanas y enfermas al final de la fase de campo 102

**Cuadro 30.** Costos de aplicación de los tratamientos para el control de la enfermedad. 103

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N <sup>o</sup>	Pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Fusarium</i> a) Cabecera conidial; b) microconidios; c) macroconidios; d) clamidiosporas	9
<b>Figura 2.</b> <i>Phytophthora</i> . a) Esporangioforo; b) esporangio; c) esporangio germinando; d) oospora.	10
<b>Figura 3.</b> Fotografía de bacteria en estudio, observada al microscopio electrónico, nótese los flagelos peritricos (de mayor longitud) característicos del género <i>Erwinia</i> .	12
<b>Figura 4.</b> Etapas de la Liofilización.	28
<b>Figura 5.</b> Etapas de la Técnica PCR. a) Desnaturalización; b) Apareamiento; c) Extensión.	34
<b>Figura 6.</b> Separación de fragmentos mediante electroforesis.	36
<b>Figura 7.</b> Distribución del área experimental	43
<b>Figura 8.</b> Rotulación de parcelas	43
<b>Figura 9.</b> Planta de palmito con cinta de identificación roja.	54
<b>Figura 10.</b> Desarrollo de <i>F. moniliforme</i> en medio de cultivo PDA.	65
<b>Figura 11.</b> Desarrollo de <i>P. palmivora</i> en medio de cultivo PDA.	66
<b>Figura 12.</b> Desarrollo de <i>Erwinia</i> en medio de cultivo manitol.	66
<b>Figura 13.</b> <i>Trichoderma</i> . a) conidióforos; b) conidios	67
<b>Figura 14.</b> Crecimiento radial en mm/día de <i>Trichoderma</i> en los días 1 y 2.	70
<b>Figura 15.</b> Cepa C9 en ensayo de determinación del antagonismo en contra de <i>F. moniliforme</i> (izq.) y <i>P. palmivora</i> (der.).	77
<b>Figura 16.</b> Regresión lineal simple entre el período de evaluación y el crecimiento en mm de <i>Fusarium moniliforme</i> .	78

<b>Figura 17.</b> Cepa SG en ensayo de determinación del antagonismo en contra de <i>F. moniliforme</i> (izq.) y <i>P. palmivora</i> (der.).	78
<b>Figura 18.</b> Regresión lineal simple días y crecimiento en mm de <i>Fusarium moniliforme</i> dentro de la cepa SG.	79
<b>Figura 19.</b> Cepa MT en ensayo de determinación del antagonismo en contra de <i>F. moniliforme</i> (izq.) y <i>P. palmivora</i> (der.).	79
<b>Figura 20.</b> Regresión lineal simple días y crecimiento en mm de <i>Phytophthora palmivora</i> dentro de la cepa MT.	80
<b>Figura 21.</b> Promedio de la incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación durante las tres primeras evaluaciones en cada uno de los tratamientos.	86
<b>Figura 22.</b> Promedio de la incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación desde la cuarta hasta la novena evaluación en cada uno de los tratamientos.	87
<b>Figura 23.</b> Promedio de la incidencia de la enfermedad en la segunda generación durante nueve evaluaciones en cada uno de los tratamientos.	92

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO N.º</b>		<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b>	Codificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas.	120
<b>Anexo 2.</b>	Medio selectivo para captura de <i>Trichoderma</i> spp.	121
<b>Anexo 3.</b>	Metodología propuesta por Kim <i>et al.</i> 1992 modificada por Lee, 2000 y rectificada por Argoti, 2007. para extracción de ADN de hongos	122
<b>Anexo 4.</b>	Programas semanales para la aplicación de controladores.	123
<b>Anexo 5.</b>	Ensayo de crecimiento radial durante los dos días de evaluación	125
<b>Anexo 6.</b>	Ensayo de determinación del antagonismo durante 2, 4, 6 y 8 días de evaluación.	126
<b>Anexo 7.</b>	Datos del porcentaje de incidencia de la enfermedad en la primera generación durante nueve evaluaciones cada quince días, realizadas después de cada programa de control.	127
<b>Anexo 8.</b>	Datos del porcentaje de incidencia de la enfermedad de la segunda generación durante nueve evaluaciones cada quince días después de cada programa de control.	128
<b>Anexo 9.</b>	Costos de aplicación de cada uno de los tratamientos para el control de la enfermedad pudrición de flecha del palmito.	129
<b>Anexo 10.</b>	Resultados de secuenciación de la cepa C9 en ITS1	133
<b>Anexo 11.</b>	Resultados de secuenciación de la cepa C9 en ITS4	134
<b>Anexo 12.</b>	Resultados de secuenciación de la cepa MT en ITS1	135
<b>Anexo 13.</b>	Resultados de secuenciación de la cepa MT en ITS4	136
<b>Anexo 14.</b>	Resultados de secuenciación de la cepa SG en ITS1	137
<b>Anexo 15.</b>	Resultados de secuenciación de la cepa SG en ITS4	138



<b>Anexo 16.</b>	Análisis de la clase textural de suelo en la zona de estudio.	139
<b>Anexo 17.</b>	Reporte de análisis de suelo al inicio de la investigación.	140
<b>Anexo 18.</b>	Reporte de análisis de suelo al final de la investigación.	141
<b>Anexo 19.</b>	Reporte de análisis foliares al inicio de la investigación.	142
<b>Anexo 20.</b>	Reporte de análisis foliar al final de la investigación.	143
<b>Anexo 21.</b>	Reporte de análisis microbiológico del suelo al finalizar la investigación.	144
<b>Anexo 22.</b>	Figura del área experimental. Lote 3 sector 7.	145
<b>Anexo 23.</b>	Sintomatología de la enfermedad pudrición de flecha del palmito.	146
<b>Anexo 24.</b>	Aislamiento de patógenos causantes de la enfermedad.	147
<b>Anexo 25.</b>	Captura y aislamiento de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> .	148
<b>Anexo 26.</b>	Ensayo de crecimiento radial de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> .	149
<b>Anexo 27.</b>	Ensayo de determinación del antagonismo.	150

## I. INTRODUCCIÓN

Chalá (1996), manifiesta que el cultivo del palmito (*Bactris gasipaes* Kunt) se inició en Ecuador en 1985, en la Estación Experimental Napo- Payamino del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Desde entonces el cultivo ha tomado gran importancia económica y productiva, es así que en los últimos años la superficie cultivada de palmito se ha incrementado en un promedio anual de 90,11 % (CORPEI, 2006).

Nuestro país cuenta con varias zonas óptimas para el desarrollo del palmito, caracterizadas por bosques húmedos tropicales, las principales zonas de producción en el país son: Esmeraldas, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Morona Santiago, Pastaza, Napo, Sucumbíos, Guayas y Machala (Rizzo, 2002).

Sin embargo, a pesar de tener excelentes condiciones ambientales, el cultivo es diezmado por alteraciones patológicas, se han identificado entre 15 y 20 clases de hongos, bacterias y protozoarios que podrían en un futuro cercano, reducir en forma considerable la producción de palmito (Mora y Echeverría, 1999. Citado por Vargas *et al.*, 2003).

También Pizzinatto *et al.* (2001), indica que en Brasil se encontraron cinco especies fitopatógenas de *Fusarium*, que son responsables de la muerte de plantas de palmito tanto en vivero como en la plantación.

En un estudio de incidencia de enfermedades en palmito realizado en Costa Rica, se encontraron patógenos como: *Phytophthora palmivora* responsable de la pudrición cogollo u hoja guía y *Erwinia* sp. causante de pudrición del tallo, quema de hojas y hoja guía (Arroyo *et al.*, 2004).

El mismo autor manifiesta que en Costa Rica no se ha cuantificado la importancia relativa de las enfermedades en las plantaciones de palmito, y todavía no se conoce la epidemiología de las mismas, aspectos fundamentales en el diseño de estrategias racionales para su combate.

Durante el año 2005 en la zona de Santo Domingo se detectó la presencia de la enfermedad conocida como pudrición de flecha del palmito, investigaciones acerca del tema lograron determinar que es causada por dos hongos y una bacteria que actúan de manera simultánea. Dichos agentes causales son: *Phytophthora palmivora*, *Fusarium moniliforme* y *Erwinia* sp., esta enfermedad ocasiona la muerte repentina de las plantas, debido a que el mecanismo de acción es rápido y ocasiona la erradicación final de la planta y disminución de las unidades de producción.

Esta enfermedad se presenta en vivero y en campo, tiene su mayor incidencia durante los primeros dos o cuatro años de establecidas en el campo y en casos esporádicos hasta los siete u ocho años. En algunas plantaciones ha llegado a afectar hasta el 40 % de plantas, causando considerable retraso en su desarrollo y en casos más severos la muerte de las plantas afectadas (Chávez, 1998. Citado por Quezada, 2007).

Para combatir los efectos que las enfermedades producen sobre los cultivos se aplican medidas sanitarias profilácticas, lo que permite reducir la incidencia de muchas enfermedades. Fernández *et al.* (2005) manifiesta que los plaguicidas se muestran como unos eficaces controladores de los organismos que atacan los cultivos. Sin embargo, además de ejercer un efecto tóxico sobre los agentes causantes de las enfermedades, el uso incorrecto de estas sustancias produce numerosos riesgos para la salud de las personas y animales que entran en contacto directo o indirecto con el producto, como para las propias plantas y el medio ambiente.

Con el desarrollo de la investigación en el área de control biológico se ha logrado aislar, caracterizar y manipular microorganismos que funcionan como agentes eficientes en el control biológico de plagas y enfermedades agrícolas, lo que ha permitido implementar sistemas de producción y formulación de microorganismos que pueden ser aplicados en el campo, en forma de polvos, suspensiones acuosas o biopreparados (Yáñez, 2003).

La presente investigación se realizó en dos fases, la primera de laboratorio donde se logró capturar cepas nativas de *Trichoderma* sp. y preparar un biofungicida, en la segunda fase, en campo se evaluó el efecto de fungicidas químicos y biológicos para el control de la enfermedad.

Para el desarrollo de la investigación, se planteó el siguiente objetivo general:

- Evaluar el efecto del control químico y biológico para el combate en campo de la pudrición de flecha en el cultivo de palmito.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación y porcentaje de incidencia de la segunda generación en las zonas de estudio después de cada programa de aplicación.
- Seleccionar *in vitro* la cepa de *Trichoderma* más exitosa y con mayor actividad en contra de los patógenos en estudio.
- Determinar el mejor tratamiento en el campo para el control de la enfermedad.
- Realizar el análisis económico de los tratamientos para el control de la enfermedad.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ENFERMEDAD PUDRICIÓN DE FLECHA DEL PALMITO

El cultivo de palmito (*Bactris gasipaes* Kunt) es uno de los pocos en el mundo que por su origen amazónico en regiones de altísima pluviosidad tiene en realidad muy pocos problemas fitosanitarios, es altamente resistente a virus y a hongos patógenos, sin embargo, en un cultivo comercial, cuando se han modificado sus condiciones agroclimáticas de origen, puede presentar síntomas de enfermedades tanto en vivero como en plantación (Rivera, 1999).

La enfermedad conocida con el nombre de pudrición de flecha en el cultivo de palmito es causada por tres microorganismos patógenos; *Phytophthora palmivora*, *Fusarium moniliforme* y *Erwinia sp.* (Quezada, 2007).

Esta enfermedad es una alteración en la normal fisiología de la planta, producida por la acción persistente de agentes bióticos. Además es un proceso biológico dinámico, variable en magnitud e intensidad. Esto explica la considerable variabilidad en la expresión externa de los cambios fisiológicos o síntomas de la enfermedad (Latorre, 1999).

#### 2.1.1. Sintomatología

Frecuentemente, en los inicios de la enfermedad las alteraciones son mínimas y no necesariamente se traducen en modificaciones visibles, pero a medida que el proceso infeccioso progresa, se intensifican los desórdenes fisiológicos apareciendo las primeras manifestaciones de la enfermedad.

Según Vargas (1999) y Quezada (2007), la sintomatología en plantas afectadas por Pudrición de Flecha es la siguiente:

*Fusarium moniliforme* ataca las venas de los folíolos de la hoja candela o flecha que la hace corchosa y dura, por lo que la hoja no abre bien y se queda pequeña. A veces puede causar pudrición de flecha u hoja terminal en relación con la presencia de *Erwinia sp.*

Agrios (1998) menciona que el uso de materiales como fuente de abono orgánico en estado inmaduro, a más de alterar las condiciones del suelo, como por ejemplo; elevar la temperatura, permite la incubación de microorganismos patógenos como *Fusarium*, quienes aprovechan del medio favorable para su desarrollo, y se mantienen como fuente de inóculo para el cultivo.

En condiciones de alta humedad debido a plantaciones establecidas en suelos mal drenados, limitan la absorción de nutrientes como el potasio, lo cual causa un crecimiento lento de la primera hoja impidiendo la apertura de los folíolos los cuales se saturan de agua de lluvia, permitiendo la entrada de la bacteria *Erwinia sp.* que causa una pudrición acuosa con muerte rápida.

***Phytophthora palmivora*** ocasiona el amarillamiento de las hojas del cogollo, se marchitan y se secan, debido a la pudrición que se da en la base, la misma que se extiende al corazón de palmito, tomando una coloración pardo oscuro. En algunos casos se quemara la hoja guía (flecha), posteriormente la base de la hoja guía se pudre ocasionando pudrición completa del tallo. En el lado interno de la vaina de las hojas afectadas, se presenta un moho blanco constituido por micelio y fructificaciones del hongo, que son diseminados por la lluvia y el viento dentro de la plantación, también por los insectos.

***Erwinia sp.***, causa amarillamiento de la tercera y cuarta hoja, en estado avanzado las hojas de la plantas se tornan de color pardo, se marchitan y mueren. La base de esas hojas presenta estado de descomposición fétido que se traslada al tallo, el cual presenta un estado acuoso y amarillento cuando se corta. La bacteria se desarrolla en tejido necrótico y luego es llevada al punto de unión de la vaina con el tallo, donde penetra a través de tejido blando o de heridas ocasionadas por *Fusarium* y *Phytophthora*.

La sintomatología de la enfermedad pudrición de flecha es muy variada y los síntomas se manifiestan de acuerdo al agente causal que este ocasionando el daño, sea *Fusarium*, *Phytophthora*, *Erwinia* o a su vez la acción complementaria de los tres microorganismos (Anexo 23).

### **2.1.2. Agentes Causales**

Los agentes causales de la Pudrición de Flecha corresponden al grupo de los agentes infectivos, capaces de penetrar y establecer una directa y compleja relación con la planta hospedera. Al mismo tiempo, son agentes transmisibles desde una planta enferma a una sana, por lo cual se les denomina agentes infectivos o patógenos (Latorre, 1999).

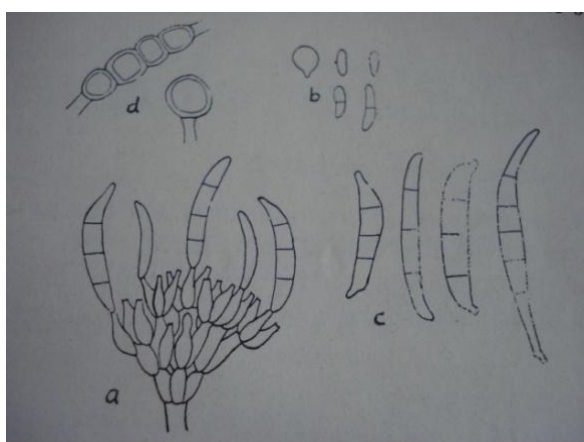
#### **2.1.2.1. *Fusarium moniliforme***

*Fusarium* es uno de los géneros fúngicos más variados y controvertidos, ya que produce una infinidad de enfermedades que se encuentran distribuidas por todo el mundo y ocasionan pérdidas considerables al disminuir las poblaciones y la producción de las plantas infectadas.

*Fusarium* es el responsable de enfermedades como: marchitez vascular, pudrición de semillas y plántulas (ahogamiento), pudrición de raíces, tallos, coronas, cormos, bulbos, tubérculos, etc. (Agrios, 1998). Además en cultivos como el palmito es el responsable de ser uno de los agentes causales de la enfermedad Pudrición de Flecha.

**Etiología.-** Pertenece al orden Hyphales. Produce tres tipos de esporas: macroconidias, microconidias y clamidiosporas (Figura 1). Las macroconidias son producidas en fiálidas sobre conidióforos simples o ramificados agregados. Las microconidias son de forma diversa, desde ovales a forma de coma o riñón, y se agregan formando “cabezuelas”. Las clamidiosporas, de paredes gruesas, pueden formarse en hifas o en conidias de forma intercalar o terminal, y se desarrollan en los estados finales de la patogénesis (Llácer, *et al.* 2002).

Figura 1.  
Cabecera conidial;  
microconidios; c)  
d) clamidiosporas.  
Fuente: Gilman J.



*Fusarium* a)  
b)  
macroconidios;  
1963.

**Epidemiología.-** *Fusarium* vive en los tejidos vegetales muertos o infectados. Las esporas son fácilmente diseminadas por el viento, equipo agrícola, el agua, por contacto, etc., de ahí que el hongo se encuentre ya en forma de micelio o esporas en muchos de los suelos (Agrios, 1998).

Las pudriciones de raíz y del tallo ocasionadas por *Fusarium* aumentan bastante su severidad, cuando las plantas que están expuestas al patógeno sufren agobio fisiológico causado por bajas temperaturas, sequía intermitente o excesiva cantidad de agua en el suelo, herbicidas, y compactación del suelo (Agrios, 1998).

#### 2.1.2.2. *Phytophthora palmivora*

Diferentes especies del género *Phytophthora* causan varias enfermedades en distintos tipos de plantas, desde plántulas de hortalizas anuales o de ornato hasta árboles forestales y frutales completamente desarrollados, la mayoría de especies del hongo producen pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tallos y otros órganos (Agrios, 1998).

La actividad patógena de todas las especies se concreta en la parte basal de las plantas, así como en las raíces principales, originando áreas de tejido cortical necrosado de diversa amplitud que, en los casos graves llegan a causar la muerte de las plantas (Llácer, *et al.* 2002), como es el caso en el cultivo de palmito

**Etiología.-** Pertenece al orden Peronosporales. Produce cuatro tipos de esporas: clamidospora, oospora, esporangio y zoospora (Figura 2). Las clamidiosporas son los órganos más valiosos de supervivencia en el suelo. La oospora también está adaptada para la conservación, su formación se produce únicamente en el interior de los tejidos vegetales afectados. También el micelio es un órgano de supervivencia en el suelo en ausencia de huésped, este coloniza intercelularmente el tejido cortical y lo destruye (Llácer, *et al.* 2002).

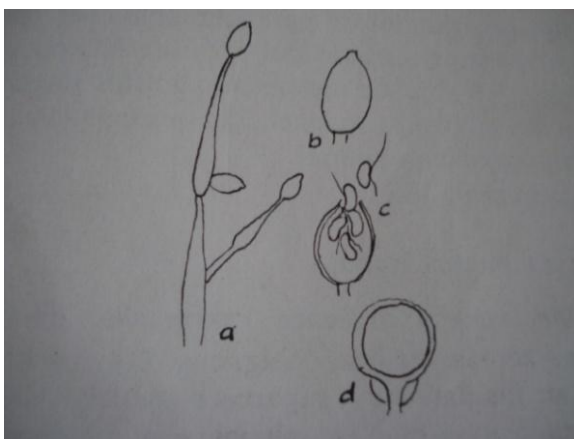


Figura 2.  
Esporangioforo;  
esporangio  
oospora.

Fuente: Gilman J.

**Epidemiología.-**

vive y se reproduce principalmente en el suelo y por lo común atacan las plantas susceptibles a nivel de la superficie de suelo o por debajo de ella. Sin embargo en algunas ocasiones las esporas del hongo son diseminadas hacia la corteza dañada de una rama, de ahí que produzcan infecciones en esos órganos (Agrios, 1998).

Las infecciones de este hongo pueden transmitirse por el uso de suelos contaminados, herramientas de trabajo, equipos agrícolas, plantas y probablemente por el agua durante las tormentas. El hongo entra a la palma a través de heridas y causa la desintegración de la yema apical (Llácer, *et al.* 2002).

Las hormigas *Crematogaster* spp., *Camponotus* spp., y *Pheidole* spp., también diseminan el inóculo por sus galerías. Especies de *Nitidulidae* (escarabajos) ingieren y devuelven esporangios viables del patógeno (Llácer, *et al.* 2002).

**2.1.2.3. Erwinia sp.**

Las bacterias del complejo *Erwinia* incluyen a las especies causantes de pié negro y pudriciones húmedas. Es por ello que mientras los hongos *Fusarium* y *Phytophthora* permanecen casi exclusivamente en los tejidos vasculares hasta que la planta muere, *Erwinia* sp. con frecuencia destruye ciertas porciones de la pared celular de los vasos xilemáticos o hace que se separen durante el principio del desarrollo de la enfermedad. Por consiguiente mata y disuelve a las células y promueve la formación de pústulas o cavidades llenas de bacterias, gomas y restos de células (Agrios, 1996).

**Etiología.-** Son bacilos cortos, Gram-negativo, móviles por flagelos periféricos, anaerobios facultativos. Las colonias en agar nutriente son de color blanco, tienen un

*Phytophthora.* a)  
b) esporangio; c)  
germinando; d)

1963.

*Phytophthora*

crecimiento lento. Este género comprende tres grupos: *Amylovora*, *Herbícola* y *Carotovora* (Llácer, *et al.* 2002).

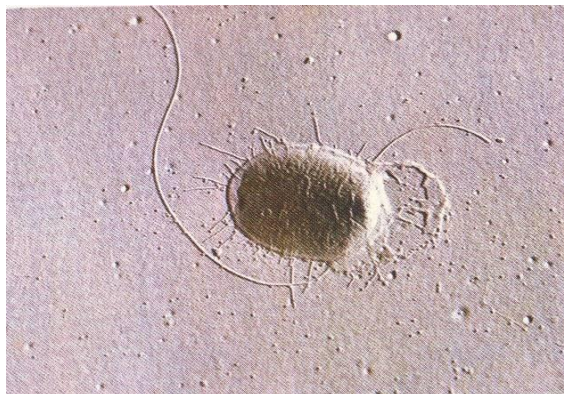


Figura 3. Fotografía estudio, observada al electrónico, nótese peritricos (de mayor característicos del

Fuente: Guevara *et al.* 1999.

de bacteria en microscopio los flagelos longitud) género Erwinia.

**Epidemiología.-** Esta bacteria sobrevive en el suelo, residuos de plantas, en el agua y por lo menos 1 año sin la planta hospedera, en las hojas de plantas hospederas, no hospederas y en invernaderos. *Erwinia* puede diseminarse a través del riego y por aparatos bucales de insectos (Rivera 1999).

*Erwinia* sp. a diferencia de los hongos, penetra en el hospedero por aberturas o heridas naturales (estomas, lenticelas, hidatodes, estigmas, cicatrices foliares), o a través de los daños producidos por labores de cultivo, cambios climáticos bruscos, algunos insectos u otros agentes físicos o biológicos (Latorre, 1999).

### 2.1.3. Manejo de la Enfermedad

Para evitar las infecciones de las plantas en la etapa de vivero se recomienda utilizar suelo esterilizado; realizando desinfecciones con vapor, formol 10 %, agua hirviendo; uso adecuado del agua para regar, para evitar la alta humedad del suelo; en plantaciones establecidas aplicar una solución de Aliette en la dosis de 0,75 a 1 g/l aplicado cada dos semanas por cuatro o cinco meses (Quezada, 2007).

Se ha podido analizar que en viveros y después del ataque de algunas enfermedades, la consecuencia de la pudrición de flecha y en general de la planta, proviene de la presencia de bacterias, por lo que es importante realizar un control estricto mediante la utilización de bactericidas específicos como la estreptomycin (Agrimizin). Gracias al avance de la ciencia se ha logrado conseguir productos naturales a base de semillas de toronja como Citrex y Quilol que se utilizan en dosis de 1,5 a 2,5 cc/l como control preventivo (Rivera, 1999).

Rivera (1999), manifiesta que *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora* pueden ser controlados con medidas culturales para evitar la infección, esto es mejorando el drenaje del suelo ó a su vez favorece la aireación en el área afectada podando tallos sanos y enfermos y reduciendo el follaje.



En controles químicos para *F. moniliforme* se recomienda los productos Benomil, Mancozeb y Cloratonil en las dosis recomendadas por el fabricante. Para el caso de *P. palmivora* realizar controles con Pyroxyclor, Metalaxil o Ridomil, los Fosetil como Aliette, este último debe aplicarse máximo a los dos días después de la siembra en los viveros y máximo hasta los cuatro o cinco días después del trasplante en la dosis de 0,75 a 1 g/l.

El mejor método de combatir las enfermedades es la prevención y mucho mejor si se utilizan productos biológicos, el uso de *Trichoderma* spp. es una alternativa natural. *Trichoderma* spp. es un hongo de suelo antagonista de hongos patógenos, también es bioestimulante que induce a incrementar el sistema radicular aumentando la biomasa de la planta (Equabiológica, 2006).

## **2.2. CONTROLADORES QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD PUDRICIÓN DE FLECHA DEL PALMITO**

El término fungicida, no solo se refiere a los productos químicos que tienen la propiedad de eliminar los hongos y crecimientos fungosos, sino que incluye también a aquellos que pueden crear un grado de resistencia a la planta o que convierten al medio en lugar no apto para el crecimiento de un microorganismo fungoso (Vallejo, 1993).

En la actualidad también encontramos los biofungicidas o fungicidas biológicos desarrollados por empresas y laboratorios, estos se encuentran disponibles en el mercado como formulados eficientes en el control de enfermedades fungosas. Algunos de los ejemplos exitosos de la tecnología del biocontrol son los productos desarrollados a partir de hongos como *Trichoderma* sp (Yáñez, 2003).

### **2.2.1. Fungicidas Químicos**

Según el Vademécum Agrícola (2006) los fungicidas químicos utilizados en la investigación poseen las siguientes características:

#### **2.2.1.1. Fosetil-Al**

Es un fungicida de doble sistemia con acción sobre enfermedades producidas por hongos Oomicetos y Deuteromicetos.

**Formulación y concentración:** es una formulación en polvo mojable que contiene 800 g de ingrediente activo por kg de formulación.

**Modo de acción:** Es un fungicida con efecto de sistemia ascendente y descendente, que estimula los mecanismos naturales de defensa de la planta, el cual al ser

absorbido se metaboliza rápidamente y es transportado por la savia, a toda la planta, incluyendo los rebrotes que se forman después de la aplicación.

**Días a la cosecha:** Se debe aplicar 30 días antes de la cosecha en la mayoría de cultivos, con excepción en piña que son 60 días.

### **2.2.1.2. Sulfato de cobre pentahidratado**

Es un fungicida-bactericida sistémico, de acción preventiva y curativa contra una amplia gama de enfermedades bacterianas y fungosas que afectan los cultivos ornamentales, frutales, hortalizas y cultivos extensivos e intensivos como el palmito.

**Formulación y concentración:** es una formulación en líquido soluble que contiene 240 g/l de ingrediente activo.

**Modo de acción:** es absorbido por la planta y transportado por la corriente de savia, permitiendo que las moléculas de cobre sean absorbidas y transportadas vía sistémica a través de los tejidos de la planta, controlando una amplia gama de enfermedades fungosas y bacterianas. Inhibe la germinación del estado vegetativo de los hongos, destruyendo la pared celular y sobre las bacterias, inhibe la germinación de las esporas y destruye la pared celular bacteriana.

**Días a la cosecha:** No tiene restricción, el ingreso a la plantación se puede realizar una vez que el producto se haya secado de las hojas.

### **2.2.1.3. Hymexazol**

Es un fungicida sistémico de suelo y desinfectante, es muy efectivo contra hongos de suelo particularmente *Aphanomyces* spp., *Phythium* spp., *Cortisium* spp., *Fusarium* spp. Además actúa como promotor de crecimiento de las plantas en muchos cultivos como el palmito para obtener mejor producción, siendo su aplicación segura tanto para el entorno como para el aplicador (Sumitomo 2007).

**Modo de acción:** Es de acción fungistática, ya que impide el desarrollo o crecimiento del hongo en cuestión. Una de sus principales características es la actividad inhibidora del crecimiento micelial, esta es mayor cuando el producto se aplica al suelo debido que tiene un efecto sinérgico con los iones metálicos del suelo como el hierro y aluminio (Sumitomo 2007).

**Frecuencia de aplicación:** Para el control de *Fusarium*, es requerido aplicaciones repartidas con una semana de intervalo durante el período de presión de infestación alta (Sumitomo 2007).

**Días a la cosecha:** 15 días antes de la cosecha realizar la última aplicación.

### **2.2.2. Fungicida Biológico**

El control biológico o biocontrol de agentes causales de desordenes bióticos o abióticos de las plantas posee algunas ventajas, en relación con los controladores químicos o pesticidas que se utilizan frecuentemente en la agricultura. Los agentes de control biológico tienen la propiedad de autoreplicarse, establecerse en determinados sustratos y ecosistemas, de colonizar semillas, etc. En cambio la mayoría de los pesticidas agrícolas convencionales, tienen un efecto temporal y usualmente necesitan ser aplicados repetidamente para asegurar su efectividad. Otra de las ventajas, es que los métodos de biocontrol son altamente compatibles con las prácticas agrícolas comunes, necesarias, como fundamento de conservación de fuentes naturales bióticas y abióticas (Falconí 1997).

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Orietta y Larrea, 2001).

Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. El efecto principal de *Trichoderma* es por hiperparasitismo, aunque algunas especies y cepas pueden producir metabolitos bioactivos que incrementan su acción. Además algunos aislamientos controlan nemátodos (Orietta y Larrea, 2001).

#### **2.2.2.1. *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viridae*** **(producto comercial Trichoeb)**

Equabiológica 2006, describe al producto así:

**Cepas:** *Trichoderma viridae* y *Trichoderma harzianum*. Fungicida biológico, bio-regulador y antagonista de fitopatógenos. Contiene conidias del hongo *Trichoderma spp.*

**Modo de acción:** su acción está determinada por la competencia por nutrientes y espacio, parasitismo y antibiosis, protegiendo el área radicular, también ayuda en la absorción de micronutrientes estimulando el crecimiento de la planta y además ayuda a activar los mecanismos naturales de defensa de la planta.

**Concentración:** cada gramo contiene al menos  $2 \times 10^9$  UFC.

**Recomendación de Aplicación:** al ser un hongo de suelo se recomienda que las aplicaciones deben realizarse al suelo para mejores resultados.

- Aplicaciones foliares en el haz y envés de la hoja. (Uso de adherente).
- Preferiblemente manejar un pH 7 para la aplicación.

- La aplicación manual con bomba de mochila debe ser de 3 a 5 g por bomba de 20 l. Realizar una premezcla para garantizar disolver el producto y la uniformidad de las conidias en la aplicación.
- No exponer el producto al sol ni altas temperaturas. Aplicar en horas frescas.
- Se recomienda realizar las aplicaciones en la tarde cuando hay menor incidencia de rayos ultravioleta.

#### **2.2.2.2. Biocontrolador *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma*, es un tipo de hongo anaerobio facultativo, pertenece a la subdivisión Deuteromicete que se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Páez, 2006).

*Trichoderma*, constituye un modelo excepcional, y para muchos autores se trata de un biocontrolador “modelo” para el estudio de biocontrol, en primer lugar por tratarse de un microorganismo ubicuo, fácilmente cultivable en diferentes medios de cultivos, de crecimiento rápido en varios substratos y huéspedes, es raramente patogénico en plantas superiores, actúa como micoparásito y es buen competidor por fuentes nutritivas, produce antibióticos y un sistema enzimático capaz de atacar a una amplia gama de fitopatógenos (Falconí, 1997).

*Trichoderma*, es injustamente considerado sólo como antagonista de hongos, ha sido reportado con buenos resultados como antagonista de patógenos bacterianos, ha sido estudiado intensamente por sus propiedades antibióticas y su sistema enzimático en el proceso de alimento y en la biodegradación, como bioindicador (Falconí, 1997).

#### **1) Tipos de antagonismo**

Los mecanismos antagónicos que utiliza *Trichoderma* sp. se describe como antibiosis, micoparasitismo y competencia, sin ser estos mutuamente excluyentes y pudiendo, por lo tanto, actuar a la vez (Dubos, 1987).

- Antibiosis

Sin establecer contacto físico alguno *Trichoderma* sp. puede inhibir el crecimiento de otros hongos mediante la

producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, viridina y gliovirina (Howell, 1993).

#### - Micoparasitismo

Existen cuatro estados de parasitismo en la relación antagónica de *Trichoderma sp.* con otros hongos (Erazo, 2007):

- Crecimiento quimiotrófico: El estímulo químico proviene del hongo objeto de control.
- Reconocimiento específico: Probablemente mediado por lecitinas sobre la superficie celular, tanto del hongo antagónico como del patógeno.
- Unión y crecimiento de las hifas alrededor del patógeno.
- Secreción de enzimas líticas que degradan las paredes celulares del hongo fitopatógeno.

#### - Competencia

Si el crecimiento del antagonista provoca la reducción de la población del patógeno, la competencia entre estos puede resultar en control de la enfermedad (Erazo, 2007).

## 2) Crecimiento *in vitro*

Los cultivos en placas toman un color verde brillante debido a los conglomerados de conidios que se forman en las puntas de las hifas, sin embargo, se ha señalado que también pueden ser de color blanco o amarillo (Velázquez *et al.* 1995).

Windham *et al.* (1986) realizaron una descripción de una cepa de *Trichoderma harzianum*, indicando que se desarrollaba rápidamente, cubriendo el medio de cultivo, contenido en placas de petri de 100 mm, en cuatro días.

La mayoría de especies de *Trichoderma* tienen un buen efecto antagónico *in vitro* capaz de detectar a su hospedante a distancia y posterior a la detección comienza la emisión de hifas y ramas de forma atípica hacia el hongo patógeno, además de

competir eficientemente por espacio y nutrientes (Weels, 1986; Chet, 1987. Citado por Núñez, 2003).

En el Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Central de las Villas, Argentina, se evaluó el efecto antagonístico in vitro de diferentes aislamientos de *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum*, el antagonismo se determinó por observaciones macroscópicas en la interacción de hifas (micoparasitismo) y competencia por el sustrato. Los resultados a las 48 horas muestran que varios aislados entre ellos Ts-20, Ts-29, Ts-30 Y Ts-21 produjeron un PICR (porcentaje de inhibición de crecimiento radial) del hongo patógeno superior al 32 %, a partir de los cuatro días los aislados producían un PICR superior al 65 % sobresaliendo Ts-20 con un 73 % (Bernal *et al.* Citado por Núñez, 2003).

### 3) Hongos Controlados por *Trichoderma*

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Ezziyani *et al.* 2004).

Cuadro 1. Tabla de diferentes especies de hongos fitopatógenos controlados por *Trichoderma* spp.

Fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i> spp.	Enfermedad	Cultivo
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Papa, tomate, fríjol, fresa, flores,
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición	Maíz
<i>Phytophthora infestans</i>	Pudrición	Tabaco, flores, frutales, etc.
<i>Phytophthora</i> spp	Pudrición algodonosa	Varios cultivos.
<i>Pythium</i> spp	Marchitamientos vasculares	Papa
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pudrición	Papa, tomate, fríjol, plátano, maíz, clavel.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Marchitamientos vasculares	Zanahoria, tomate, lechuga, col, café, papa, cebolla, ajo, pimentón.

Fuente: Adaptado de: Herrera-Estrella y Carsolio, 1998 y Chet and Inbar, 1994.

Citado por Páez, 2006.

## 2.3. PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL

Diversos bioproductos pueden también ser procesados rápida y eficientemente, bajo condiciones de laboratorio, artesanal e industrialmente. Varios materiales de soporte, inertes u orgánicos, pueden ser usados, sobre los cuales, los agentes de biocontrol (*Trichoderma* spp.) pueden crecer antes de aplicarlos al cultivo. Los materiales de soporte tienen que ser preparados asépticamente y mantenidos libres de contaminantes durante períodos de incubación larga (Yáñez, 2003).

Los métodos alternativos para la elaboración de un biocontrolador se emplean teniendo en cuenta la forma de aplicación y el mecanismo de acción que ejerce el biocontrolador en el control de los patógenos. La producción se acompaña por un reglamento de control de calidad que incluye verificación de la pureza y la efectividad biológica de cada una de las etapas del proceso y al producto final, el cual está constituido por la biomasa del hongo, metabolitos y residuos del medio de cultivo (Stefanova, 2000).

La tendencia actual está orientada al uso de biopesticidas a base de hongos y bacterias, en combinación con ingredientes comerciales, de manera tal que el principio activo se mantenga estable, efectivo y fácil de aplicar. La utilización de biopesticidas junto a la rotación con agroquímicos está dirigida a optimizar el manejo y explotación de recursos agrícolas, mediante la reducción de la toxicidad, residualidad y disminución de costos de producción (Yáñez, 2003).

### **2.3.1. Tipos de Producción**

Los métodos de producción dependen de los microorganismos y sus requerimientos, además de la factibilidad tecnológica y económica. Pueden ser de dos tipos: artesanal e industrial. En este capítulo se estudiará la producción artesanal por ser la utilizada en la investigación.

#### **2.3.1.1. Producción artesanal de biopreparados a base de**

##### ***Trichoderma* spp.**

Para la reproducción masiva de cepas promisorias de *Trichoderma* para el control de hongos patógenos del suelo se utilizan métodos bifásicos, líquido-líquido y líquido-sólido (Stefanova, 2000). Aún cuando los volúmenes de producción sean grandes, se consideran artesanales por la manipulación manual durante el proceso de producción.

Yáñez (2003), en cinco pasos describe el proceso de producción y formulación artesanal de biopreparados a base de *Trichoderma*, como se describe a continuación:

#### **1) Proceso de producción y formulación**

Dada las características del hongo, se puede trabajar con tres tipos de soporte: turba, vermiculita y arroz humedecido más aceite. Adicionalmente se realizan ajustes en el procesamiento de los soportes como: humedad, producción y volumen de inóculo en medios enriquecidos, tiempo de maduración, almacenamiento y controles de calidad.

## **2) Procesamientos de soportes**

Cuando se trabaja con turba y vermiculita es necesario realizar un acondicionamiento en fundas de plástico con 100 g de soporte procesado.

Para el caso de arroz humedecido, este se debe colocar en recipientes de 4-5 l de capacidad, lleno con una mezcla de agua corriente y aceite (20-30 ml). El arroz se mantiene en remojo durante 24 horas a temperatura ambiente y luego del remojo, el agua es retirada mediante un cernidor casero y se colocan 100 g en fundas plásticas translúcidas de 0,05 mm de espesor. Las fundas con sustrato se sellan y se esterilizan a 121 °C, durante 15 min.

## **3) Preparación del inóculo de *Trichoderma* spp.**

Para favorecer el desarrollo y la concentración de la biomasa del hongo, sobre los soportes, se debe trabajar con cultivos de *Trichoderma* spp. de 72 horas de incubación mediante un proceso de fermentación del hongo en medio líquido enriquecido.

Por otro lado la preparación de aislados puros en cajas de petri consiste en obtener cultivos puros de *Trichoderma* spp. en cajas con agar papa dextrosa incubando de 48 a 72 horas a 28 °C, bajo luz blanca para favorecer la esporulación del hongo. A partir de los aislados puros de *Trichoderma* spp. en agar papa dextrosa, se preparan suspensiones del hongo en un rango de concentración de  $1,5 \times 10^9$  a  $2,1 \times 10^9$  ufc/ml en tubos de ensayo con 5 ml con solución salina estéril (cloruro de sodio al 1 %).

Antes de la inoculación, en el soporte se realiza un control de pureza y viabilidad de los medios líquidos. Para esto se usa la tinción con azul lactofenol. La determinación de concentración y viabilidad se hace mediante conteos de conidias, en la cámara de Neubauer se observa el crecimiento en agar papa dextrosa.

## **4) Incorporación de inóculos de *Trichoderma* spp. a Soportes.**

Debido a que las formulaciones sólidas para hongos resultan más estables cuando los porcentajes de humedad relativa se mantienen por debajo de 10 % ya que existe una relación inversa entre el porcentaje de humedad del formulado y su persistencia a diferentes temperaturas, el volumen de inóculo usado fluctúa entre el 10 % y el 20 %, dependiendo del tipo de caldo y soporte.



## 5) Maduración y almacenamiento de biopreparados

El soporte con el material inoculado, se incuban a 28 °C, de seis a ocho días, para la fase de maduración. Cada tres días se homogeniza el material, de forma manual, cuidando de no romper el empaque para lograr una distribución homogénea del hongo, detectar presencia de contaminantes y controlar humedad. Los biopreparados en turba y vermiculita se mantienen a temperatura ambiente y los procesados en arroz en refrigeración, entre cuatro a diez °C. Se hacen controles de calidad, viabilidad y variación de pH cada ocho días durante el almacenamiento.

### 2.4. LIOFILIZACIÓN

Uno de los problemas que siempre ha preocupado a los investigadores y científicos, es el de la habilidad que presentan gran números de productos biológicos, químicos y alimenticios, que al ser fácilmente desnaturizables, no permiten su conservación sin que sus cualidades originales sean alteradas (Navarro, 1998).

La liofilización es un proceso que consiste en secar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por lo tanto el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido (Navarro, 1998).

Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente redisuelta en agua, logrando una preservación óptima de las cualidades del producto original (Torrecilla, 2002).

Por tal motivo la liofilización es una alternativa para conservar cepas de agentes de control biológico, ya que garantiza la viabilidad de las mismas.

#### 2.4.1. Procesos de Liofilización

Torrecilla (2002), manifiesta que la liofilización comprende tres etapas: congelación, secado y almacenamiento como se muestra en la figura 4.

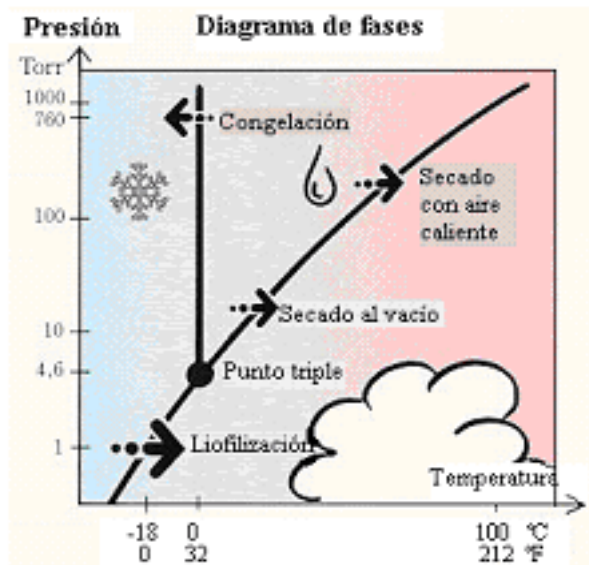


Figura 4. Etapas Liofilización.  
Fuente: Torrecilla, 2002.

de la

#### 2.4.1.1. Congelación

Cada producto debe congelarse de una manera tal que garantice que sufrirá pocas alteraciones en el proceso posterior de sublimación. Se debe conocer con precisión:

- La temperatura en la que ocurre la máxima solidificación
- La velocidad óptima de enfriamiento
- La temperatura mínima de fusión incipiente

Se busca que el producto ya congelado tenga una estructura sólida sin intersticios en los que haya líquido concentrado para propiciar que todo el secado ocurra por sublimación.

Una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación.

#### **2.4.1.2. Secado**

Es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. El proceso de secado puede ocurrir o no a bajas presiones pero en tales condiciones es mucho más eficiente el proceso, debido a que el paso de hielo a vapor requiere gran cantidad de energía que suministrada en alto vacío la interfase de secado se mueve hacia el interior de la muestra y el calor tiene que atravesar capas congeladas.

Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.

#### **2.4.1.3. Almacenamiento**

Los productos liofilizados y adecuadamente empacados, pueden ser guardados por largos periodos de tiempo ya que en buena medida retienen las propiedades físicas, químicas, biológicas y organolépticas de sus estados frescos. La liofilización, reduce las pérdidas de calidad debidas al deterioro por reacciones químicas, causado por degradación enzimática y no enzimática.

Los productos liofilizados pueden ser reconstituidos a su forma y estructura original por la adición de líquidos.

## **2.5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (AND)**

Todo organismo, aún el más simple, contiene una enorme cantidad de información en la forma de ADN. En cada célula el ADN se organiza en unidades llamadas genes, que en última instancia controlan todos los aspectos de la vida del organismo. Los genes almacenan la información en forma estable que puede copiarse de manera exacta y pasar de generación en generación (Viljee, Berg. 1998). Es por ello que mediante la manipulación y análisis del ADN se puede conocer dicha información que es única y exclusiva en cada organismo. Mediante técnicas de laboratorio que más adelante se indica se ha logrado extraer ADN de hongos antagonistas como *Trichoderma* para conocer su codificación genética y determinar la especie a la que pertenecen.

Farías (2005), indica que existen varias características que hacen que las técnicas de manipulación del DNA sean tan eficaces:

- En primer lugar el material genético está compuesto por solo dos tipos moleculares que en todos los organismos muestran el mismo comportamiento químico y físico, independientemente de su secuencia y del organismo que estudiamos.
- En segundo lugar, y al contrario que la mayoría de las otras moléculas biológicas, el DNA es extremadamente estable tanto al calor como al ataque químico, estas propiedades permiten manipularlo fácilmente y separarlo del resto de compuestos biológicos.
- El tercer factor es la capacidad de reproducir con facilidad algunos procesos biológicos del DNA en el entorno del laboratorio, procesos que han permitido desarrollar la tecnología de estas moléculas.

### 2.5.1. Enzimas de Restricción de ADN

El uso de enzimas de restricción permite llegar a algunos objetivos (Farías, 2005), como los que se detallan a continuación:

- Se puede cortar un genoma en fragmentos específicos de DNA, por ejemplo, combinando varias enzimas se puede fragmentar un genoma en trozos específicos más pequeños cuyos extremos son reconocibles al poseer las secuencias específicas de esas enzimas.
- Estos segmentos pueden separarse mediante electroforesis en agarosa, identificarse y aislarse además pueden volver a unirse a otros DNA de forma específica.
- Un DNA cuya secuencia desconocemos puede identificarse por su patrón de fragmentos generados por varias de estas enzimas.

En el cuadro 2 se indica varias enzimas de restricción, su función y origen.

Cuadro 2. Tabla de resumen de los procesos y herramientas empleados en biología molecular.

<b>Función</b>	<b>Enzima</b>	<b>Origen Biológico</b>
Enzimas para degradar el DNA y RNA	DNAsas y RNAsas	Bacteriano
Enzimas para cortar fragmentos de DNA	Restricción DNA	Bacteriano
Enzimas para unir fragmentos de DNA	Ligasas	Bacteriano
Enzimas para copiar DNA	Polimerasas	Bacterias termófilas
Enzimas para marcar y modificar nucleótidos	Metilasas	<b>Diverso</b>
Vectores de amplificación y clonación	Plásmidos	Bacteriano
Secuenciación	Virus, combinación de enzimas y nucleótidos	Vírico. Enzimas bacterianos
Expresión de genes	Organismos vivos, sistemas "in vitro"	Bacteriano, células eucariota, enzimas bacterianos
Síntesis de secuencias de DNA	Combinación de enzimas y métodos	Enzimas bacterianos

Fuente: Farías I. 2005.

### 2.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e *in vitro*, pequeñas cantidades de ADN. El producto que se obtiene al finalizar la reacción es una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza que favorece el estudio de estructura y función de los genes (Kornblihtt, 1993).

### 2.5.3. Etapas de la PCR

Rodríguez y Barrera (2004), indican que la reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos (Figura 5):

**Primero** ocurre la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95 °C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco.

**Segundo** se da la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con *primers* a una temperatura de entre 50 y 60 °C que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias.

**Tercero** una enzima ADN polimerasa extiende los *primers*, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde.

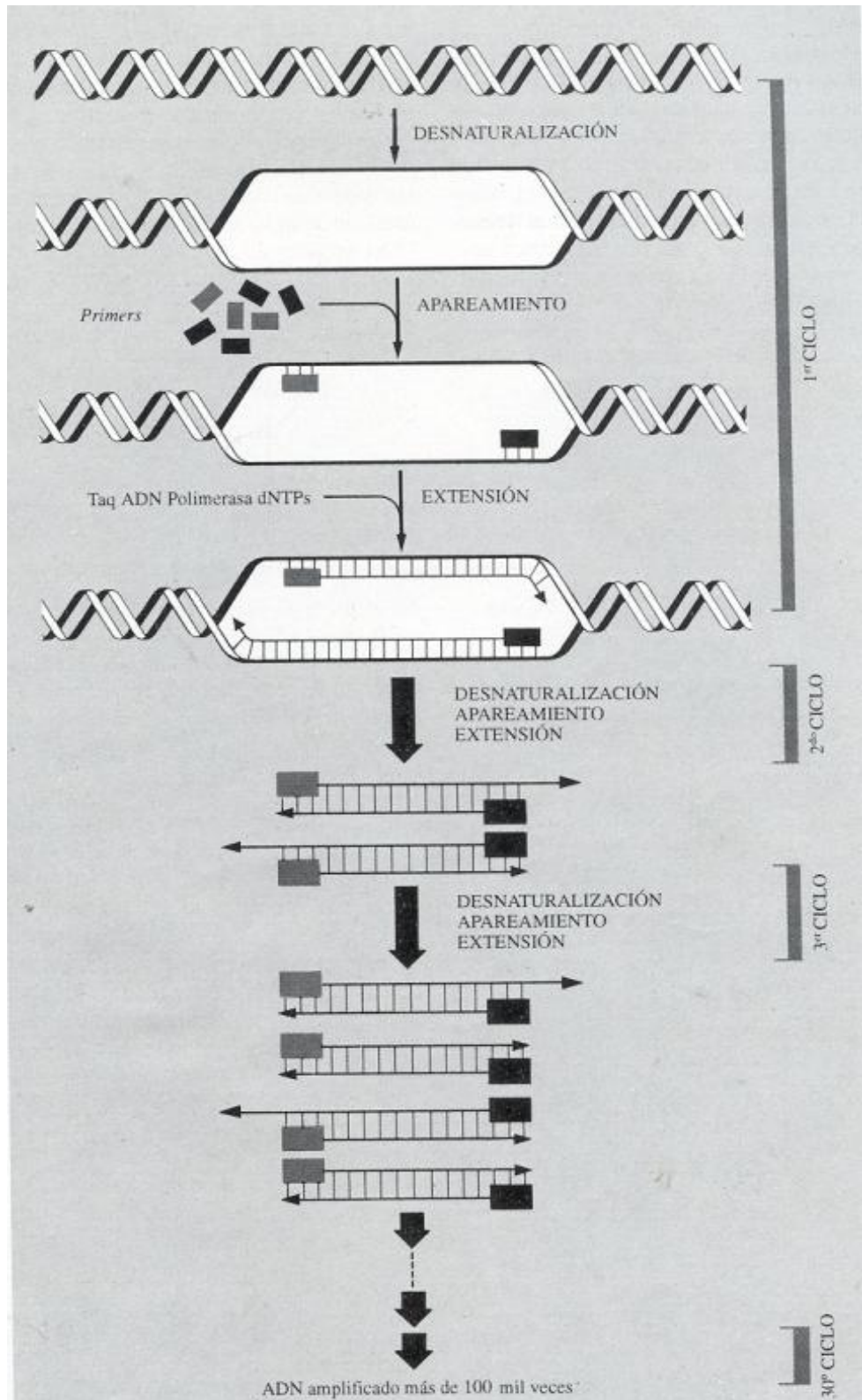


Figura 5. Etapas de la Técnica PCR. a) Desnaturalización; b) Apareamiento; c) Extensión.

Fuente: Kornblihtt 1993.

Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. Por otra parte, la técnica PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha: mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide (Kornblihtt, 1993).

#### 2.5.4. Secuenciación de ADN

Farías (2005), manifiesta que la secuenciación del ADN es la medida fundamental de la diversidad porque detecta polimorfismos dentro de los elementos básicos del ADN. Es el análisis más detallado de la estructura del ADN, consiste en averiguar la secuencia de nucleótidos. El procedimiento general de la secuenciación del ADN es el siguiente:

- El ADN se divide en fragmentos, que luego se sub-clonan.
- Cada pedazo corto se usa como una plantilla para generar un conjunto de fragmentos que difieren entre sí, en longitud, en una sola base.
- Los fragmentos se separan mediante electroforesis.
- Se identifica la base que queda al final de cada fragmento. Se recrea la secuencia original de las bases (A, T, C y G) de cada pedazo corto generado en el primer paso.
- Las secuencias cortas se ensamblan en una secuencia larga, tal como se observa en la figura 6.

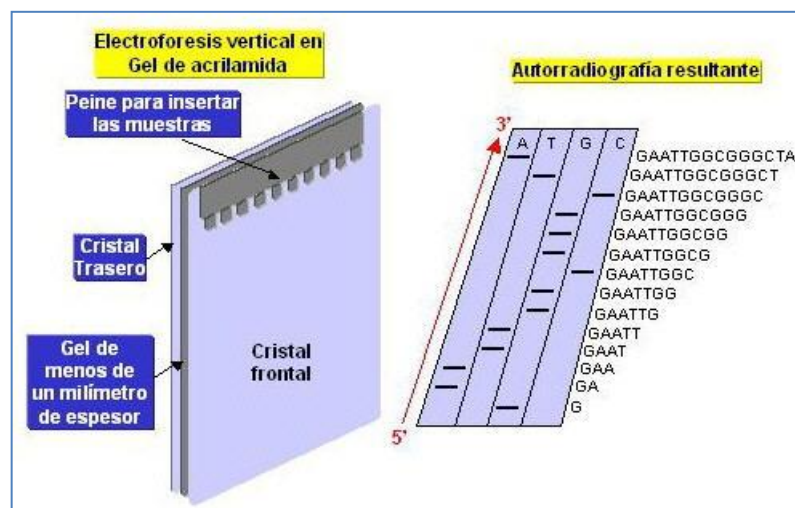




Figura 6. Separación de fragmentos mediante electroforesis.  
Fuente: Farías, 2005.

La secuenciación permite conocer en forma detallada la secuencia del ADN, cuando se pretende determinar especies de microorganismos se debe usar la información de la secuenciación para analizarla con el banco de genes mundial mediante el uso de programas bioinformáticos como el BLAST y CLUSTALW.

El BLAST es un programa o banco de genes mundial que almacena la información genética de todas las especies: humana, animal y vegetal, incluyendo los hongos. Por medio de este programa se puede comparar la información genética obtenida de la secuenciación con la información genética almacenada en el BLAST y determinar género o especie del organismo en estudio.

El CLUSTALW, es un programa que permite alinear las secuencias comparadas en el BLAST, es decir permite observar el lugar exacto de la secuencia de ADN donde existe la diferencia en caso de existir.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Los procedimientos de aislamiento, purificación e identificación de los agentes de control biológico, agentes fitopatógenos y preparación de biocontrolador realizados en fase de laboratorio se llevaron a cabo en la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Santo Domingo de la Escuela Politécnica del Ejército “ESPE”, laboratorio de Fitopatología ubicado en el km 35 de la vía Santo Domingo – Quevedo, siendo sus coordenadas planas UTM 9926280 / 9944700 Norte y 666920 / 694760 Este, a una altitud de 234 msnm<sup>1</sup>.

La fase de campo para la evaluación de controladores químicos y biológicos sobre la enfermedad pudrición de flecha se llevó a cabo en una plantación catalogada como zona experimental, integrada a la Industria Agrícola Exportadora INAEEXPO, la misma que se encuentra ubicada en el Cantón Santo Domingo, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas. En el cuadro 3 se detallan las características geográficas de la zona experimental.

Cuadro 3. Ubicación geográfica de la zona experimental

<b>Nombre de la Propiedad</b>	QUIROPALMA
<b>Ubicación:</b>	km 35 Vía a Quevedo. Comuna Dos de Agosto
<b>Coordenadas Planas UTM</b>	
<b>Norte:</b>	9944720 / 9963140
<b>Este:</b>	639100 / 666930
<b>Altitud (m.s.n.m.)</b>	
<b>Cotas extremas</b>	409 y 100

Fuente: Instituto Geográfico Militar, 2000.

### **3.2. MATERIALES**

<sup>1</sup> Instituto Geográfico Militar, 2000.

#### **3.2.1. Materiales de la Fase de Laboratorio**

##### **3.2.1.1. Equipos**

- Autoclave vertical
- Cámara de flujo laminar
- Estufa incubadora
- Refrigerador
- Microscópio compuesto
- Cámara de recuento (Newbauer)
- Liofilizador
- Sistema de pre - congelamiento
- Sistema de Electroforesis Vertical
- Centrífuga
- Termociclador
- Baño Maria

##### **3.2.1.2. Sustancias y reactivos**

- Agua destilada estéril
- Alcohol antiséptico
- Hipoclorito de Sodio al 5%
- Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa PDA
- Sulfato de Estreptomicina
- Nitrato de Calcio

- Nitrato de potasio
- Fosfato de potasio
- Cloruro de calcio
- Ácido cítrico
- Sacarosa
- Alcohol etílico
- Buffer CTAB
- Proteínasa K
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamil
- RNAasa
- Fenol-alcohol isoamilico
- Acetato de sodio
- Etanol 75%
- Agarosa
- Bromuro de etilo
- Talco microésteril
- Caldo de papa + sucrosa 1 %

### **3.2.1.3. Materiales de acero, vidrio y otros**

- Agujas de punta recta
- Asas de inoculación
- Cuchara espátula
- Sacabocados № 3
- Pinza

- Bisturí
- Mechero
- Placas porta y cubre objetos
- Vasos de precipitación de 250 ml, 1000 ml
- Matraz erlenmeyer
- Varilla de vidrio
- Viales para liofilización
- Cajas petri de vidrio (70 mm – 90 mm)
- Cajas petri desechables
- Tubos eppendorf
- Micropipeta BOECO 500 µL.
- Algodón estéril
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Guantes de cirugía
- Mascarilla
- Material vegetal enfermo
- Patógenos (*Fusarium moniliforme*, *Phytophthora palmivora* y *Erwinia*)
- Antagonista (Cepas de *Trichoderma* nativa y comercial Trichoeb)

### 3.2.2. **Materiales de la Fase de Campo**

- Cámara fotográfica
- Hojas de registros de campo

- Lápices
- Planos de la plantación
- Tablero de apuntes
- Regla graduada
- Flexómetro
- Termoculer
- Machete
- Palilla
- Fundas de plástico
- Barreno
- Cinta de Identificación roja
- Cinta de Identificación blanca
- Cinta de Identificación amarilla
- Guantes de cuero
- Trajes de aplicación
- Mascarilla de carbón
- Gafas plásticas para fumigar
- Tanque de 200 l
- Bombas de mochila de 20 lt.
- Boquillas de abanico 0.2 mm
- Vaso de precipitación plástico 200 ml
- Fungicida Hymexazol
- Fungicida Fosetil-Al

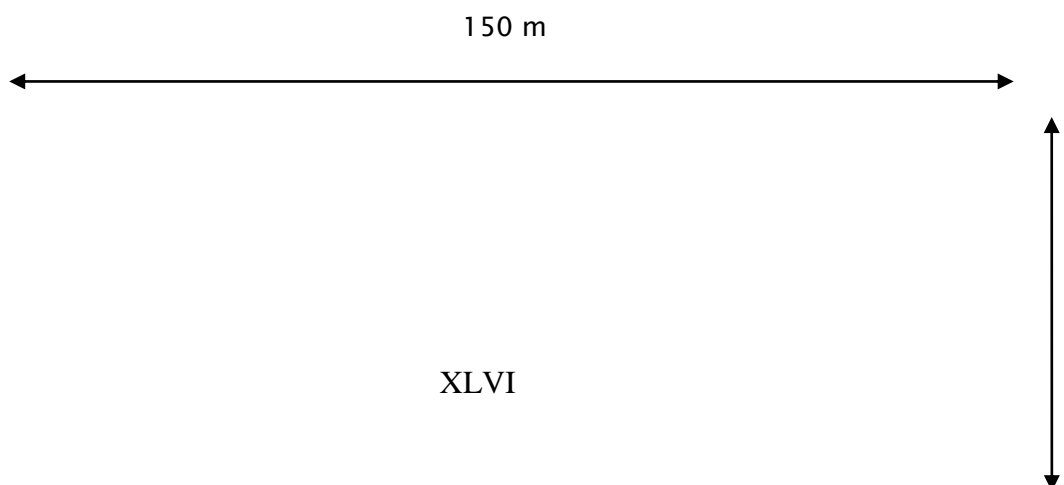
- Fungicida bactericida Sulfato de Cobre Pentahidratado.
- Fungicida biológico Trichoeb
- Biocontrolador *Trichoderma* sp
- Adherente fijador agrícola
- Ácido cítrico

### 3.3. MÉTODOS

#### 3.3.1. Características del Campo Experimental

Para la fase de campo de la investigación se seleccionó una plantación de palmito en producción (*Bactris gasipaes*) de variedad silvestre con espinas, proveniente del Oriente Ecuatoriano, con una densidad poblacional de 7 000 plantas/ha<sup>0</sup> y en promedio de cinco a siete años de edad, al iniciarse la investigación (Anexo 22).

El área experimental del ensayo fue de 7 500 m<sup>2</sup>, distribuidos en un diseño de bloques completamente al azar DBCA, cuyo número de parcelas fue 33 separadas por 4 m entre bloques y 4 m entre unidad experimental tal como se indica en la figura 7. Cada unidad experimental tuvo un área de 140 m<sup>2</sup> y una parcela neta de 60 m<sup>2</sup>.



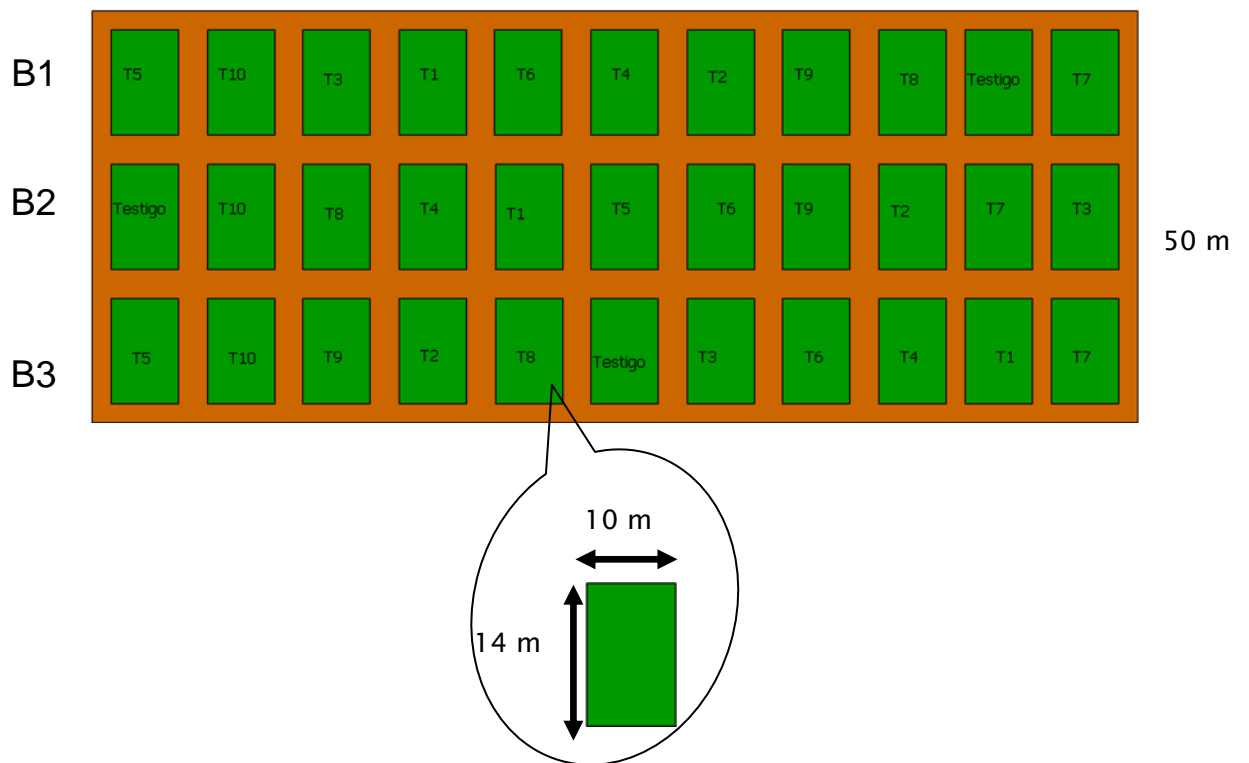


Figura 7. Distribución del área experimental y dimensiones de las parcelas.

Las unidades experimentales fueron debidamente delimitadas con estacas, piola de color rojo y rotuladas con letreros de acero inoxidable.



Figura 8. Rotulación de parcelas

### 3.3.2. Características Agroclimáticas

### 3.3.2.2. Fase de laboratorio

De acuerdo a los datos registrados en la Estación Meteorológica Puerto Ila del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI) durante Octubre del 2007 a Agosto del 2008, el Laboratorio de Fitopatología ubicado en la Hacienda San Antonio (ESPE), presentan las siguientes características climáticas: temperatura media anual de 24,9 °C, precipitación de 2564,6 mm/año, humedad relativa de 88 %, y heliofanía media anual de 727,5 horas-luz-año<sup>-1</sup>.

### 3.3.2.3. Fase de campo

De igual manera el INAMHI indica que la zona en estudio presenta las siguientes características climáticas: temperatura media anual de 26,91 °C, precipitación de 2744,30 mm/año<sup>-1</sup>, una humedad relativa que oscila entre 88 – 96 % con una heliofanía de 706,40 horas-luz-año<sup>-1</sup>. Los suelos generalmente profundos de topografía regular, su clase textural con predominancia franco arenosos (Anexo 16), en promedio ligeramente ácidos y con alto contenido de materia orgánica.

### 3.3.3. Factores en Estudio

En la fase de laboratorio los factores en estudio fueron:

- Cepas de *Trichoderma* spp. nativas
- Cepas de *Trichoderma* comercial Trichoeb

Mientras que en la fase de campo los factores en estudio fueron:

- **Hymexazol:** Fungicida para el suelo
- **Sulfato de cobre pentahidratado:** Fungicida – bactericida sistémico para el follaje.
- **Fosetil-Al:** Fungicida sistémico para el follaje



- *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* (Cepa comercial Trichoeb):  
para el suelo y follaje.
- **Biocontrolador *Trichoderma spp.*** Cepa nativa aislado para el suelo y follaje.

### 3.3.4. Tratamientos

En la fase de laboratorio se realizaron ensayos de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* y de acción inhibitoria “in vitro” (cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Esquema de los tratamientos para el ensayo de Crecimiento Radial de cepas nativas de *Trichoderma* aisladas.

<b>T3</b>	Cepa SG
<b>T4</b>	Cepa RV
<b>T5</b>	Cepa PV
<b>T6</b>	Cepa NI
<b>T7</b>	Cepa MT
<b>T8</b>	Cepa PL
<b>T9</b>	Cepa EE
<b>T10</b>	Cepa PS
<b>T11</b>	Cepa Mol
<b>T12</b>	Cepa 2A
<b>T13</b>	Cepa SA
<b>T14</b>	Cepa ZL
<b>T15</b>	Cepa Tch
<b>T16</b>	Cepa C3
<b>T17</b>	Cepa CSA
<b>T18</b>	Cepa C23
<b>T19</b>	Cepa STO DGO
<b>T20</b>	Cepa C2
<b>T21</b>	Cepa C5

<b>T22</b>	Cepa C13
<b>T23</b>	Cepa C7
<b>T24</b>	Cepa C9
<b>T25</b>	Cepa C17
<b>T26</b>	Cepa SP
<b>T27</b>	Cepa C27
<b>T28</b>	Cepa C28
<b>T29</b>	Cepa ZLE
<b>T30</b>	Cepa C26

La codificación de las cepas se puede observar en el anexo 1.

Cuadro 5. Esquema de los tratamientos para el ensayo de Acción Inhibitoria “in vitro”.

	<b>BIOLOGICO</b> <i>Trichoderma</i>		
<b>T1</b>	C9	vs.	P1
<b>T2</b>	C9	vs.	P2
<b>T3</b>	STO DGO	vs.	P1
<b>T4</b>	STO DGO	vs.	P2
<b>T5</b>	EE	vs.	P1
<b>T6</b>	EE	vs.	P2
<b>T7</b>	MOL	vs.	P1
<b>T8</b>	MOL	vs.	P2
<b>T9</b>	RV	vs.	P1
<b>T10</b>	RV	vs.	P2
<b>T11</b>	C26	vs.	P1
<b>T12</b>	C26	vs.	P2
<b>T13</b>	C27	vs.	P1
<b>T14</b>	C27	vs.	P2
<b>T15</b>	C23	vs.	P1
<b>T16</b>	C23	vs.	P2
<b>T17</b>	PL	vs.	P1
<b>T18</b>	PL	vs.	P2
<b>T19</b>	Tch	vs.	P1
<b>T20</b>	Tch	vs.	P2
<b>T21</b>	2A	vs.	P1
<b>T22</b>	2A	vs.	P2
<b>T23</b>	C7	vs.	P1
<b>T24</b>	C7	vs.	P2
<b>T25</b>	SG	vs.	P1
<b>T26</b>	SG	vs.	P2
<b>T27</b>	MT	vs.	P1
<b>T28</b>	MT	vs.	P2
<b>T29</b>	SP	vs.	P1
<b>T30</b>	SP	vs.	P2

<b>T31</b>	TESTIGO 1		P1
<b>T32</b>	TESTIGO 2		P2

P1: Patógeno 1 (*Fusarium moniliforme*)

P2: Patógeno 2 (*Phytophthora palmivora*)

Quince cepas de *Trichoderma* de las treinta aisladas fueron seleccionadas del ensayo de crecimiento radial, considerando la capacidad de crecer en PDA.

En la fase de campo para realizar el control químico y biológico de la enfermedad Pudrición de Flecha se dispuso de los siguientes tratamientos:

Cuadro 6. Esquema de los tratamientos para la evaluación de controladores químicos y biológicos en campo.

<b>T2</b>	Sulfato de Cobre Pentahidratado (SCP)
<b>T3</b>	Fosetil-Al
<b>T4</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> y <i>viridae</i> (Trichoeb)
<b>T5</b>	Biocontrolador <i>Trichoderma</i> spp. (CB)
<b>T6</b>	Hymexazol + SCP
<b>T7</b>	Hymexazol + Fosetil-Al
<b>T8</b>	SCP+ Fosetil-Al
<b>T9</b>	Tachirice 36 % L.S. + SCP+ Fosetil-Al
<b>T10</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> y <i>viridae</i> + CB
<b>T11</b>	Testigo

**CB:** Controlador Biológico

### 3.3.5. Procedimientos

#### 3.3.5.1. Análisis estadístico

##### 1) Fase de laboratorio

El análisis estadístico utilizado para evaluar el crecimiento radial en mm de las cepas de *Trichoderma* spp fue un Diseño Completamente al Azar (DCA).

Con el fin de determinar la eficiencia de las cepas de *Trichoderma* spp para el control de la Pudrición de Flecha, se estableció la regresión y la correlación entre el tiempo

de evaluación y el crecimiento radial en mm de *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora* dentro de cada cepa de *Trichoderma* spp.

## **2) Fase de campo**

Se determinó el porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de la primera, segunda y tercera generación, dentro de cada parcela neta se realizó nueve evaluaciones y se utilizó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA).

### **3.3.5.2. Características de las unidades experimentales**

#### **1) Fase de laboratorio**

En laboratorio la unidad experimental estuvo representada por una caja petri, en la que se realizó la siembra y medición del crecimiento de patógeno y antagonista. El medio de cultivo utilizado fue agar papa dextrosa (PDA).

#### **2) Fase de campo**

En la zona de estudio se distribuyeron 33 parcelas y en cada una de ellas se evaluó 15 plantas de la parcela neta, con una distancia de siembra de 2 x 0,70 m, el total de plantas evaluadas en el ensayo fue de 495.

### **3.3.5.3. Diseño experimental**

#### **1) Fase de laboratorio**

En el ensayo de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* aisladas, los resultados se evaluaron en análisis de varianza para un Diseño Completamente al Azar, y las medias fueron separadas mediante la prueba de Tukey (P= 5 %). Además para garantizar la confiabilidad del ensayo se midió el coeficiente de variación. En el cuadro siete se observa el esquema del ADEVA en DCA.

Cuadro 7. Esquema del ADEVA del DCA

<b>F DE V</b>		<b>GL</b>
TOTAL	N - 1	119
TRATAMIENTOS	T-1	29
ERROR EXPERIMENTAL	T(r-1)	90

Coeficiente de variación  $CV = \frac{\sqrt{CMEE}}{x} \times 100$ , donde:

CV: Coeficiente de variación

CMEE: Cuadrado medio del error experimental

x: promedio de datos

Para el ensayo de determinación de antagonismo los resultados se evaluaron mediante correlación y regresión lineal simple y se midió el coeficiente de variación (cuadro 8).

Cuadro 8. Esquema de Coeficientes de correlación y regresión.

Coeficiente de determinación	$r^2$
Ecuación de la regresión	$y = a + bx$

Coeficiente de variación  $CV = \frac{\sqrt{CMEE}}{x} \times 100$ , donde:

CV: Coeficiente de variación

CMEE: Cuadrado medio del error experimental

x: promedio de datos

## 2) Fase de campo

Los resultados de la variable Incidencia de la enfermedad en plantas de primera generación y a nivel de hijuelos se evaluaron en análisis de varianza para Diseño de Bloques Completamente al Azar, se realizó comparaciones ortogonales entre los tratamientos. Para garantizar la confiabilidad del ensayo se midió el coeficiente de variación. En el cuadro nueve se observa el esquema del ADEVA en DBCA.

Cuadro 9. Esquema del ADEVA del DBCA

<b>F DE V</b>		<b>GL</b>
---------------	--	-----------

TOTAL	N – 1	32
BLOQUES	R-1	2
TRATAMIENTOS	T-1	10
ERROR EXPERIMENTAL	R*T	20

Coeficiente de variación  $CV = \frac{\sqrt{CMEE}}{x} \times 100$ , donde:

CV: Coeficiente de variación

CMEE: Cuadrado medio del error experimental

x: promedio de datos

### **3.3.5.4. Datos a tomar y métodos de evaluación**

#### **1) Fase de laboratorio**

- Crecimiento radial

Se midió el crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* aisladas de las zonas en estudio en mm/día, la medición de crecimiento se realizó con la ayuda de una regla graduada.

- Acción Inhibitoria “in vitro”

Se evaluó el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* en contra de los hongos patógenos, midiendo el crecimiento radial del patógeno y del antagonista en mm/día a dos, cuatro, seis y ocho días después de la siembra.

Para la determinación de la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* se utilizó la escala de inhibición propuesta por Castro, B. (1995), citado por Núñez (2003) (cuadro 10).

Cuadro 10. Tabla de escala de calificación para seleccionar aislamiento de *Trichoderma* con actividad antagónica.

0	Crecimiento del patógeno y no de <i>Trichoderma</i>
1	Leve inhibición del patógeno; poco avance de <i>Trichoderma</i>
2	Inhibición del patógeno; leve crecimiento del antagonista sobre la colonia del patógeno.

3	Inhibición del patógeno, moderado crecimiento del antagonista sobre el patógeno
4	Completa inhibición del patógeno, agresivo crecimiento del antagonista sobre el patógeno.

Fuente: Castro, B. 1995. Citado por Núñez L., 2003.

## 2) Fase de campo

- Incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación

Para determinar la Incidencia de la enfermedad pudrición de flecha en plantas de palmito en la zona de estudio se realizó un muestreo, tomando como referencia las parcelas correspondientes a cada tratamiento, se consideró para la evaluación 15 plantas de la parcela neta. Las evaluaciones se realizaron a los 15 y 30 días después de cada programa de aplicación de controladores.

Para el cálculo de la incidencia de la enfermedad se utilizó la fórmula descrita por Horsfall (1980):

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Nº de plantas con síntomas de la enfermedad}}{\text{Nº Total de plantas muestreadas}} \times 100$$

incidencia de la enfermedad en la segunda generación

La determinación de incidencia en plantas de la segunda generación se basó en el conteo del número de hijuelos sanos y enfermos en las plantas evaluadas. Las evaluaciones se realizaron a los 15 y 30 días después de cada programa de aplicación de controladores.

Para el cálculo de la incidencia de la enfermedad a nivel de hijuelos se utilizó la fórmula descrita por Horsfall (1980):

$$\text{Incidencia a nivel de Hijuelos (\%)} = \frac{\text{Nº de hijuelos con síntomas de la enfermedad}}{\text{LV}} \times 100$$

Nº Total de hijuelos muestreadas

Con la finalidad de identificar fácilmente las plantas de primera generación a evaluar, cada planta fue identificada y numerada con una cinta de color rojo. (Figura 9).



Figura 9. Planta de palmito con cinta de identificación roja.

- Correlación y Regresión de los factores climáticos con la Incidencia de la enfermedad.

Para determinar el desarrollo de la enfermedad en cada uno de los tratamientos bajo la influencia de las condiciones ambientales, se registraron los datos meteorológicos durante el periodo de muestreo de Febrero a Agosto del 2008 y se realizó la correlación ( $r$ ) y regresión lineal simple del porcentaje de Incidencia e Incidencia a Nivel de Hijuelos con la Precipitación, Temperatura y Humedad Relativa, y se estableció los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) y ecuación de la regresión ( $y= a+bx$ ) para conocer la evolución de la enfermedad.

### **3.3.5.5. Métodos específicos del manejo del experimento**

#### **1) Fase de laboratorio**

- Localidades muestreadas

Las localidades muestreadas fueron:

- km 4 Vía a Puerto Limón (San Miguel, Cacao)
- km 17 Vía a Quevedo (San Andrés, Bosque Primario)



- El Carmen (San Rafael, Cacao)
- Nuevo Israel (Don Wilson, Cacao)
- San Gabriel (Primavera, Plátano)
- km 12 Vía a Quinindé (Mulaute, Palmito)
- El Carmen (Cacao)
- Luz de América (Zoila Luz, Palmito)
- km 26 Vía a Quevedo (Molestina, Palmito)
- Patricia Pilar (La Francia, Ají)
- San Jacinto (Cacao)
- El Esfuerzo (Cacao)
- Comuna Dos de Agosto (Quiropalma, Palmito)
- Río Verde (Cacao)
- km 13 Vía Puerto Limón (Cacao)
- San Miguel (Plátano)
- km 12 Vía Quinindé (Baque, palmito)
- km 12 Vía Qunindé (Paisaje, Bosque)
- km 12 Vía Puerto Limón (Plátano)

- Recolección de muestras

Las muestras de material vegetal enfermo fueron recolectadas en la zona de estudio, y colocadas en fundas plásticas debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio en un termoculer a 12 ° C de temperatura. Las partes de la planta que se obtuvieron las muestras fueron las siguientes:

**Área foliar:** Partes afectadas con síntomas iniciales como amarillamientos leves y avanzados. Además se tomaron muestras de tejido infectado del tercio medio de la hoja flecha.

**Estípite:** Se tomó la muestra de tejido sano y con síntomas de la enfermedad del corazón del palmito.

**Área basal:** De la manzana del corazón del palmito se tomó muestra de tejido infectado.

Con la finalidad de capturar cepas nativas de *Trichoderma* se recolectó una muestra de suelo constituida por cuatro sub-muestras (100 gr c/u) a una profundidad de 25 cm, se muestrearon 19 localidades en la zona de influencia al área de investigación.

- Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de microorganismos.

Se utilizó Papa-Dextrosa-Agar (PDA) como medio de cultivo para el aislamiento de los patógenos, siguiendo el procedimiento convencional de laboratorio. Para la captura del agente de control biológico se utilizó un medio selectivo para *Trichoderma* TMS (Anexo 2).

- Aislamiento de patógenos

El material vegetativo enfermo recolectado fue lavado con abundante agua y posteriormente se realizó una nueva limpieza con agua destilada estéril.

En la cámara de flujo laminar se cortó secciones de 3 a 5 mm de tamaño de tejido sintomático, luego se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % por espacio de dos minutos, posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril tres veces y se los colocó sobre un pedazo de papel filtro esterilizado para que se sequen.

Utilizando una aguja esterilizada se tomaron las porciones de tejido de palmito y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se procedió a incubar en la estufa a 28 °C durante 14 días, tiempo suficiente para que los hongos sembrados expresen su desarrollo (Anexo 24), luego se procedió a realizar la identificación morfológica mediante el uso de claves taxonómicas especializadas de Joseph Gilman (1963).

- Aislamiento de *Trichoderma* (antagonista)

Para el aislamiento de *Trichoderma* sp. nativo se procedió a secar las muestras de suelo obtenidas en cada localidad, se tamizaron y pesaron 10 gr para disolverlos en 100 ml de agua destilada estéril. La solución madre se dispuso en medio de cultivo específico para *Trichoderma*. Además se utilizó el sistema de siembra en grumos depositando homogéneamente sobre la superficie de la caja petri (Anexo 25).

Las cajas se incubaron en la estufa a 28 °C durante 14 días, para luego realizar repiques con el objetivo de purificar el hongo.

Se realizaron preparados microscópicos en placas y se observó las características morfológicas del hongo comparándolas con claves especializadas de identificación de hongos del suelo.

Producto del aislamiento se obtuvieron 14 cepas nativas de *Trichoderma*, las cajas con estas cepas fueron conservadas en refrigeración para realizar los ensayos de crecimiento radial y determinación del antagonismo.

- Ensayo de crecimiento radial de cepas de *Trichoderma*.

Para el ensayo de crecimiento radial se pusieron en estudio 30 cepas de *Trichoderma*, de las cuales 14 fueron resultado de los aislamientos de diferentes zonas de Santo Domingo, 15 pertenecen a la colección de la E.S.P.E. Santo Domingo y una cepa comercial. A cada una de las cepas se asignó un código.

Utilizando el sacabocados № 3, un disco del hongo se sembró en el centro de la caja petri con medio de cultivo PDA y se selló con papel parafilm y se incubó a 28 °C (Anexo 26).

Con el propósito de realizar lecturas del crecimiento radial se trazó una línea horizontal en la base de la caja petri para realizar mediciones los días uno y dos, y se obtuvieron los promedios del crecimiento final de cada antagonista (Anexo 5).

- Ensayo de determinación del antagonismo en contra de *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora*.

Se procedió a sacar discos de los cultivos puros de los patógenos de 14 días de crecidos con el saca bocados № 3, y se realizó la siembra diametralmente en una caja petri con medio de cultivo, al mismo tiempo se colocó en la misma caja petri discos con el agente de control biológico. Una vez realizada la siembra se incubó a 28 °C (Anexo 27).

Se realizó lecturas del crecimiento radial tanto del antagonista *Trichoderma* sp. como de los patógenos *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora* los días dos, cuatro, seis y ocho, obteniendo los promedios del crecimiento final en mm/día (Anexo 6).

- Preparación de biocontrolador a base de cepas de *Trichoderma*

Para la preparación del biocontrolador en forma líquida se realizó la determinación de la concentración de esporas de *Trichoderma* en la cámara de Neubauer, luego se determinó la concentración de las tres cepas de *Trichoderma* seleccionadas.

- Conservación de cepas de *Trichoderma*

Para la conservación de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas se realizó la liofilización en dos medios de cultivo: caldo de papa y micro talco estéril.

Para la liofilización en caldo de papa se esterilizó el medio de cultivo y los viales para liofilización, en la cámara de flujo laminar se hizo un lavado de las cajas petri que contenían las cepas para luego vaciar en frascos con 60 ml de caldo de papa, posteriormente se llenó los viales con 10 ml de la mezcla anterior (caldo de papa + *Trichoderma* sp.).

Los viales se sometieron a pre-congelamiento en el sistema de congelamiento sell frizzer por unos 3 min aproximadamente. Finalmente se colocó los viales en el liofilizador y se dejó durante 24 horas, luego se retiraron y sellaron.

Para la liofilización en microtalco se disolvió 300 g de talco en 300 ml de agua, esta mezcla se esterilizó en el autoclave durante 30 minutos. Posteriormente se realizó el pre-congelamiento de los frascos y finalmente se colocaron en el liofilizador y se dejó durante 48 horas.

- Extracción de ADN de cepas de *Trichoderma*

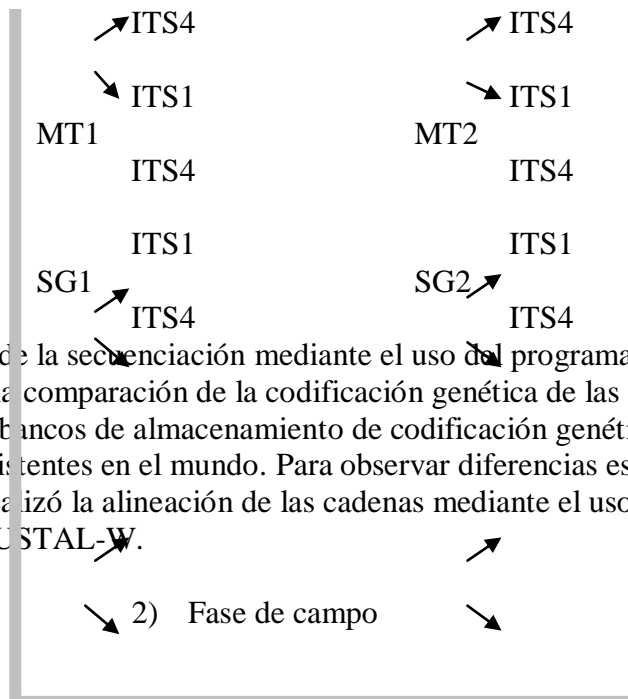
Para la extracción de ADN se siguió la metodología propuesta por Kim *et al.* 1992 modificada por Lee, 2000 y rectificada por Argoti, 2007 (Anexo 3).

Las muestras obtenidas mediante el protocolo de extracción se colocaron en el termociclador, se obtuvo una cadena de ADN amplificada, posteriormente se realizó la corrida en el sistema de electroforesis horizontal, para corroborar la presencia de ADN en las muestras.

En la extracción de ADN se utilizaron primers universales para hongos y se trabajó con las regiones más conservadas del ribosoma que son: ITS1 e ITS4.

Las muestras con ADN fueron enviadas al Laboratorio MACROGENE en Seúl-Corea, donde se realizó la secuenciación de la cadena de ADN de *Trichoderma* (Anexo 10-15). Por precaución se envió dos muestras de ADN de cada cepa como se indica en el cuadro 11.

Cuadro 11. Cepas de *Trichoderma* spp. con regiones del ribosoma 5.8s



Con los resultados de la secuenciación mediante el uso del programa bioinformático BLAST se realizó la comparación de la codificación genética de las cepas en estudio con la existente en bancos de almacenamiento de codificación genética de especies de *Trichoderma* existentes en el mundo. Para observar diferencias específicas entre las secuencias se realizó la alineación de las cadenas mediante el uso del programa bioinformático CLUSTAL-W.

- Factores bióticos y abióticos predisponentes a la Enfermedad

a) Análisis químico de suelo y foliar

Para el análisis de suelo de la zona de estudio se recolectó una muestra compuesta por 20 submuestras, a una profundidad de 20 cm con la ayuda de un barreno. Para el análisis foliar se tomó una muestra compuesta conformada por 10 submuestras (hoja tres según la filotaxia de las hojas de palmito) y se envió al laboratorio del Departamento de Suelos y Aguas del INIAP (Santa Catalina) para su correspondiente análisis.

b) Análisis microbiológico de suelo

Se recolectó muestras de suelo de la zona de estudio, a una profundidad de 15 cm con la ayuda de una pala, las mismas que se etiquetaron y se envió al laboratorio Agrodiagnostic para su respectivo análisis.

c) Cateo de raíces

Se tomaron 33 muestras en la zona experimental, 3 por cada tratamiento, donde se contó el número total de raíces, funcionales, necrosadas y el peso de las mismas, tanto en plantas sanas como enfermas con el objetivo de determinar si existe relación entre la enfermedad y el daño presente en raíces. La muestra representativa se la realizó a 15 cm del estípite a una profundidad de 20 cm de forma cuadrada, en plantas próximas a la cosecha. Se realizó cateo de raíces antes y después de realizar los programas de control.

- Aplicación de controladores químicos y biológicos para el control de la enfermedad.

Para el control de enfermedad se utilizó 3 fungicidas químicos y 2 fungicidas biológicos, se estableció programas de aplicación con duración de un mes y frecuencia de aplicación de treinta días entre programas.

Cada programa constó de cuatro aplicaciones semanales con los diferentes fungicidas según el tratamiento, las aplicaciones se realizaron con la ayuda de bombas de mochila de 20 l, utilizando una bomba para cada fungicida (Anexo 4).

Las aplicaciones se realizaron en drench al suelo para fungicidas de suelo como Hymexazol y *Trichoderma*, y foliar para los fungicidas sistémicos como sulfato de cobre pentahidratado y aliette. Además se midió el pH del agua antes de realizar cada programa de aplicación para garantizar la eficiencia de los productos químicos y biológicos.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. AISLAMIENTO DE PATÓGENOS

De las muestras de tejido enfermo procedente de las zonas en estudio se aislaron e identificaron dos géneros de hongos *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora* y la bacteria *Erwinia sp.*, causantes de la pudrición de flecha del palmito en la zona de Santo Domingo.

*Fusarium moniliforme* al desarrollarse en medio de cultivo PDA presentó crecimiento circular, con micelio afelpado y pegado al medio de cultivo, de coloración blanco durante las primeras 48 horas, posteriormente conforme se desarrolla toma un color amarillo brillante (Figura 10), presenta microconidios en cadenas persistentes o

unidos en cabezuelas falsas, macroconidios delicados, en forma de lezna o punzón, ligeramente en forma de media luna o casi rectos, puntiagudos en ambos extremos, en el microscopio se observan esparcidos o agrupados en esporodoquios, concordando con lo expuesto por Menezes (1995) y Gilman (1963).



Figura 10. Desarrollo de *F. moniliforme* en medio de cultivo PDA.

*Phytophthora palmivora* al desarrollarse en medio de cultivo PDA presentó crecimiento circular, con micelio afelpado y pegado al medio de cultivo, de coloración blanco durante las primeras 48 horas, posteriormente toma un color amarillo cremoso y cuando alcanza su crecimiento total y empieza a fructificar se torna oscuro (Figura 11), presentó clamidosporas abundantes aisladas, sus esporangios son papilados y ovoides con un pedicelo corto, las zoosporas son biflageladas, esto coincide con lo expuesto por Graham (2000).



Figura 11. Desarrollo de *P. palmivora* en medio de cultivo PDA.

En la identificación de la bacteria se encontró el genero *Erwinia sp.*, al realizar aislamientos las mismas presentaron forma cilíndrica con extremos redondeados, flagelación típicamente períttrica, encapsuladas, Gran negativa (-).



Figura 12. Desarrollo de *Erwinia* en medio de cultivo Manitol.

De las localidades muestreadas se aislaron e identificaron morfológicamente 14 cepas de *Trichoderma* sp.

En general las características morfológicas del género *Trichoderma* son: Hifas trepadoras, septadas, originando un césped miceliar aplanado, sólido. Conidióforos erectos, saliendo de ramas laterales cortas ramificadas, ramificación comúnmente opuestas, sin el ápice hinchado y produciendo de manera terminal cabezuelas de conidios. Conidios pequeños, la mayoría globosos, hialinos o de colores brillantes (Gilman, 1963).

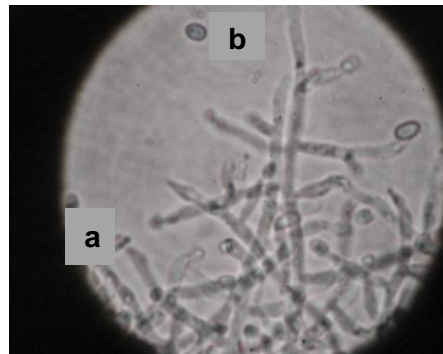


Figura 13. *Trichoderma*. a) conidióforos; b) conidios

#### 4.3. ENSAYO DE CRECIMIENTO RADIAL DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp.

La información del ADEVA (cuadro 12) indica la existencia de diferencias estadísticas altamente significativas de crecimiento radial en mm/día de las 30 cepas de *Trichoderma* en estudio.

Cuadro 12. Análisis de Varianza para el crecimiento radial de cepas de *Trichoderma*.

Modelo	5137,18	29	177,14	8,32	<0,0001
TRAT	5137,18	29	177,14	8,32	<0,0001**



Error	1916,75	90	21,30
Total	7053,93	119	

CV: 15,76 %

Al realizar la prueba de Tukey al 5 % (cuadro13) a los dos días de realizada la siembra, indica la existencia de nueve rangos de significación, distribuyéndose las medias del crecimiento del antagonista de manera diferente para estos dos periodos de evaluación.

La cepas de *Trichoderma* con mayor crecimiento se muestra en el tratamiento 11 con un promedio 42,00 mm a los dos días de evaluación, superior a los demás tratamientos. El tratamiento 10 tuvo el menor crecimiento con un promedio de 17,25 mm.

Estos resultados están dados porque *Trichoderma* tiene varias formas de crecimiento micelial y esporulativo (cuadro 14), también debido a que posee propiedades antibióticas y enzimáticas que determinan su capacidad biótica y antagonica, además son fácilmente cultivables en medio de cultivo PDA y la gran mayoría tienen rápido crecimiento debido a que son competidoras por fuentes nutritivas. Esto corrobora lo informado por Zunino (2004), quién indica que existe diferencias significativas en la tasa de crecimiento individual de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas y comerciales.

Cuadro 13. Prueba de Tukey al 5 % para el crecimiento radial de cepas de *Trichoderma* spp. a los dos días.

CEPAS	TRATAMIENTOS	PROMEDIOS	RANGOS
MOL	11	42,00	a
MT	7	38,25	a b
C9	24	38,00	a b c
EE	9	37,50	a b c
SJ	2	37,25	a b c
C26	30	37,25	a b c
RV	4	35,50	a b c d
SG	3	34,75	a b c d e
NI	6	34,50	a b c d e
PP	1	33,50	a b c d e f
PL	8	32,25	a b c d e f g
C27	27	32,00	a b c d e f g
SA	13	31,25	a b c d e f g h
STO DGO	19	30,75	a b c d e f g h
ZL	14	30,75	a b c d e f g h
CSA	17	27,75	b c d e f g h i
C7	23	27,25	b c d e f g h i
SP	26	26,50	b c d e f g h i
2 A	12	26,00	b c d e f g h i
C28	28	25,75	b c d e f g h i
C17	25	25,50	c d e f g h i
C13	22	24,25	d e f g h i

C5	21	24,00	d	e	f	g	h	i
ZLE	29	23,75	d	e	f	g	h	i
C2	20	22,25		e	f	g	h	i
Tch	15	21,75			f	g	h	i
C3	16	21,00			f	g	h	i
C23	18	20,75				g	h	i
PV	5	19,00					h	i
PS	10	17,25						i

En el figura 14 se puede apreciar el crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma spp*, en los días 1 y 2 después de la siembra, es notorio que la mayoría de las cepas tuvieron su máximo crecimiento en el día 2 (Anexo 6). Destacándose el tratamiento 11 el cual obtuvo el máximo promedio (42 mm) de crecimiento radial durante el período de evaluación. El tratamiento 10 tuvo el menor crecimiento con un promedio de 17,25 mm.

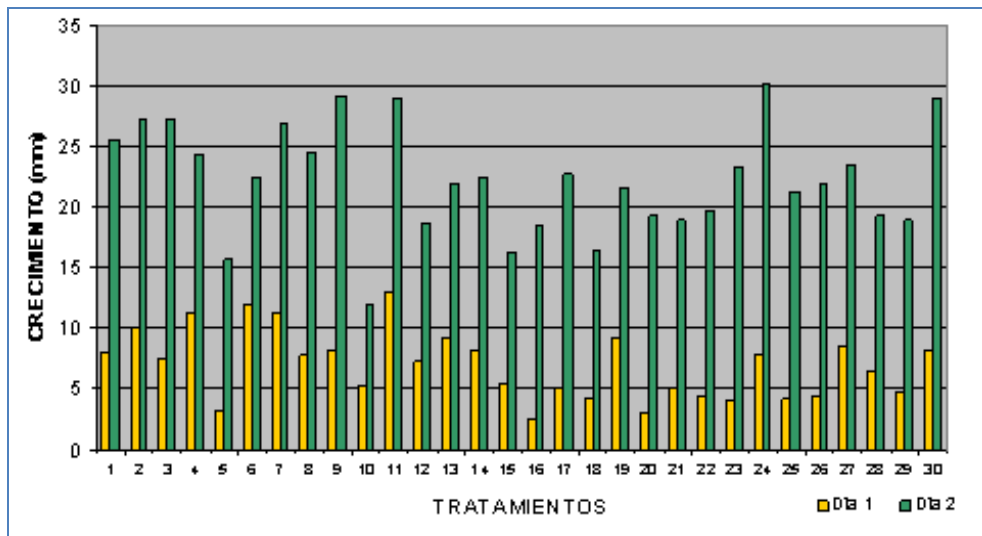


Figura 14. Crecimiento radial en mm/día de *Trichoderma* en los días uno y dos.

Las cepas nativas de *Trichoderma* tuvieron crecimiento variable, algunas crecieron rápido y otras lento, esto se debió a que la fase de adaptación al medio depende del origen de cada cepa ya que fueron aisladas de diferentes localidades, otra condición pueden ser que las necesidades nutricionales no fueron las adecuadas o suficientes para el desarrollo de estas cepas de *Trichoderma*. Benítez *et al.* (2008), coincide en mencionar que el crecimiento y proceso de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, tipo de cultivo y de condiciones ambientales tales como: disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura o la concentración de hierro.

En base al análisis estadístico y al tipo de crecimiento, del ensayo de crecimiento radial se seleccionó 15 cepas nativas de *Trichoderma*, estas cepas formaron parte del ensayo de antagonismo (cuadro 14).

Ocho de las quince cepas de *Trichoderma* seleccionadas tuvieron crecimiento esporulativo, coloración verde brillante y las siete restante son de crecimiento

micelial con coloración blanco o amarillo, esto se debe a que las especies en estudio fueron aisladas de varias localidades con diferentes tipos de suelos que da lugar a la existencia de una gran variedad de especies de *Trichoderma* y a diferentes formas de expresión en medio de cultivo. González *et al.* (1999), citado por Núñez (2003) indica la importancia de obtener aislamientos nativos de *Trichoderma*, ya que son mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la zona específica donde serán aplicados.

Las cepas con crecimiento esporulativo tornaron de color amarillento el medio de cultivo, esto se debe a que tienen actividad antagónica enzimática con producción de metabolitos. Las cepas con crecimiento micelial mantuvieron la coloración del medio.

Cuadro 14. Características del crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Cepas	Código	Tipo de crecimiento	Forma del borde de la colonia	Forma de la colonia	Color medio de cultivo
1	SG	Esporulativo-M	indefinido	algodonosa	amarillo
2	RV	Esporulativo-M	definido	algodonosa	amarillo
3	MT	Esporulativo-M	definido	algodonosa	amarillo
4	PL	Micelial	definido	algodonosa	natural
5	EE	Esporulativo-M	indefinido	algodonosa	amarillo
6	Mol	Esporulativo-M	definido	algodonosa	amarillo
7	2 A	Micelial	definido	algodonosa	natural
8	Tch	Micelial Esporulativo	indefinido	afelpada	natural
9	C23	Esporulativo	definido	radial	natural
10	STO DGO	Micelial	definido	algodonosa	natural
11	C7	Micelial	definido	algodonosa	natural
12	C9	Esporulativo-M	indefinido	algodonosa	amarillo
13	SP	Micelial	definido	algodonosa	natural
14	C27	Micelial	definido	afelpada	natural
15	C26	Esporulativo-M	definido	algodonosa	amarillo

M: Producción de metabolitos

#### 4.4. ENSAYO DE ACCIÓN INHIBITORIA

Con el fin de determinar la eficiencia de las cepas de *Trichoderma* spp en contra de los patógenos *F. moniliforme* y *P. palmivora* causantes de la enfermedad Pudrición de Flecha, se estableció la regresión y la correlación entre el tiempo de evaluación y el crecimiento radial en mm de *F. moniliforme* y *P. palmivora* dentro de cada cepa de *Trichoderma* spp.

Para determinar las cepas de *Trichoderma* que provocan un menor crecimiento en mm/día de los patógenos, se reemplazó valores de x en la ecuación de la regresión lineal simple.

Los menores incrementos radiales diarios de *F. moniliforme* se presentaron en los tratamientos 1 ( $Y = 6,80 + -0,83x$ ), 9 ( $Y = 7,50 + -1,02x$ ) y 25 ( $Y = 6,60 + -0,78x$ ), los menores incrementos en crecimiento de *P. palmivora* se obtuvo con los tratamientos 20 ( $Y = 13,80 + -1,97x$ ), 24 ( $Y = 14,90 + -2,10x$ ) y 28 ( $Y = 15,30 + -2,20x$ ), mientras que el mayor incremento radial de los patógenos se obtuvo con los tratamientos 31 ( $Y = 7,00 + 0,52x$ ) y 32 ( $Y = 21,60 + 2,30x$ ) que corresponde al testigo (cuadro 15).

De manera general, todas las cepas de *Trichoderma* inhiben en mayor o menor grado el crecimiento de los patógenos, debido a que tiene diferentes mecanismos de antagonismo, ya sea por antibiosis (producción de metabolitos), parasitismo (penetración de hifas y secreción de enzimas) o competencia (reducción de la población del patógeno), obstruyendo de esta forma las funciones biológicas y fisiológicas del patógeno. Cervantes (2004) indica que *Trichoderma* puede realizar parasitismo directo, secretar enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) y producir varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, viridina y gliovirina, que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped permitiendo la absorción de nutrientes del interior del hongo huésped.

La cepa comercial tiene un crecimiento constante hasta llegar al punto de encuentro del patógeno, no obstante este biocontrolador no logra ponerse en contacto con las hifas de los patógenos porque tiene un tipo de antagonismo por competencia que reduce población del patógeno sin ponerse en contacto con él.

Sin embargo los aislamientos de *Trichoderma* C9 (T1), SG (T25) y MT (T28) que corresponden a las zonas ESPE, San Gabriel y Mulaute respectivamente, se desarrollaron sobre los patógenos, debido que poseen mecanismo de actividad antagónica por parasitismo con secreción de enzimas, considerándose de esta manera las de mayor poder antagónico para el control de los patógenos. De acuerdo con lo informado por Mora (2001) son buenos antagonistas aquellas cepas de *Trichoderma* spp. que tienen buen crecimiento, logran una lisis poniéndose en contacto con hifas del patógenos ó desarrollarse sobre él y segregan sustancias supresoras de crecimiento que hacen que el otro organismo detenga su crecimiento, como sucedió con las cepas C9, MT y SG que fueron seleccionadas para la elaboración del biocontrolador.

Cuadro 15. Regresión y correlación entre el tiempo de evaluación en días y el crecimiento radial en mm de *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora* dentro de cada cepa de *Trichoderma* spp, en la prueba de antagonismo de laboratorio.

PATOGENOS		
TRATAMIENTOS	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>
T1T2	Y= 6,80+ -0,83x	Y= 17,90+ -2,51x
	r = - 0,87**	r = - 0,84**
T3T4	Y=10,00+ -1,29x	Y= 18,60+ -2,60x
	r = -0,96**	r = -0,94**
T5T6	Y= 6,60+ -0,68x	Y= 16,10+ -2,24x
	r = -0,76**	r = -0,93**
T7T8	Y= 6,60 + -0,75 x	Y= 16,20+ -2,32x
	r = -0,80**	r = -0,91**
T9T10	Y= 7,50+ -1,02x	Y= 15,60+ -2,23x
	r = -0,92**	r = -0,88**
T11T12	Y= 9,60+ -1,25x	Y= 13,80+ -1,77x
	r = -0,89**	r = -0,84**
T13T14	Y= 11,20+ -1,49x	Y= 18,60+ -2,55x
	r = -0,93**	r = -0,92**
T15T16	Y= 8,00+ -0,89x	Y= 18,80+ -2,65x
	r = -0,98**	r = -0,94**
T17T18	Y= 8,40+ -0,86x	Y= 15,70+ -2,22x
	r = -0,70**	r = -0,93**
T19T20	Y= 9,80+ -1,09x	Y= 13,80+ -1,97x
	r = -0,56**	r = -0,91**
T21T22	Y= 8,00+ -0,99x	Y= 16,50+ -2,33x
	r = -0,94**	r = -0,93**
T23T24	Y= 7,30+ -0,75x	Y= 14,90+ -2,10x
	r = -0,73**	r = -0,94**
T25T26	Y= 6,60+ -0,78x	Y= 14,70+ -2,05x
	r = -0,81**	r = -0,85**
T27T28	Y= 11,50+ -1,62x	Y= 15,30+ -2,20x
	r = -0,91**	r = -0,90**
T29T30	Y= 10,60+ -1,47x	Y= 16,80+ -2,32x
	r = -0,94**	r = -0,93**
	Y= 7,00+ 0,52x	Y= 21,60+ 2,30x

Menores Incrementos
  Mayores Incrementos

Además se analizó el crecimiento de cada uno de los antagonistas a medida que incrementó los días de evaluación y se realizó la correlación y regresión lineal simple como se observa en el cuadro 16.

Cuadro 16. Regresión y correlación entre el tiempo de evaluación en días y el crecimiento radial en mm de cada cepa de *Trichoderma spp*, en la prueba de antagonismo de laboratorio en contra de *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora*.

	$r = -0,85^{**}$	$r = -0,86^{**}$
	$Y = 35,80 + -4,79x$	$Y = 32,10 + -4,14x$
<b>T3T4</b>	$r = -0,95^{**}$	$r = -0,90^{**}$
	$Y = 40,30 + 5,75x$	$Y = 44,00 + -6,03x$
<b>T5T6</b>	$r = -0,85^{**}$	$r = -0,87^{**}$
	$Y = 38,30 + -4,92x$	$Y = 38,60 + -4,84x$
<b>T7T8</b>	$r = -0,87^{**}$	$r = -0,95^{**}$
	$Y = 45,90 + -5,62x$	$Y = 44,90 + -6,15x$
<b>T9T10</b>	$r = -0,93^{**}$	$r = -0,87^{**}$
	$Y = 43,00 + -5,39x$	$Y = 47,60 + -6,94x$
<b>T11T12</b>	$r = -0,87^{**}$	$r = -0,85^{**}$
	$Y = 36,80 + -4,65x$	$Y = 32,60 + -3,82x$
<b>T13T14</b>	$r = -0,91^{**}$	$r = -0,86^{**}$
	$Y = 29,20 + -3,83x$	$Y = 27,20 + -3,58x$
<b>T15T16</b>	$r = -0,91^{**}$	$r = -0,93^{**}$
	$Y = 30,20 + -3,39x$	$Y = 32,90 + -4,52x$
<b>T17T18</b>	$r = -0,80^{**}$	$r = -0,90^{**}$
	$Y = 23,60 + -2,60x$	$Y = 23,80 + -3,07x$
<b>T19T20</b>	$r = -0,96^{**}$	$r = -0,95^{**}$
	$Y = 38,60 + -5,10x$	$Y = 32,20 + -4,26x$
<b>T21T22</b>	$r = -0,94^{**}$	$r = -0,90^{**}$
	$Y = 35,20 + -4,80x$	$Y = 40,30 + -5,66x$
<b>T23T24</b>	$r = -0,94^{**}$	$r = -0,89^{**}$
	$Y = 39,20 + -5,28x$	$Y = 41,00 + -5,46x$
<b>T25T26</b>	$r = -0,80^{**}$	$r = -0,88^{**}$
	$Y = 35,30 + -4,34x$	$Y = 33,60 + -4,41x$
<b>T27T28</b>	$r = -0,92^{**}$	$r = -0,89^{**}$
	$Y = 24,30 + -2,71x$	$Y = 25,90 + -3,12x$
<b>T29T30</b>	$r = -0,82^{**}$	$r = -0,86^{**}$

Menores Incrementos
  Mayores Incrementos

Este análisis indica que la cepa de *Trichoderma* sp. del crecimiento dentro de *Fusarium moniliforme* y el tratamiento 12 dentro de *Phytophthora palmivora*. Es decir; que el crecimiento de los patógenos *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora*, causantes de la enfermedad pudrición de flecha se ve afectado por la actividad antagonista de las cepas de *Trichoderma* en estudio.

### 4.3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* PARA APLICACIÓN EN CAMPO

La selección de cepas nativas de *Trichoderma* para las pruebas de campo se basó en el análisis estadístico, tipo de crecimiento y actividad antagonista que presentaron las diferentes cepas en estudio.

Debido al excelente grupo de cepas nativas de *Trichoderma* que se logró aislar se seleccionó tres cepas, dos específicas para *Fusarium* y una para *Phytophthora*.

#### 4.3.1. Descripción de las Cepas Seleccionadas

Las tres cepas tienen crecimiento esporulativo, productoras de enzimas ya que el medio de cultivo PDA se torna de color amarillento, esta característica les permite consumir hongos patógenos en un proceso llamado micoparasitismo. Según Harman (2000), el micoparásito crece sobre el contenido de las hifas del patógeno produciendo enzimas que causan exólisis que es la disolución de la pared y membrana celular provocando la muerte del patógeno.

#### 4.3.1.1. Para *Fusarium moniliforme*

**Tratamiento (1)**, cepa nueve (IASA II), se caracteriza por tener un crecimiento de tipo micelial y esporulativo lo que permite que su crecimiento sea agresivo, además posee una actividad antagonista enzimática que hace que el medio de cultivo en el cual se desarrolla se torne amarillento, debido a la producción de metabolitos.

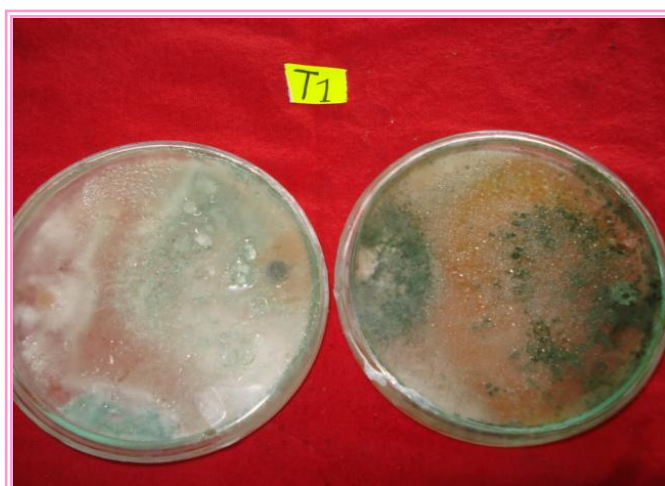


Figura 15. Cepa C9 en ensayo de determinación del antagonismo en contra de *F. moniliforme* (izq.) y *P. palmivora* (der.).

En la Figura 16 se puede observar la regresión lineal negativa, que ejerce la cepa nueve de *Trichoderma* en contra de *Fusarium*, esto indica que a medida que pasan los días de evaluación, el crecimiento de *Fusarium* se ve disminuido por el efecto del antagonista *Trichoderma*.

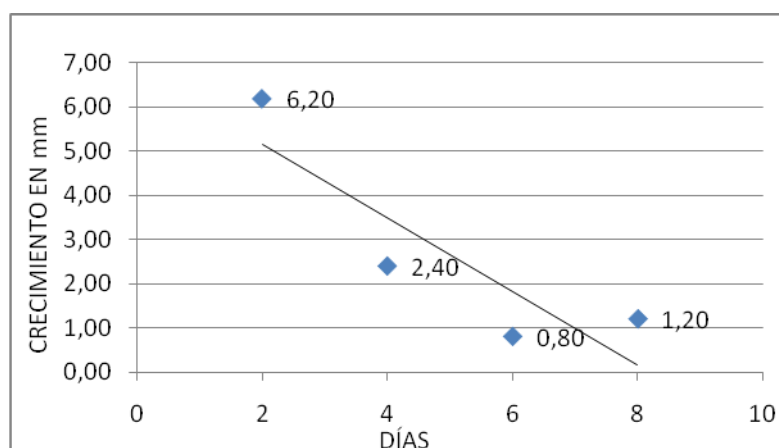


Figura 16. Regresión lineal simple entre el período de evaluación y el crecimiento en mm de *Fusarium moniliforme*.

**Tratamiento (25), cepa SG San Gabriel** (Figura 17), se caracteriza por tener un crecimiento micelial escaso pero profusamente esporulativo, el crecimiento del borde de la colonia indefinido, además posee actividad antagonista enzimática.

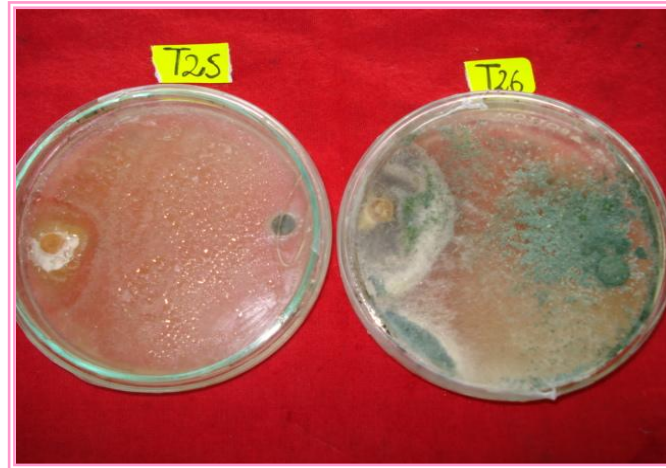


Figura 17. ensayo de del

en contra de *F. moniliforme* (izq.) y *P. palmivora* (der.).

Cepa SG en determinación antagonismo

La figura 18 indica una regresión lineal negativa, esto quiere decir a medida que pasan los días el crecimiento de *Fusarium* se ve disminuido por el efecto del antagonista *Trichoderma*.

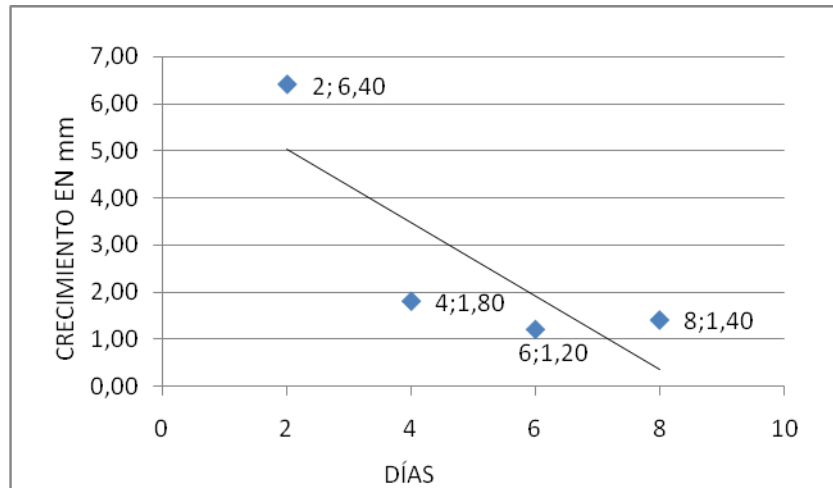


Figura 18. Regresión lineal simple días y crecimiento en mm de *Fusarium moniliforme* dentro de la cepa SG.

#### 4.3.1.2. Para *Phytophthora palmivora*

**Tratamiento (28), cepa MT Mulaute** (Figura 19), se caracteriza por tener un crecimiento esporulativo abundante, el crecimiento del borde de la colonia es definido, además posee actividad antagonista enzimática.



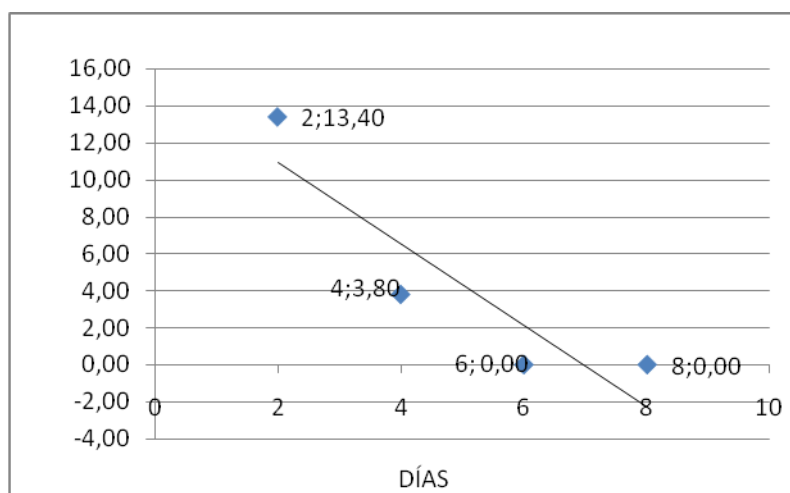
Figura 19.  
ensayo de  
determinación  
antagonismo  
*F. moniliforme*  
*palmivora*



Cepa MT en  
del  
en contra de  
(izq.) y *P.*  
(der.).

En la Figura 20 se observa una regresión lineal negativa, esto quiere decir a medida que pasan los días el crecimiento de *Phytophthora* se ve disminuido por el efecto del antagonista *Trichoderma*.

Figura 20.  
Regresión  
simple días  
crecimiento  
de



lineal  
y  
en mm

*Phytophthora palmivora* dentro de la cepa MT.

#### 4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* SELECCIONADAS

En el cuadro 17 se presentan los resultados obtenidos de la comparación entre el código genético de especies de *Trichoderma* almacenados en el BLAST y el código genético de las cepas nativas de *Trichoderma*.

Cuadro 17. Resultados de la comparación de cepas nativas de *Trichoderma* con especies de *Trichoderma* almacenadas en el BLAST.

Cepa Nativa	Especie	Máximo Puntaje	Máxima identidad %
C9ITS1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1090	100
C9ITS4	<i>Trichoderma</i> sp.	1075	99
MT ITS1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1079	99
MT ITS4	<i>Trichoderma</i> sp.	1079	99
SG ITS1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1079	99
SG ITS4	<i>Trichoderma</i> sp.	1079	99

En el cuadro se observa las tres cepas nativas seleccionadas en fase de laboratorio de la investigación corresponden al género *Trichoderma*. En ITS1 las tres cepas corresponden a *T. longibrachiatum* y en ITS4 corresponden a *Trichoderma* sp.

Una de las razones por la cual existe diferencia de porcentajes entre las regiones ITS1 e ITS4 es que se utilizaron primers universales y probablemente este primer se identificó más con la región ITS1 (cuadro 17) ya que tienen un mayor porcentaje de similitud.

Con la finalidad de observar las diferencias existentes entre las cepas nativas de *Trichoderma* y las especies de *Trichoderma* almacenadas en el banco de genes del BLAST, se procedió a realizar la alineación de las secuencias utilizando el programa bioinformático CLUSTAL-W.

La alineación entre la secuencia de ADN de la cepa C9 en ITS1 y la secuencia genética de *T. longibrachiatum* es la siguiente:

Secuencia A	Nombre	# Bases	Secuencia B	Nombre	# Bases	Puntaje
1	C91-ITS1	929	2	C9ITS1	639	92
C91-ITS1	-----AATAGTCG--CTGGCCGCGGTACAACCCCAATGTGAAC	36	C9ITS1	CCCGATTGGGGACGCGGATGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCAATGTGAAC	60	
				** * * * *	*****	
C91-ITS1	GTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGCGCGTCGAGCCCCGGATC	96	C9ITS1	GTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGCGCGTCGAGCCCCGGATC	120	
				*****		
C91-ITS1	CCATGGCGCCCGCCGGAAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCCT	156	C9ITS1	CCATGGCGCCCGCCGGAAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCCT	180	
				*****		
C91-ITS1	CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAA	216	C9ITS1	CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAA	240	
				*****		
C91-ITS1	AATGAATCAAAACTTTCACCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	276	C9ITS1	AATGAATCAAAACTTTCACCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG	300	
				*****		



```

*****
MT1-ITS1 CCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGT 155
MT1ITS1 CCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGT 180
*****

MT1-ITS1 CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAA 215
MT1ITS1 CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAA 240
*****

MT1-ITS1 AATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG 275
MT1ITS1 AATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG 300
*****

MT1-ITS1 AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA 335
MT1ITS1 AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA 360
*****

MT1-ITS1 TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACC 395
MT1ITS1 TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACC 420
*****

MT1-ITS1 CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCCGAAATACAGTGG 455
MT1ITS1 CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCCGAAATACAGTGG 480
*****

MT1-ITS1 CGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCACCGGAGCGCGGCGC 515
MT1ITS1 CGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACACTCGCACCGGAGCGCGGCGC 540
*****

MT1-ITS1 GGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA 575
MT1ITS1 GGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA 600
*****

MT1-ITS1 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGGCGGAGGAA---- 610
MT1ITS1 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATAA 639

```

La alineación entre las secuencias de ADN de la cepa SG y *T. longibrachiatum* tiene 639 pares de bases. La diferencia entre las secuencias es en los pares de bases: 1, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 24 y 25. En los pares de bases 26 al 639 son idénticas. En este caso el puntaje obtenido en esta alineación es de 96 %.

La alineación entre la secuencia de ADN de la cepa SG en ITS1 y la secuencia genética de *T. longibrachiatum* es:

Secuencia A	Nombre	# Bases	Secuencia B	Nombre	# Bases	Puntaje
1	SG1-ITS1	617	2	SGITS1	639	95
SG1-ITS1	-----NTAATCGGATAAGGTAGATCAA---CCCAATGTGAAC	34	SG1ITS1	CCCGATTGGGGACGCGGATGGACATTACCGAGTTTCAACTCCCAACCCCAATGTGAAC	60	
				* * * * *	* * *	*****
SG1-ITS1	GTTACCAATCTGTTGCCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGCGCGTCGACGCCCGGATC	120	SG1ITS1	GTTACCAATCTGTTGCCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGCGCGTCGACGCCCGGATC	120	
				*****		
SG1-ITS1	CCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGT	154	SG1ITS1	CCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTGCGGGCTCCCGT	180	
				*****		
SG1-ITS1	CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAA	214	SG1ITS1	CGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAA	240	
				*****		

```

SG1-ITS1 AATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG 274
SG1ITS1 AATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG 300
*****

SG1-ITS1 AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA 334
SG1ITS1 AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA 360
*****

SG1-ITS1 TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACC 394
SG1ITS1 TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACC 420
*****

SG1-ITS1 CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGG 454
SG1ITS1 CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGG 480
*****

SG1-ITS1 CGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGC 514
SG1ITS1 CGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGC 540
*****

SG1-ITS1 GGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA 574
SG1ITS1 GGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA 600
*****

SG1-ITS1 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAANNNNNNN 617
SG1ITS1 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATAA---- 639

```

Esta alineación \*\*\*\*\* *achiatum* tiene 639 pares de

bases. La diferencia entre las secuencias se puede observar en los pares de bases: 1, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 23, 24, y 25, el resto de bases son idénticas, para esta alineación el puntaje obtenido es de 95 %.

Es por estas diferencias en pares de bases específicos que no se logra el 100 % de similitud con la especie *longibrachiatum*, ya que en la alineación se pudo observar que existen diferencias en los pares de bases.

El análisis de secuenciación de la cadena de ADN de los tres agentes de control biológico confirmó el género de los microorganismos ubicándolos en el orden Hyphales, género *Trichoderma* con un porcentaje de similitud del 99 % con la especie *longibrachiatum*. Las especies de *Trichoderma* spp. más conocidas y por lo tanto más estudiadas son: *T. harzianum* y *T. viridae*, no obstante *T. longibrachiatum* deja de tener importancia. Stefanova *et al.* (1999), que la especie *longibrachiatum* produce metabolitos no volátiles con actividad antifúngica que reducen el crecimiento de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani*.

#### 4.5. INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD EN PLANTAS DE LA PRIMERA GENERACIÓN

Durante la fase de campo se registró nueve evaluaciones del porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación, realizadas cada

quinze días después de cada programa de control. Los datos obtenidos (Anexo 7) Cuadro 18. Promedio del porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación durante nueve evaluaciones cada quince días después de cada programa de aplicación.

DIAGNOSTICO INICIAL	6,67	2,22	4,44	4,44	4,44	11,11	6,67	0,00	11,11	6,67	8,89
2da. Evaluación	15,56	6,67	8,89	11,11	6,67	11,11	6,67	11,11	11,11	6,67	13,33
3ra. Evaluación	15,56	6,67	8,89	11,11	6,67	11,11	8,89	11,11	11,11	6,67	13,33
4ta. Evaluación	4,44	0,00	0,00	4,44	0,00	0,00	2,22	0,00	2,22	4,44	17,78
5ta. Evaluación	11,11	2,22	0,00	4,44	0,00	0,00	2,22	0,00	2,22	4,44	17,78
6ta. Evaluación	11,11	2,22	4,44	4,44	0,00	2,22	4,44	4,44	2,22	4,44	22,22
7ma. Evaluación	11,11	2,22	4,44	4,44	0,00	4,44	4,44	4,44	2,22	4,44	24,44
8va. Evaluación	11,11	2,22	4,44	6,67	0,00	4,44	4,44	4,44	2,22	4,44	24,44
9na. Evaluación	11,11	2,22	4,44	6,67	0,00	4,44	4,44	4,44	2,22	6,67	24,44

Finalizada la tercera evaluación, antes de iniciar el segundo programa de control se eliminó las plantas muertas a causa de la enfermedad, con la finalidad de reducir fuentes de inoculo. En la figura 21 se observa el comportamiento de la enfermedad en cada uno de los tratamientos durante las tres primeras evaluaciones.

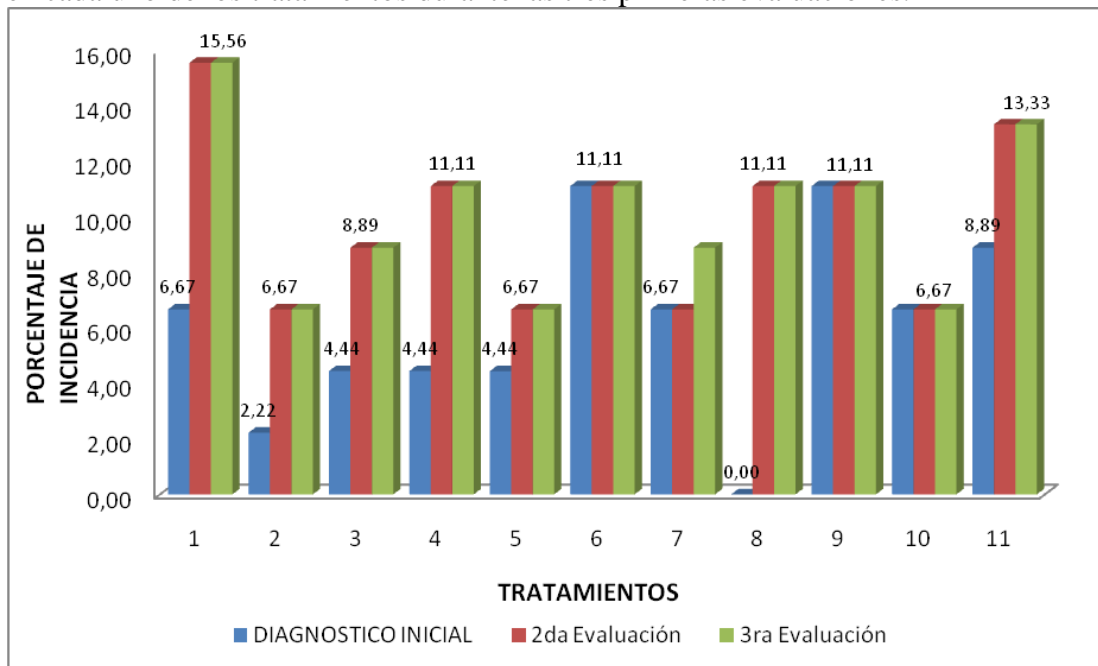


Figura 21. Promedio de la incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación durante las tres primeras evaluaciones en cada uno de los tratamientos. En la figura 22 se observa el comportamiento de la enfermedad desde la cuarta evaluación hasta la novena evaluación.

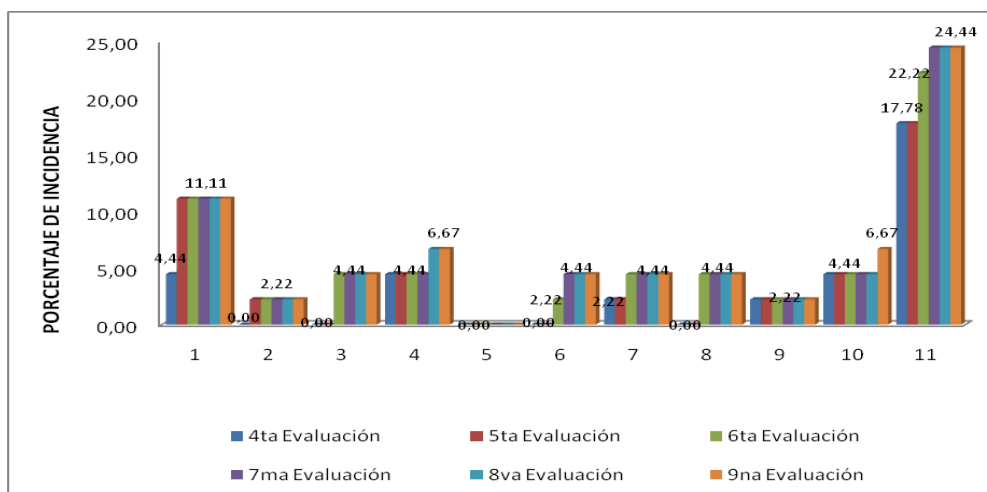


Figura 22. Promedio de la incidencia de la enfermedad en plantas de la primera generación desde la cuarta hasta la novena evaluación en cada tratamiento.

Para realizar el análisis estadístico de esta variable el promedio por repetición de porcentaje de incidencia en plantas de la primera generación se transformó mediante  $\sqrt{x+1}$ . El ADEVA para esta variable se muestra en el cuadro 19.

Cuadro 19. Análisis de la Varianza para la variable porcentaje de incidencia en plantas de la primera generación en nueve evaluaciones, realizadas cada quince días después de cada programa de control.

	17,15	10	1,72	2,02	0,0251
Error	10,03	20	0,50		
Total	25,07	32			

CV: 27,47 %

El ADEVA indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos. El coeficiente de variación para esta variable es de 27,47%. Las diferencias entre tratamientos se debe a que los controladores utilizados en la fase de campo son diferentes tanto en ingrediente activo como modo de acción, tal es el caso de Hymexazol fungida para el suelo específico para *Fusarium*, Sulfato de Cobre pentahidratado fungicida-bactericida sistémico de aplicación foliar específico para *Fusarium* y *Erwinia*, Fosetil-Al fungicida sistémico de aplicación foliar específico para *Phytophthora*, dentro del grupo de los biológicos Biocontrolador *Trichoderma* y Trichoeb, antagonistas de hongos fitopatógenos. Por lo tanto el efecto y acción de cada uno de los controladores es diferente.

En el cuadro 20 al realizar la prueba de Tukey al 5 % con datos transformados al final de la investigación, se detectaron tres rangos de significancia. En el primer

rango se muestra los tratamientos 5 (Bicontrolador *Trichoderma*) y 2 (Sulfato de cobre pentahidratado) con 1,85 % y 1,97 % respectivamente, el rango B corresponde al tratamiento 11 (Testigo) con 4,32 %.

Cuadro 20. Prueba de Tukey al 5 %  
para la variable porcentaje de incidencia  
en plantas de la primera generación.

T	1,85	3	A	B
3	2,28	3	A	B
8	2,32	3	A	B
7	2,34	3	A	B
9	2,37	3	A	B
6	2,49	3	A	B
10	2,51	3	A	B
4	2,62	3	A	B
1	3,29	3	A	B
11	4,32	3		B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

El tratamiento 5 y 2 comparten el rango A, siendo estadísticamente iguales, sin embargo se deben tomar en cuenta que el tratamiento 5 corresponde al bicontrolador a base de cepas nativas de *Trichoderma* y el tratamiento 2 es el controlador químico sulfato de cobre pentahidratado. Esto coincide con trabajos realizados por Backman (1975) que utilizó *Trichoderma* granulado y el control químico estándar (Terraclor) en el control de *S. rolfsii*, obtuvo diferencias no significativas entre el control químico y biológico al contrarrestar el patógeno y disminuir la enfermedad, indica que hace falta evaluar las ventajas que conlleva el uso del control biológico sobre el control químico.

La principal ventaja del control biológico sobre el control químico está en la ausencia de residuos químicos sobre las partes comestibles de los cultivos, así mismo disminuye el daño al medio ambiente. De acuerdo con Falconí (1997), el biocontrol de agentes causales de enfermedades en plantas posee algunas ventajas, en relación con los controladores químicos que se utilizan frecuentemente en la agricultura. Los agentes de control biológico tienen la propiedad de autoreplicarse, establecerse en determinados sustratos y ecosistemas, de colonizar semillas, etc. En cambio la mayoría de los pesticidas agrícolas convencionales, tienen un efecto temporal y usualmente necesitan ser aplicados repetidamente para asegurar su efectividad. Otra de las ventajas, es que los métodos de biocontrol son altamente compatibles con las prácticas agrícolas comunes, necesarias, como fundamento de conservación de fuentes naturales bióticas y abióticas (Falconí 1997).

Lo antes mencionado se comprueba con el tratamiento 5 que en el diagnóstico inicial de la investigación tuvo 4,44 % de incidencia, aumentando a 6,67 % en la segunda y tercera evaluación, esto posiblemente a la aplicación de controlador biológico que



causó alteraciones en el medio hasta lograr su establecimiento. Antes de iniciar el segundo programa se eliminó las plantas con incidencia y a partir de la cuarta evaluación hasta la novena evaluación este tratamiento no presentó más rebrotes, ejerciendo un control del 100 % sobre la enfermedad.

El tratamiento 2 inició con 2,22 % de incidencia, en la segunda y tercera evaluación aumentó a 6,67 % debido a que es un controlador químico que actúa de manera inmediata causando alteraciones en los agentes patógenos que luchan por sobrevivir e infectan otras plantas. Como en todos los tratamientos antes del segundo programa de control se eliminó las plantas muertas, durante la cuarta evaluación ejerció un control del 100 % pero en la quinta evaluación hubo rebrotes de la enfermedad presentado el 2,22 % de incidencia hasta la novena evaluación, ejerciendo un control de la enfermedad del 97,78 %.

Las comparaciones ortogonales en el cuadro 21, muestra que existen diferencias altamente significativas entre el tratamiento 11 que corresponde al testigo versus el resto de tratamientos. Con este análisis se comprueba que al no realizar control de la enfermedad se tiene como resultado altos porcentajes de incidencia, en este caso 4,32 % (cuadro 20), por lo tanto realizar control de la enfermedad pudrición de flecha ya sea con productos químicos o biológicos contribuye a mantener bajos porcentajes de incidencia.

Cuadro 21. Comparaciones Ortogonales entre el tratamiento testigo y el resto de tratamientos.

<b>TRAT</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
Testigo vs resto	12,67	1	12,67	25,27	0,0001**
Total	12,67	1	12,67	25,27	0,0001

#### **4.6. PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LA SEGUNDA GENERACIÓN**

Se realizó nueve evaluaciones cada 15 días después de la aplicación de los controladores, se midió el porcentaje de incidencia de la enfermedad en la segunda generación dentro de cada tratamiento, los datos obtenidos (Anexo 8), fueron tabulados y promediados (cuadro 22).

Cuadro 22. Promedio del porcentaje de incidencia en la segunda generación en nueve evaluaciones cada 15 días después de cada programa de controladores.

DIAGNÓSTICO INICIAL	8,72	11,99	18,98	23,81	18,66	19,30	12,11	7,94	26,07	14,48	8,17
2da Evaluación	2,03	1,92	2,31	3,19	0,63	4,18	3,76	2,00	8,75	5,59	1,43
3ra Evaluación	0,00	0,95	0,81	7,09	5,24	0,00	0,61	0,00	0,61	3,20	3,10
4ta Evaluación	3,72	1,96	0,62	2,71	0,00	1,39	3,27	1,19	1,08	4,02	9,42
5ta Evaluación	2,12	3,44	0,57	2,38	1,19	2,43	3,80	2,57	2,77	4,97	7,19
6ta Evaluación	8,56	2,15	2,60	13,36	5,94	4,81	6,11	4,43	2,24	4,40	9,33
7ma Evaluación	13,00	5,28	6,80	20,60	7,20	5,96	10,05	5,47	1,99	4,27	19,36
8va Evaluación	10,97	4,68	6,63	10,30	10,16	7,54	10,47	5,14	2,32	5,13	18,24
9na Evaluación	11,45	6,59	6,59	16,25	5,36	7,45	10,14	5,45	3,43	5,08	18,08

En la figura 23 se observa el comportamiento de la enfermedad durante a nivel de hijuelos en nueve evaluaciones realizadas cada quince días bajo la influencia de cada uno de los tratamientos.

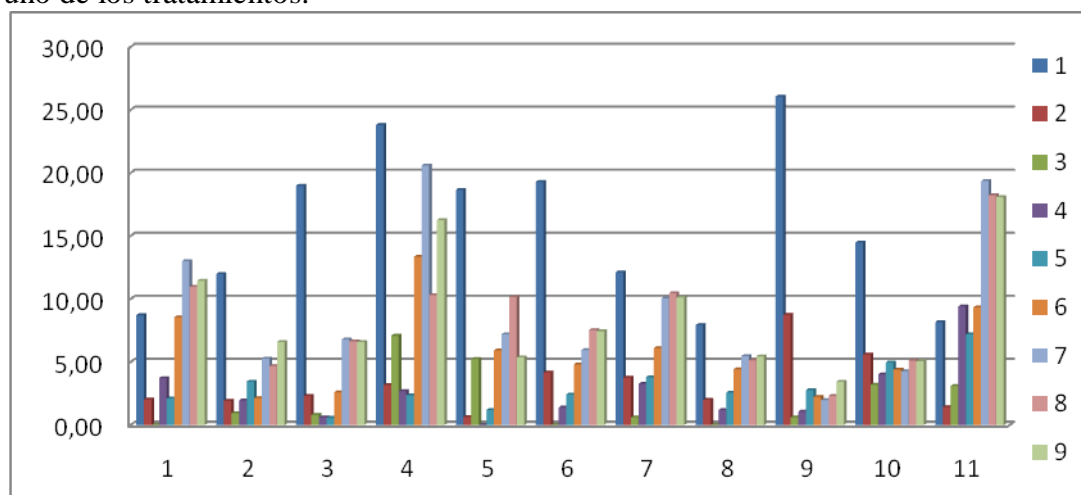


Figura 23. Promedio de la incidencia de la enfermedad en la segunda generación durante nueve evaluaciones en cada uno de los tratamientos.

Para realizar el análisis estadístico de esta variable el promedio por repetición de porcentaje de incidencia en plantas de la primera generación se transformó mediante  $\sqrt{x+1}$ . El ADEVA para esta variable se muestra en el cuadro 23.

Cuadro 23. Análisis de la Varianza para la variable porcentaje de incidencia de la segunda generación en nueve evaluaciones.

TRAT	5,04	10	0,50	1,57	0,1877ns
REP	0,17	2	0,08	0,26	0,7758
Error	6,43	20	0,32		
Total	11,64	32			

**CV: 21,24 %**

En esta variable no existen diferencias significativas, pero si existen diferencias matemáticas que permiten identificar los mejores tratamientos. El coeficiente de variación es de 21,24 %.

Al no existir diferencias significativas en el ADEVA, se puede realizar la prueba de significación de DUNCAN, ya que para aplicar esta prueba no se requiere que el valor de F sea significativo. De acuerdo con González (1976), la ventaja de la prueba de Duncan consiste en el hecho de que no se necesita que el valor de F sea significativo para poder usarla, permite comparar todas las medias entre sí sin restricciones.

Cuadro 24. Prueba de DUNCAN al 5 % para la variable porcentaje de incidencia de la segunda generación.

T	Media	n	Rango
2	2,29	3	A B
3	2,44	3	A B C
9	2,52	3	A B C
10	2,56	3	A B C
6	2,57	3	A B C
5	2,61	3	A B C
7	2,68	3	A B C
1	2,76	3	A B C
11	3,37	3	B C
4	3,46	3	C

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )*

Al realizar la prueba de DUNCAN al 5 % se observan tres rangos de significancia. El tratamiento 8 ocupa el rango A con un promedio de 2,11 %, el tratamiento 4 ocupa el rango C con un promedio de 3,46 %. El rango AB es compartido por los tratamientos 2, 3, 9, 10, 6, 7, 1 y 11.

De las observaciones realizadas en el campo se puede establecer que el control de la enfermedad en la segunda generación es más complejo que en plantas de la primera generación, debido a que los hijuelos (segunda generación) están formados por tejido joven y turgente que hace que sean más débiles y susceptibles en relación con la planta adulta aunque no por ello esta última esta libre de ser afectada. Además al realizar las labores de campo los hijuelos están más expuestos a ser dañados, sobre

todo en el control de malezas especialmente cuando se trabaja con hilos, las heridas ocasionadas constituyen un entrada para los patógenos.

Otro aspecto importante es la aplicación de los controladores, el producto no llega a cubrir todos los hijuelos de las cepas, el hecho de que los productos utilizados sean sistémicos no asegura que todos los hijuelos estén protegidos, ya que muchos de ellos no nacen directamente de la cepa si no que son hijos de plantas que ya fueron cosechadas.

Realizando las comparaciones ortogonales entre el tratamiento 11 (testigo) vs. el resto de tratamientos, se observa que existen diferencias significativas, es decir; es necesario realizar control de la enfermedad a nivel de hijuelos ya que la aplicación de los controladores químicos y biológicos ejercen control sobre la enfermedad en mayor o menor grado, esto debido a que la composición, modo de acción y aplicación de los productos es diferente en cada uno de los tratamientos.

Cuadro 25. Comparaciones ortogonales entre el tratamiento testigo y el resto de tratamientos.

TRAT.	SC	gl	CM	F	Valor p
Testigo vs resto	1,61	1	1,61	4,99	0,0370*
Total	1,61	1	1,61	4,99	0,0370

## 4.7. FACTORES PREDISPONENTES A LA ENFERMEDAD

### 4.7.1. Análisis de Suelo

El análisis físico-químico del suelo se realizó al inicio de la fase de campo y al final de la misma (Anexo 17-18).

En el cuadro 26 se muestra la comparación de características óptimas para el cultivo del palmito con respecto a los análisis de suelo realizados, donde se refleja que algunos parámetros no están acordes a los contenidos óptimos, producto de esto existe un desbalance de los nutrientes en el suelo, lo que significa que el manejo de la fertilización se optimizó.

Cuadro 26. Comparación de características óptimas de suelo para palmito con los resultados del análisis de suelo en la zona de estudio al inicio (1) y al final (2).

Nitrógeno		49,00	35,00
pH (H <sub>2</sub> O)	5,5-6,0	5,9-6,0	5,60
Materia Orgánica (%)	> 3	4,30	6,30
Fósforo ppm	> 10	40,00	45,00
Calcio meq/100g	> 4,0	9,70	8,90
Magnesio meq/100g	> 1,0	1,30	1,90
Potasio meq/100g	> 0,3	0,83	0,49
Azufre ppm	> 10	4,40	-----
Hierro ppm	de 10 - 50	242	150
Manganeso ppm	de 5 - 50	3,40	2,80
Cobre ppm	de 1 - 10	7,60	6,10
Zinc ppm	de 3 - 15	5,10	5,70
Boro ppm	de 0,5 - 2	0,67	-----

Los resultados del análisis de suelo al inicio de la investigación muestra que el suelo de plantación con respecto al pH presenta un valor de 5,9-6,0, ligeramente ácido lo que provoca una asimilación adecuada por parte de la planta de los iones que están presentes en el suelo.

El contenido de Nitrógeno en forma amoniacal es de 49,00 ppm, considerado alto (A). El fósforo 40 ppm., considerado alto (A) en presencia de contenidos altos de NH<sub>4</sub>, parte del fertilizante fosfórico puede volverse inaprovechable, esta acumulación de fósforo en el suelo crea condiciones propicias para el desarrollo de microorganismos patógenos. De acuerdo a lo que menciona AGRIOS (1998), los suelos donde predomina altos niveles de P se encuentra en grandes cantidades la presencia de *Fusarium spp.*

El contenido de materia orgánica es alto (4,30 %), y por consiguiente la cantidad de N y P se ve reflejado en sus altos niveles, ante esta situación Agrios (1998) menciona que el uso de materiales como fuente de abono orgánico en estado inmaduro, a más de alterar las condiciones del suelo, como por ejemplo; elevar la temperatura, permite la incubación de microorganismos patógenos, quienes aprovechan del medio favorable para su desarrollo, y se mantienen como fuente de inóculo para el cultivo.

Dentro de los micro nutrientes los resultados demuestran que el Cu esta en 7,6 ppm considerado alto (A), el Mn 3,4 ppm considerado bajo (B), Zn que es el elemento que ayuda a la absorción adecuada del agua esta en 5,1 ppm nivel medio (M), el Fe tiene contenido alto (A) y el Boro considerado alto (A) con relación al nivel óptimo del cultivo, sin embargo Padilla (2004) manifiesta que un boro bajo en el suelo, da como resultado un contenido deficiente de boro a nivel foliar, causando un debilitamiento de los tejidos con el consecuente rompimiento de ramas y de hojas, lo que puede ocasionar la presencia de patógenos vasculares como *Fusarium*.

Los resultados del segundo análisis demuestran que el contenido de Nitrógeno fue de 35 ppm, considerado medio (M). El fósforo 45 ppm., considerado alto (A), valores altos de fósforo en el suelo garantiza una buena asimilación por parte de la planta.

El contenido de potasio que es el elemento que proporciona resistencia a enfermedades 0,49 meq/100g, considerado alto (A), la acumulación de potasio en el suelo, causa una falta de asimilación de magnesio, es por ello que se encuentra altos niveles de Mg en el suelo (1,90 meq/100g).

De manera general se puede decir que el contenido de elementos mayores no varió durante el período de evaluación a pesar de la fertilización que el productor realizó, que básicamente es 50 gr de Mezclafix por planta.

#### 4.7.2. Análisis Foliar

En lo que respecta a análisis foliares (Anexo 19-20) tanto para el muestreo inicial como para el final, los resultados se indican en el cuadro 27.

Cuadro 27. Comparación de características óptimas foliares para palmito con los resultados del análisis de suelo en la zona de estudio

Elemento	Nivel Adecuado (%)	del Análisis			
		1er Análisis	2do. Análisis		
Nitrógeno	2,50-3,50	3,27	SUFICIENTE	3,50	SUFICIENTE
Fósforo	0,12-0,25	0,22	SUFICIENTE	0,28	ALTO
Potasio	1,30-2,50	0,84	BAJO	1,49	SUFICIENTE
Calcio	1,00-2,00	0,70	BAJO	0,56	BAJO
Magnesio	0,23-0,30	0,20	BAJO	0,21	BAJO
Azufre	0,21-0,40	0,20	BAJO	0,20	BAJO
Boro	19,0-30,0	7,74	BAJO	18,60	BAJO
Cinc	20,0-200,0	33,10	SUFICIENTE	34,10	SUFICIENTE
Cobre	6,0-10,0	10,00	SUFICIENTE	11,30	ALTO
Hierro	100,0-300,0	168,10	SUFICIENTE	230,40	SUFICIENTE
Manganeso	60,0-150,0	55,30	BAJO	50,00	BAJO

El contenido de nitrógeno en la planta se encuentra en niveles suficientes tanto en el primer análisis como el segundo con 3,27 % y 3,50 % respectivamente, el contenido de fosforo es 0,22 % en el primer análisis, considerado suficiente y 0,28 % en el segundo análisis, considerado alto, el alto contenido se debe a que en el suelo también existe niveles altos de este elemento lo que garantiza su asimilación. El contenido de K en el suelo (0,49 meq/100 ml) considerado alto, ocasionó falta de asimilación del Mg ya que en los reportes de análisis foliar se observa bajo contenido de este elemento (0,21 %), esto se debe a que entre ellos existe antagonismos y sinergismos. Por otro lado los niveles de Ca en el suelo también fueron altos (8,90 meq/100 ml), lo que redujo la asimilación del K cuyo contenido fue de 1,49 % en el análisis foliar. Padilla (2004), indica que al hacer referencia al calcio, es también conocido que concentraciones altas de este elemento, reduce la asimilación de potasio y amonio causando una reducción en calidad y producción.

El contenido de potasio en la planta es bajo, el promedio de los análisis realizados es de 1,16 %, esta es una de las posibles causas de la susceptibilidad de las plantas a la enfermedad pudrición de flecha del palmito. De acuerdo con Padilla (2004), el potasio está directamente asociado con el fortalecimiento de tejidos y su resistencia al enfermedades, ya que está involucrado en mantener la integridad estructural de los componentes de la célula y posiblemente aún en la membrana celular, además incentiva el desarrollo del sistema radicular, lo cual da como resultado una mejor exploración de nutrientes y de agua en el suelo.

#### **4.7.3. Análisis Microbiológico del Suelo**

El análisis microbiológico del suelo realizado al final de la investigación muestra la existencia de microorganismos benéficos como el hongo antagonista *Trichoderma* en una concentración de  $19 \times 10^3$  esporas/gramo, además el análisis reporta ausencia de *Fusarium* y *Phytophthora*, sin embargo, hay presencia de la bacteria *Erwinia spp.* en una concentración de  $15 \times 10^2$  UFC/gramo (Anexo 21).

Los resultados muestran en efecto de los controladores en contra de la enfermedad Pudrición de flecha del palmito. La aplicación del bicontrolador se ve reflejada en el contenido de *Trichoderma* en el suelo, la ausencia de los patógenos en el suelo es producto de la aplicación de los controladores químicos y biológicos, sin embargo, no se puede asumir que los agentes causales de la enfermedad fueron eliminados, esto debido a que existen fuentes de inóculo como plantas enfermas y muertas que hospedan a los patógenos. De acuerdo con Quezada (2007) que realizó análisis microbiológico del suelo en el cultivo de palmito con síntomas de la enfermedad Pudrición de flecha en cinco zonas aledañas a Santo Domingo, encontró la presencia de *Fusarium*, *Phytophthora* y *Erwinia*, en ninguna de las zonas se había realizado control de la enfermedad, por ello la presencia de los agentes causales.

#### **4.7.4. Cateo de Raíces**

El cateo de raíces muestra que la zona en estudio presenta un sistema radicular variable. Existen diferencias estadísticas significativas entre el número de raíces funcionales en plantas sanas y enfermas, siendo mayor el número en plantas sanas (cuadro 28).

Las diferencias se debe a que el número de raíces necrosadas o secas es mayor en plantas enfermas y menor en plantas sanas, debido a que en este cateo de raíces se consideró plantas con estado avanzado de la enfermedad y por lo tanto el sistema radicular empieza a descomponerse, ya que el daño que causa la enfermedad en la planta es pudrición acuosa.

Cuadro 28. Cateo de raíces realizado en plantas sanas y enfermas al inicio de la fase de campo.

**DATOS OBTENIDOS DEL CATEO DE RAICES A 20 cm DE PROFUNDIDAD**

Nº DE EVALUACIÓN:		1	FECHA:	19/02/2008		
Tratamiento	Nº muestra	Estado de la planta	Nº raíces			Peso de raíces (gr)
			Funcionales	Necrosadas o secas	Total	
1	3	sana	33	0	33	120,06
	3	enferma	15	10	25	106,68
2	3	sana	33	3	36	143,09
	3	enferma	23	6	29	100,47
3	3	sana	31	0	31	111,94
	3	enferma	21	9	30	118,12
4	3	sana	32	2	34	127,91
	3	enferma	21	10	31	99,42
5	3	sana	34	1	36	107,00
	3	enferma	19	3	22	67,97
6	3	sana	36	3	38	183,11
	3	enferma	24	5	29	126,65
7	3	sana	35	1	36	138,94
	3	enferma	24	8	32	110,67
8	3	sana	33	2	34	143,11
	3	enferma	21	5	26	99,20
9	3	sana	29	1	30	112,50
	3	enferma	17	10	27	87,42
10	3	sana	30	1	31	133,97
	3	enferma	25	6	31	85,91
11	3	sana	26	2	28	141,24
	3	enferma	25	10	35	100,23

Los resultados indican que el daño en las raíces no está relacionado directamente con la enfermedad. Esto coincide con Quezada (2007), quien manifiesta que el problema de raíces no influye en la enfermedad pudrición de flecha del palmito, ya que existe daño de raíces en plantas sanas en donde no existe la presencia de la misma, sin embargo

El cateo de raíces realizado al finalizar la fase de campo indica un sistema radicular, variable (Cuadro 29). En este muestreo se considero plantas con síntomas iniciales, permitiendo descartar alguna relación con la enfermedad.

Cuadro 29. Cateo de raíces realizado en plantas sanas y enfermas al final de la fase de campo

DATOS OBTENIDOS DEL CATEO DE RAICES A 20 cm DE PROFUNDIDAD						
Nº DE EVALUACIÓN:		2	FECHA:	04/09/2008		
Tratamiento	Nº muestra	Estado de la planta	Nº raíces			Peso de raíces (gr)
			Funcionales	Necrosadas o secas	Total	



1	3	sana	22	2	24	119,67
	3	enferma	18	0	18	80,97
2	3	sana	26	2	27	131,74
	3	enferma	19	0	20	94,39
3	3	sana	30	1	31	150
	3	enferma	19	1	21	86,72
4	3	sana	22	2	24	101,57
	3	enferma	23	1	24	72,21
5	3	sana	24	0	24	107,34
	3	enferma	20	1	21	119,30
6	3	sana	30	4	33	189,89
	3	enferma	26	2	28	117,13
7	3	sana	17	1	18	60,52
	3	enferma	20	3	23	80,71
8	3	sana	28	2	30	98,38
	3	enferma	21	1	22	98,38
9	3	sana	23	0	23	109,02
	3	enferma	23	3	26	94,39
10	3	sana	37	2	39	101,29
	3	enferma	19	0	19	96,19
11	3	sana	28	0	29	150,13
	3	enferma	28	0	29	111,53

El daño de raíces en plantas sanas se debe a la normal descomposición de raíces que ya cumplieron con su función y que son reemplazadas por otras. En el caso de las plantas enfermas se debe a la pudrición que causa la enfermedad que hace que el sistema radicular se seque.

Los resultados de los análisis de suelo realizados al inicio y final de la evaluación de campo muestran altos contenidos de calcio, por lo que se descarta por completo la asociación con la enfermedad, concordando con Vargas (1989), que manifiesta que para el normal desarrollo de las raíces de palmito se requiere cierta cantidad de Ca.

#### 4.8. ANÁLISIS ECONÓMICO DE LOS TRATAMIENTOS

Se realizó el análisis económico para cada uno de los tratamientos aplicados en la zona de estudio (Anexo 9). El análisis económico indica los siguientes costos de aplicación:

Cuadro 30. Costos variables de aplicación por programa de los tratamientos para el control de la enfermedad.

	(USD)
1	927,75

2	284,00
3	296,00
4	501,20
5	565,40
6	521,50
7	527,50
8	290,00
9	524,50
10	523,51

Desde el punto de vista económico el tratamiento (T) 2 tiene menor costo de aplicación por programa (284,00 USD), seguido del T8 con 290,00 USD por programa. El T1 (927,75 USD) tiene mayor costo de aplicación con respecto al resto de tratamientos.

Comparando el costo de aplicación de los tratamientos con el efecto que tienen sobre el control de la enfermedad, el T2 es más adecuado y económico para el control de la enfermedad en plantas de primera generación, seguido del T8 que es indicado para el control de la enfermedad a nivel de hijuelos. Una alternativa biológica es el T5 que tiene un costo de aplicación por programa de 565,40 dólares, con este tratamiento se logró reducir la incidencia a 1,85 %, con el T2 se redujo a 1,97 %, el T5 tiene 0,43 % de incidencia menor que el T2 (cuadro 20).

Ante esta situación es importante considerar que el T5 es biológico, el 2 químico y que a través del tiempo los efectos son más duraderos si se aplica el T5. Vallejo (1993) manifiesta que el uso de pesticidas será justificado si se emplean las normas técnicas de seguridad que se aconsejan para cada uno de ellos, si está comprobado que este ejerce determinado control sobre las enfermedades y si el costo representa el resultado que se va a obtener.

## V. CONCLUSIONES

Existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas.

Las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en condiciones *in vitro*, demostraron una gran actividad antagónica en contra de los patógenos *Fusarium moniliforme* y *Phytophthora palmivora*.

Las cepas C9, y SG alcanzaron los menores incrementos radiales diarios de *F. moniliforme*, mientras que la cepa MT logró los menores incrementos diarios del desarrollo radial de *P. palmivora*, considerándose de esta manera los más antagónicos para controlar la enfermedad

El análisis de varianza del promedio de la incidencia de la enfermedad en plantas de primera generación mostró diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el tratamiento 5 y 2 los mejores.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas para el porcentaje de incidencia en plantas de segunda generación, sin embargo la prueba de Duncan al 5 % ubica al tratamiento 8 como el mejor.

El tratamiento más adecuado y económico fue el 2 (Sulfato de cobre pentahidratado, 284 USD), el tratamiento 5 es efectivo en el control de la enfermedad, sin embargo su costo es de 565,40 USD.

El porcentaje de daño de raíces no influye directamente con los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad, ya que no existen diferencias significativas en el número de raíces necrosadas que tienen las plantas sanas y enfermas.

Del análisis de suelo realizado se concluye que el alto contenido de nitrógeno en forma amoniacal contribuye a que el fosforo se vuelva inaprovechable creando condiciones propicias para el desarrollo de microorganismos patógenos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Realizar ensayos de acción inhibitoria con las cepas nativas de *Trichoderma* spp. (C9, MT y SG) y nuevas cepas aisladas de zonas productoras de palmito, a fin de ampliar el banco de cepas antagonistas en contra de los patógenos causante de la pudrición de flecha)..

Utilizar primers específicos para *Trichoderma* spp. en la extracción de ADN, para lograr una secuenciación con alto porcentaje de similitud y poder determinar con exactitud las especies del Biocontrolador.

Se recomienda un sistema de manejo integrado de la enfermedad para reducir la incidencia de la enfermedad alternando productos químicos como el Sulfato de Cobre Pentahidratado para luego realizar controles con productos biológicos a base de *Trichoderma* spp.

En plantaciones donde existen bajos porcentajes de incidencia de la enfermedad se debería eliminar plantas enfermas como muertas, a fin de reducir fuentes de inóculo.

Es recomendable desinfectar las herramientas de trabajo que han sido utilizadas en lotes o en plantas que presenten sintomatología de pudrición de flecha, ya que estas son una importante fuente de transmisión.

En el cateo de raíces se debe tomar en cuenta las características que presentan las raíces a medida que progresa el daño en la planta, las raíces a evaluar deben corresponder a la planta en estudio.

Se propone la realización de una fertilización acorde con las exigencias del cultivo de palmito, no solo basada en cantidades de elementos, sino que proporcione un balance nutricional de las plantas permitiendo disminuir antagonismos entre ciertos elementos y disminuir así la susceptibilidad de la planta al ataque de hongos y bacterias.

## **VII. RESUMEN**

En los meses de Octubre del 2007 a Agosto del 2008 se realizó la investigación dirigida al control de la enfermedad Pudrición de Flecha del cultivo de palmito, se utilizó controladores químicos y biológicos en una plantación ubicada en la Comuna Dos de Agosto cantón Santo Domingo, integrada a la Industria Agrícola Exportadora “INAEXPO”. Para la obtención del controlador biológico se recolectaron muestras de suelo de diferentes localidades en la zona de influencia de Santo Domingo a fin de capturar cepas nativas de *Trichoderma* spp, en el laboratorio de Fitopatología de la ESPE Santo Domingo, se realizaron ensayos de crecimiento micelial y de capacidad antagónica para seleccionar tres cepas nativas con mayor actividad antagónica y elaborar el biocontrolador que posteriormente fue aplicado en el campo. A las cepas seleccionadas (C9, MT y SG) se les extrajo ADN para mediante la secuenciación determinar la especie, dando como resultado cada una de ellas 99 % de similitud con la especie *longibrachiatum*.

En la fase de campo se establecieron 11 tratamientos químicos y biológicos aplicados en intervalos de una semana durante un mes. Se analizó las variables porcentaje de incidencia en plantas de primera generación y porcentaje de incidencia en plantas de segunda generación para cada uno de los tratamientos. Los resultados fueron calculados en base al número de plantas enfermas y fueron transformados mediante  $\sqrt{x+1}$ , se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos; el menor porcentaje de incidencia tuvo el tratamiento 5 con 1,85 %, seguido del tratamiento 2 y 3 con 1,97 % y 2,28 % de incidencia respectivamente, para la variable porcentaje de incidencia a nivel de hijuelos no existen diferencias significativas pero las comparaciones ortogonales realizadas indican diferencias altamente significativas al comparar el testigo versus el resto de tratamientos.

El costo de aplicación de los tratamientos que mejor resultado tienen en contra de la enfermedad son: para el tratamiento 5 el costo es de 565,40 USD, el tratamiento 2 con 284,00 USD y el tratamiento 3 con 296,00 USD.

## VIII. SUMMARY

From October 2007 to August 2008 a research was carried out to evaluate the most suitable control for the disease named “Pudrición de Flecha (Arrow`s Rot)” on palm heart crop, using both chemical and biological control agents. The experimental site was located in Santo Domingo and the farm is part of the integrated system managed by the company “INAEXPO”. In order to obtain the biological control agents, several soil samples were collected in the Santo Domingo Area, all these native strains of *Trichoderma* spp were evaluated under laboratory conditions for mycelial growth and the greater antagonistic capacity against *F. moniliforme* and *F. palmivora* , after that, a biocontrol agent formulation was made to apply to the field. From the selected strains C9, MT and SG, DNA was extracted in order to sequence and determine the specie, which brought about 99% match with *T. longibrachiatum*.

During the field phase, eleven treatments were tested including chemical and biological, on a one-week interval basis for one month. The variables analyzed were percentage of incidence, and percentage of incidence on suckers for each treatment.

The results were calculated based on the number of diseased plants followed by a  $\sqrt{x+1}$  transformation. Significant differences were found among several treatments, applying treatment 5 (Biocontrolador *Trichoderma*) resulted on the least incidence of the disease (1.85%) compared to treatment 2 (copper sulfate) with 1.97% and, treatment 3 (Fosetil- Al) with 2.28% of incidence. For the variable percentage of incidence on suckers, there were no significant differences but, the orthogonal comparisons brought about high significance when comparing the control with the rest of treatments.

The application cost for treatment 5 was \$254.36, \$284 for treatment 2 and \$296 for treatment 3.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 1998. Manual de Fitopatología. 2da Edición. Editorial Limusa. México DF, México. 838 p.
- ARGOTI E. 2007. Extracción de ADN Genómico de Organismo Eucariotas (Hongos). Primero Curso de Herramientas Biotecnológicas de uso Agropecuario. 3 p.
- ARROYO C., ARAUZ L., MORA J. 2004. Incidencia de Enfermedades en Pejibaye (*Bactris gasipaes* KUNTH) para Palmito (en línea). Nota Técnica. Agronomía Mesoamericana 61-68. Consultado el 25 Nov. 2008. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v15n01\\_061.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v15n01_061.pdf)
- BACKMAN, P.; RODRÍGUEZ-KABANA, P. 1975. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology* 65(7):819-821 p.
- BENÍTEZ T., RINCÓN A.; LIMON M. 2004. Mecanismos de Biocontrol de cepas de *Trichoderma* (en línea). *International Microbiology*. Consultado el 29 de Nov. Del 2008. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/scielo.php>
- CERVANTES, M. (2004). Evaluación *in vitro* de tres aislamientos de *Trichoderma* spp. como antagonista de patógenos de post-cosecha de los frutos cítricos. Centro Agrícola. 42-45 p.
- CORPEI. 2006. Palmito (en línea). Perfiles de Productos. Centro de Inteligencia Comercial. CICO. Consultado el 4 Jun. 2007. Disponible en: [http://200.110.94.59/productos\\_down/perfil\\_de\\_palmito\\_2005765.pdf](http://200.110.94.59/productos_down/perfil_de_palmito_2005765.pdf)
- CHALÁ V. 1996. Manejo del Cultivo del Palmito. Proyecto MAG-FAO. Santo Domingo de los Colorados. Ecuador. 20 p.
- DUBOS, B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. Wiley, N.Y. 107-135 p.
- EQUABIOLÓGICA (2006). Agroindustria de Control Biológico del Ecuador (en línea). Consultado 2 Jun. 2007. Disponible en: [http://www.aebe.com.ec/data/files/Inovaciones/productos\\_biologicos.pdf](http://www.aebe.com.ec/data/files/Inovaciones/productos_biologicos.pdf)

- ERAZO A. 2007. Evaluación de tres dosis de *Trichoderma harzianum*, para el control de tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y costra negra (*Rhizoctonia solani*) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Escuela Politécnica del Chimborazo. Riobamba- Ecuador. 16-17 p.
- EZZIYYANI M., PÉREZ C., SID A., REQUENA M., CANDELA M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*) (en línea). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Murcia, España. Consultado 16 Jun. 2007. Disponible en: <http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>
- FALCONÍ C. 1997. El Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Primera Edición. Quito. Ecuador. 200 p.
- FARÍAS I. 2005. Conceptos de Biología Molecular de Plantas. Folleto para Alumnos de Bioquímica y Biología Molecular de la Escuela Superior de Ingeniería Agraria. Laguna. España. 150 p.
- FERNÁNDEZ M., LÓPEZ M., ORTIZ F., 2005. Aplicación de Plaguicidas. Segunda Edición. Consejería de Agricultura y Pesca. Mundiprensa. 50 p.
- GAVILANES R. MONZÓN A., RODRÍGUEZ L. (2002) Búsqueda de Marcadores Moleculares Y Fisiológicos para Detectar Resistencia Natural a la Infección por *Fusarium Moniliforme* en Maíz. (en línea) Dpto de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. Consultado 19 Jun. 2007. Disponible en: <http://www.siicyt.gob>.
- GILMAN J. 1963. Manual de los Hongos del Suelo. Segunda Edición. Editorial Continental. México. 350 p.
- GONZÁLEZ G. 1976. Métodos Estadísticos y Principios de Diseño Experimental. Segunda edición. Universidad Central del Ecuador. Quito. 192 p.
- GRAHAM M. 2000. *Phytophthora* – Induced diseases, Minnesota. Estados Unidos 12 – 13 p.
- GUEVARA Y., RONDÓN A., SOLÓRZANO R. 1999. Bacteriosis del Mango. Sintomatología e Identificación (en línea). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias FONIAP. Maracay. Venezuela. Consultado el 1 de Sep. del 2008. Disponible en: [www.ceniap.gov.ve/.../at3016/arti/guevara\\_y.htm](http://www.ceniap.gov.ve/.../at3016/arti/guevara_y.htm)
- HARMAN, G.E. 2000. *Trichoderma* for Biocontrol of plant pathogens: From basic research to commercialized products. Departments of horticultural science and of plant pathology. Cornell University. Consultado el 3 de Noviembre 2008. Disponible en <http://harman.html>
- HORSFALL, J. 1980. Iatrogenic disease: mechanism of action. In Plant Diseases. Eds. Horsfall, J.G.; Cowling, E.B. New York, Academic Press. 343-355 p.
- HOWELL, C. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling disease. *Bioc. Sci. and Technol.* 435-41p.
- INSTITUTO GEOGRÁFICO MILITAR. 2000. Carta Topográfica: Luz de América (en línea). Escala 1:50.000 (CT-NIII-D3). Consultado el 26 de Julio del 2007. Disponible en: [http://www.igm.gov.ec/cms/files/cartabase/n/NIII\\_D3.htm](http://www.igm.gov.ec/cms/files/cartabase/n/NIII_D3.htm)
- INSTITUTO GEOGRÁFICO MILITAR. 2000. Carta Topográfica: Patricia Pilar (en línea). Escala 1:50.000 (CT-NIII-D3). Consultado el 26 de Julio del 2007. Disponible en: <http://www.igm.gov.ec>
- KORNBLIHTT A. 1993 La Reacción en Cadena de la Polimerasa. El método y sus Aplicaciones (en línea). Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y



- Biología Molecular (INGEBI-CONICET). Argentina. Consultado 1 de sep. del 2008. Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion1.htm>
- LATORRE B. 1999. Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Quinta Edición. Alfa omega. México D.F. 230 p.
- LLÁCER G., LÓPEA M., TRAPERO A., BELLO A. (2002). Patología Vegetal Tomo II. Segunda edición. Mundi Prensa. Barcelona- España. 280 p.
- MENEZES. 1995. Fungos fitopatogénicos. Imprensa universitaria, Recife – Pernambuco, Brasil. 277 p.
- MORA J. 2001. Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma harzianum*. Zamorano. Honduras. Consultado 15 Junio 2008. Disponible en: [http://zamoto-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2003/T1691.pdf](http://zamoto-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2003/T1691.pdf)
- NAVARRO M. 1998. La Liofilización de Productos Farmacéuticos (en línea). Sintefarma. Consultado 1 Sep. 2008. Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/sint/vol4\\_1\\_98/sint5198.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/sint/vol4_1_98/sint5198.htm)
- NÚÑEZ L. 2003. Uso de Termoterapia y Control Biológico para el Tratamiento de *Fusarium oxysporum* en Babaco. Tesis para Master en Ciencias de Fitoprotección. Quito. 90 p.
- ORIETTA F., LARREA V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario (en línea). Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Costa Rica. Consultado 16 Jun. 2006. Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rev62/96-100.pdf>
- PADILLA W. 2004. Fertilización de Suelos y Nutrición Vegetal. Tercera Edición. Quito-Ecuador. 185 p.
- PAEZ O. 2006. Uso Agrícola del *Trichoderma* (en línea). Consultado 16 Jun. 2007. Disponible en: <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>
- PIZZINATTO, M.; BOVI, A.; SPIERING, H.; BINOTTI, C. 2001. Pathogenicity of five species of *Fusarium* to pejibaye plants (*Bactris gasipaes*) (en línea). Summa-Phytopathologica. Consultado 25 Nov. 2008. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v15n01\\_061.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v15n01_061.pdf)
- QUEZADA C. 2007. Diagnóstico E Identificación del Agente Causal de la Pudrición de Flecha en el Cultivo de Palmito (*Bactris Gasipaes H.B.K.*) en La Zona de Santo Domingo. Santo Domingo. Ecuador. 146 p.
- RIVERA, G. 1999. Manual de Fitopatología. Principales enfermedades del Coco y el Pejibaye. Costa Rica. 33 p.
- RIZZO P. 2002. Palmito Ecuatoriano (en línea). Proyecto SICA. Banco Mundial. Consultado el 4 Jun. 2007. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec>
- RODRIGUEZ P., BARRERA H. 2004. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos Décadas de su Invención (en línea). Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresiones Genéticas. Universidad de Nuevo León. México. Consultado 1 Sep. 2008. Disponible en: <http://www.fcv.unlp.edu.ar>
- SUMITOMO CORPORACIÓN DEL ECUADOR. 2007. Tachigaren Fungicida Sistémico. Quito. Ecuador. 14 p.
- STEFANOVA M. 2000. Producción y aplicación de *Trichoderma spp.* como antagonista de hongos fitopatogénicos. Laboratorio de Bacteriología INISAV. Habana, Cuba. Consultado 06 Nov. 2008. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/TRICHODE.htm>
- STEFANOVA M., LEIVA A. LARRINAGA L., CORONADO F., 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos

- fitopatógenos del suelo. Departamento de Microbiología. Instituto de Sanidad Vegetal. La Universidad del Zulia. Consultado 28 de Nov. 2008. Disponible en: [http://www.revfacagronluz.org.ve/v16\\_2/v162z005.html](http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_2/v162z005.html)
- TORRECILLA V. 2002. Liofilización (en línea). Dantechique LTDA. Ingeniería y proyectos. Santiago. Chile. Consultado 1 Sep. 2008. Disponible en: <http://www.dantechique.cl/Nuevos%20Articulos/liofilizacion.pdf>
- VADEMÉCUM Agrícola. 2006. Edifarm. Novena edición. 1256 pp.
- VALLEJO H. 1993. Manual Técnico de Agroquímicos. Primera edición. Ediciones Monserrat. Quito. Ecuador. 180 p.
- VARGAS, E. 1999. Enfermedades del Tallo del Palmito. Boletín Informativo Vol. 1 Laboratorio de Fitopatología. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 25 p.
- VARGAS L., SOLÓRZANO A., BRAVO O. 2003. Proyecto de Generación de Tecnología para el manejo de la enfermedad conocida como la bacteriosis del palmito de pejibaye. (en línea). Consultado 2 Jun. 2007. Disponible en: <http://www.pejibaye.ucr.ac.cr/PEnfermedades.htm>
- VELÁZQUEZ, J. Y PINEDA, J. 1995. Antagonismo “In vitro” de 5 aislamientos de *Trichoderma harzianum* vs *Sclerotium rolfsii* Sacc. Consultado 25 Nov. 2008. Disponible en: <http://pegassus.ucla.edu.ve/ccr/resumen/agronomia/r60ag.html>
- VILLEE M.; BERG M. 1998. Biología de Villee. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana. México. 259 p.
- WINDHAM M.; ELAD Y.; BAKER R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76:518-521.
- YÁNEZ V. 2003. Producción de Biopreparados a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sp. para el Control Biológico de la Moniliasis del Cacao. Boletín Técnico Nº 2. Primera Edición. Centro del Control Biológico ESPE-IASA. Sangolquí. Ecuador. 80 p.
- ZUNINO G. 2004. Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. *in vitro* con énfasis en pruebas de control de calidad. Zamorano. Honduras. Consultado el 15 de Junio 2008. Disponible en: [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2004/T1965.pdf](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2004/T1965.pdf)

## X. ANEXOS

Anexo 1. Codificación de las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas

<b>Nº</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>CÓDIGO</b>
1	Patricia Pilar	PP
2	San Jacinto	SJ
3	San Gabriel	SG
4	Río Verde	RV
5	Pedro Vicente	PV
6	Nuevo Israel	NI
7	Mulaute	MT
8	Puerto Limón	PL
9	El Esfuerzo	EE
1	Paisaje	PS
1	Molestina	Mol
1	2 de Agosto	2 A
1	San Andrés	SA
1	Zoila Luz	ZL
1	Trichoeb	Tch
1	ESPE	C3
1	ESPE	CSA
1	ESPE	C23
1	ESPE	STO DGO
2	ESPE	C2
2	ESPE	C5
2	ESPE	C13
2	ESPE	C7
2	ESPE	C9
2	ESPE	C17
2	ESPE	SP
2	ESPE	C27
2	ESPE	C28
2	ESPE	ZLE
3	ESPE	C26

Anexo 2. Medio selectivo para captura de *Trichoderma* spp.

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad</b>
Nitrato de calcio	1,0 g
Nitrato de potasio	0,25 g
Sulfato de magnesio	0,25 g
Fosfato de potasio	0,25 g
Cloruro de calcio	1,0 g
Ácido cítrico	0,05 g

Sacarosa	2,0 g
Agar	25,0 g
Agua	1 litro
Sulfato de estreptomicina	0,005 g
Mancozeb	0,003 g
Alcohol etílico	0,50 ml

Anexo 3. Metodología propuesta por Kim et. al. 1992 modificada por Lee, 2000 y rectificada por Argoti, 2007. para extracción de ADN de hongos.

1. Colocar 4 ml de agua destilada estéril en la caja petri con micelio de siete días de crecimiento y se deposita en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos y eliminar el sobrenadante.
2. Al tubo Eppendorf que contiene el micelio añade 500 µL de buffer CTAB.
3. Añada 1,5 µL de proteinasa K a cada muestra (0.1 mg/ml) e incube a 65° C por una hora a baño maría.
4. Añada 700 µL de fenol –cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y centrifugue a 13000 rpm por 30 minutos.
5. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo y añada 1 volumen de fenol – cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y centrifugue a 13000 rpm por 15 minutos. Retire el sobrenadante.
6. Trate el sobrenadante con 1 µL de RNA asa (50 µg/ml) e incube por una hora a 37 ° C.
7. Añada 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y centrifugue a 13000 rpm por quince minutos. El sobrenadante transfiera a otro tubo.

8. Añada 25 µL de acetato de sodio 3M y 500 µL de isopropanol helado y se deja en incubación toda la noche a -20 ° C, centrifugue a 13000 rpm por 15 minutos. Elimine el sobrenadante.
9. Añada 400 µL de etanol 75% y centrifugue a 13000 rpm por 10 minutos. Elimine el alcohol y deje secar al ambiente por 150 minutos.
10. Resuspenda el pellet de ADN en 50 µL de TE e incube a -20 ° C.
11. Una vez que se agrega Tris - Cl - DTA (TE) es necesario preparar el mix para PCR.

#### Anexo 4. Programas semanales para la aplicación de controladores

SEMANA 1				
TRATAMIENTO	PRODUCTO	DOSIS (general)	DOSIS (específica)	TIPO DE APLICACIÓN
1	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
2	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
3	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
4	Trichoeb	250 g/tanque	25 g/bomba	DRENCH
5	Trichoderma	1 l /tanque	100cc/bomba	DRENCH
6	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
7	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
8	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
9	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
10	Trichoeb	250g/tanque	25 g/bomba	DRENCH
11	TESTIGO			

SEMANA 2				
TRATAMIENTO	PRODUCTO	DOSIS (general)	DOSIS (específica)	TIPO DE APLICACIÓN
1	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
2	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
3	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
4	Trichoeb	250 g/tanque	25 g/bomba	FOLIAR
5	Trichoderma	1 l/tanque	100 cc/bomba	FOLIAR
6	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
7	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR

8	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
9	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
10	Trichoderma	1 l/tanque	100cc/bomba	FOLIAR
11	TESTIGO			

Anexo 4. Programas semanales para la aplicación de controladores

<b>SEMANA 3</b>				
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>DOSIS (general)</b>	<b>DOSIS (específica)</b>	<b>TIPO DE APLICACIÓN</b>
1	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
2	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
3	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
4	Trichoeb	250 g/tanque	25 g/bomba	FOLIAR
5	Trichoderma	1 l /tanque	100cc/bomba	DRENCH
6	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
7	Tachirzye	500 g/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
8	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
9	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
10	Trichoeb	250g/tanque	25 g/bomba	DRENCH
11	TESTIGO			

<b>SEMANA 4</b>				
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>DOSIS (general)</b>	<b>DOSIS (específica)</b>	<b>TIPO DE APLICACIÓN</b>
1	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
2	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
3	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
4	Trichoeb	250 g/tanque	25 g/bomba	FOLIAR
5	Trichoderma	1 l /tanque	100 cc/bomba	FOLIAR
6	Phyton	500 cc/tanque	50 cc/bomba	FOLIAR
7	Alliete	500 g/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
8	Alliete	500 cc/tanque	50 g/bomba	FOLIAR
9	Tachirzye	500 cc/tanque	50 cc/bomba	DRENCH
10	Trichoderma	1 l/tanque	100 cc/bomba	FOLIAR
11	TESTIGO			

Anexo 5. Datos del ensayo de crecimiento radial durante los dos días de evaluación.

N. Cepas	Código	Día 1				Día 2				TOTAL				X
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	
1	PP	9	7	7	9	29	29	16	28	38	36	23	37	34
2	SJ	11	10	10	9	29	28	30	22	40	38	40	31	37
3	SG	10	8	8	4	32	28	31	18	42	36	39	22	35
4	RV	11	14	11	9	26	20	29	22	37	34	40	31	36
5	PV	2	3	3	5	16	16	16	15	18	19	19	20	19
6	NI	12	9	14	13	26	23	23	18	38	32	37	31	35
7	MT	10	12	12	11	28	25	29	26	38	37	41	37	38
8	PL	2	7	7	15	18	19	33	28	20	26	40	43	32
9	EE	8	8	8	9	31	29	28	29	39	37	36	38	38
10	PS	6	5	5	5	11	12	11	14	17	17	16	19	17
11	Mol	15	14	12	11	27	29	30	30	42	43	42	41	42
12	2A	7	7	7	8	20	17	20	18	27	24	27	26	26
13	SA	9	10	7	11	13	24	28	23	22	34	35	34	31
14	ZL	10	7	10	6	26	16	20	28	36	23	30	34	31
15	Tch	6	6	6	4	17	17	17	14	23	23	23	18	22
16	C3	2	2	4	2	19	17	20	18	21	19	24	20	21
17	CSA	7	4	4	5	20	20	18	33	27	24	22	38	28
18	C23	5	3	4	5	16	17	16	17	21	20	20	22	21
19	STO DGO	10	6	7	14	30	18	17	21	40	24	24	35	31
20	C2	2	4	3	3	20	19	19	19	22	23	22	22	22
21	C5	5	5	5	5	17	20	20	19	22	25	25	24	24
22	C13	5	5	5	3	20	21	18	20	25	26	23	23	24
23	C7	6	5	3	2	21	32	22	18	27	37	25	20	27
24	C9	9	8	7	7	30	32	30	29	39	40	37	36	38
25	C17	5	5	4	3	20	22	22	21	25	27	26	24	26
26	SP	5	5	2	6	23	23	19	23	28	28	21	29	27
27	C27	6	11	9	8	22	32	19	21	28	43	28	29	32
28	C28	7	5	6	8	20	18	19	20	27	23	25	28	26
29	ZLE	5	5	5	4	19	18	19	20	24	23	24	24	24
30	C26	8	7	9	9	29	29	30	28	37	36	39	37	37

Anexo 7. Datos del porcentaje de incidencia de la enfermedad en la primera generación durante nueve evaluaciones cada quince días, realizadas después de cada programa de control.

REP	TRAT	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	13,33	20,00	20,00	6,67	26,67	26,67	26,67	26,67	26,67
2	1	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67
3	1	6,67	20,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	2	6,67	13,33	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	2	0,00	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	2	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67
1	3	6,67	6,67	6,67	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67
2	3	0,00	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	3	6,67	13,33	13,33	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67
1	4	0,00	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67	6,67
2	4	6,67	13,33	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	4	6,67	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33	13,33
1	5	0,00	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	5	13,33	13,33	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	6	6,67	6,67	6,67	0,00	0,00	6,67	13,33	13,33	13,33
2	6	6,67	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	6	20,00	20,00	20,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	7	6,67	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	7	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	13,33	13,33	13,33	13,33
3	7	13,33	13,33	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	8	0,00	13,33	13,33	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67
2	8	0,00	13,33	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	8	0,00	6,67	6,67	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67
1	9	13,33	13,33	13,33	0,00	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67
2	9	13,33	13,33	13,33	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00
3	9	6,67	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	10	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67
2	10	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67	6,67



3	10	6,67	6,67	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,67
1	11	6,67	6,67	6,67	13,33	13,33	13,33	20,00	20,00	20,00
2	11	0,00	6,67	6,67	6,67	6,67	20,00	20,00	20,00	20,00
3	11	20,00	26,67	26,67	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33

Anexo 8. Datos del porcentaje de incidencia de la enfermedad de la segunda generación durante nueve evaluaciones cada quince días después de cada programa de control.

TRAT.	REP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	7,69	2,17	0,00	6,82	4,08	7,14	21,43	17,91	18,31
1	2	12,90	2,22	0,00	4,35	2,27	8,70	8,33	6,67	7,69
1	3	5,56	1,69	0,00	0,00	0,00	9,84	9,23	8,33	8,33
2	1	9,68	2,33	0,00	0,00	1,75	0,00	4,92	4,23	4,11
2	2	21,74	0,00	2,86	0,00	0,00	0,00	3,77	3,57	5,45
2	3	4,55	3,45	0,00	5,88	8,57	6,45	7,14	6,25	10,20
3	1	20,00	2,67	0,00	0,00	0,00	6,06	5,88	5,62	5,49
3	2	24,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	3	12,50	4,26	2,44	1,85	1,72	1,75	14,52	14,29	14,29
4	1	42,86	5,56	11,11	3,57	0,00	5,56	25,00	7,84	19,64
4	2	28,57	0,00	3,70	0,00	2,78	7,50	9,30	22,00	7,55
4	3	0,00	4,00	6,45	4,55	4,35	27,03	27,50	1,06	21,57
5	1	30,23	0,00	0,00	0,00	0,00	1,18	1,14	13,73	1,05
5	2	16,67	0,00	8,70	0,00	3,57	14,71	17,07	13,73	11,86
5	3	9,09	1,89	7,02	0,00	0,00	1,92	3,39	3,03	3,17
6	1	42,11	3,70	0,00	0,00	3,13	9,76	11,11	10,64	10,87
6	2	15,79	3,70	0,00	0,00	0,00	2,04	1,89	5,45	5,08
6	3	0,00	5,13	0,00	4,17	4,17	2,63	4,88	6,52	6,38
7	1	25,00	3,45	0,00	0,00	4,17	0,00	9,68	11,29	10,77
7	2	3,45	7,84	0,00	2,00	0,00	0,00	1,64	1,54	1,59
7	3	7,89	0,00	1,82	7,81	7,25	18,33	18,84	18,57	18,06
8	1	0,00	3,51	0,00	3,57	1,82	2,04	3,33	2,86	2,70
8	2	23,81	0,00	0,00	0,00	5,88	9,38	9,62	9,43	10,71
8	3	0,00	2,50	0,00	0,00	0,00	1,89	3,45	3,13	2,94
9	1	28,21	17,54	1,82	3,23	3,23	1,45	1,33	1,18	2,20
9	2	20,00	0,00	0,00	0,00	2,04	0,00	0,00	1,54	3,45
9	3	30,00	8,70	0,00	0,00	3,03	5,26	4,65	4,26	4,65
10	1	18,52	11,11	2,63	6,98	10,00	0,00	1,92	5,66	5,36
10	2	15,56	1,59	6,98	1,96	1,92	10,20	8,06	7,25	7,25
10	3	9,38	4,08	0,00	3,13	2,99	2,99	2,82	2,47	2,63
11	1	6,25	0,00	0,00	4,44	4,92	6,12	13,73	14,04	15,25
11	2	3,45	1,85	9,30	12,70	3,85	12,20	25,00	23,53	24,00
11	3	14,81	2,44	0,00	11,11	12,82	9,68	19,35	17,14	15,00

Anexo 9. Costos de aplicación de cada uno de los tratamientos para el control de la enfermedad pudrición de flecha del palmito.

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
1	Primera	Hymexazol	l	2,81	75,00	210,94
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	Segunda	Hymexazol	l	2,81	75,00	210,94
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	Tercera	Hymexazol	l	2,81	75,00	210,94
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	Cuarta	Hymexazol	l	2,81	75,00	210,94
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
<b>TOTAL</b>						<b>927,75</b>

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
2	Primera	SCP*	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Segunda	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Tercera	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Cuarta	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>284,00</b>

\*Sulfato de Cobre Pentahidratado

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
3	Primera	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Segunda	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Tercera	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Cuarta	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>296,00</b>

Anexo 9. Costos de aplicación de cada uno de los tratamientos para el control de la enfermedad pudrición de flecha del palmito.

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)

	<b>Primera</b>	TC*	gr	1406,00	0,10	140,60
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
<b>4</b>	<b>Segunda</b>	TC	gr	750,00	0,10	75,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	<b>Tercera</b>	TC	gr	1406,00	0,10	140,60
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	<b>Cuarta</b>	TC	gr	750,00	0,10	75,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>501,20</b>

\*Trichoderma comercial

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	
	<b>Primera</b>	Trichoderma sp.	l	5,25	30,77	161,64
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
<b>5</b>	<b>Segunda</b>	Trichoderma sp.	l	2,80	30,77	86,16
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	<b>Tercera</b>	Trichoderma sp.	l	5,25	30,77	161,64
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	<b>Cuarta</b>	Trichoderma sp.	l	2,80	30,77	86,16
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>565,40</b>

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
	<b>Primera</b>	Hymexazol	l	2,81	60,00	168,75
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
<b>6</b>	<b>Segunda</b>	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	<b>Tercera</b>	Hymexazol	l	2,81	60,00	168,75
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	<b>Cuarta</b>	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>521,50</b>

Anexo 9. Costos de aplicación de cada uno de los tratamientos para el control de la enfermedad pudrición de flecha del palmito.

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
	<b>Primera</b>	Hymexazol	l	2,81	60,00	168,75
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
<b>7</b>	<b>Segunda</b>	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	<b>Tercera</b>	Hymexazol	l	2,81	60,00	168,75
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	<b>Cuarta</b>	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00

<b>TOTAL</b>	<b>527,50</b>
--------------	---------------

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
	Primera	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
8	Segunda	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Tercera	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Cuarta	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>290,00</b>

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
	Primera	Hymexazol	l	2,81	60,00	168,75
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
9	Segunda	Fosetil Al	kg	1,50	40,00	60,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Tercera	SCP	l	1,50	38,00	57,00
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Cuarta	Hymexazol	l	2,81	60,00	168,75
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
<b>TOTAL</b>						<b>524,50</b>

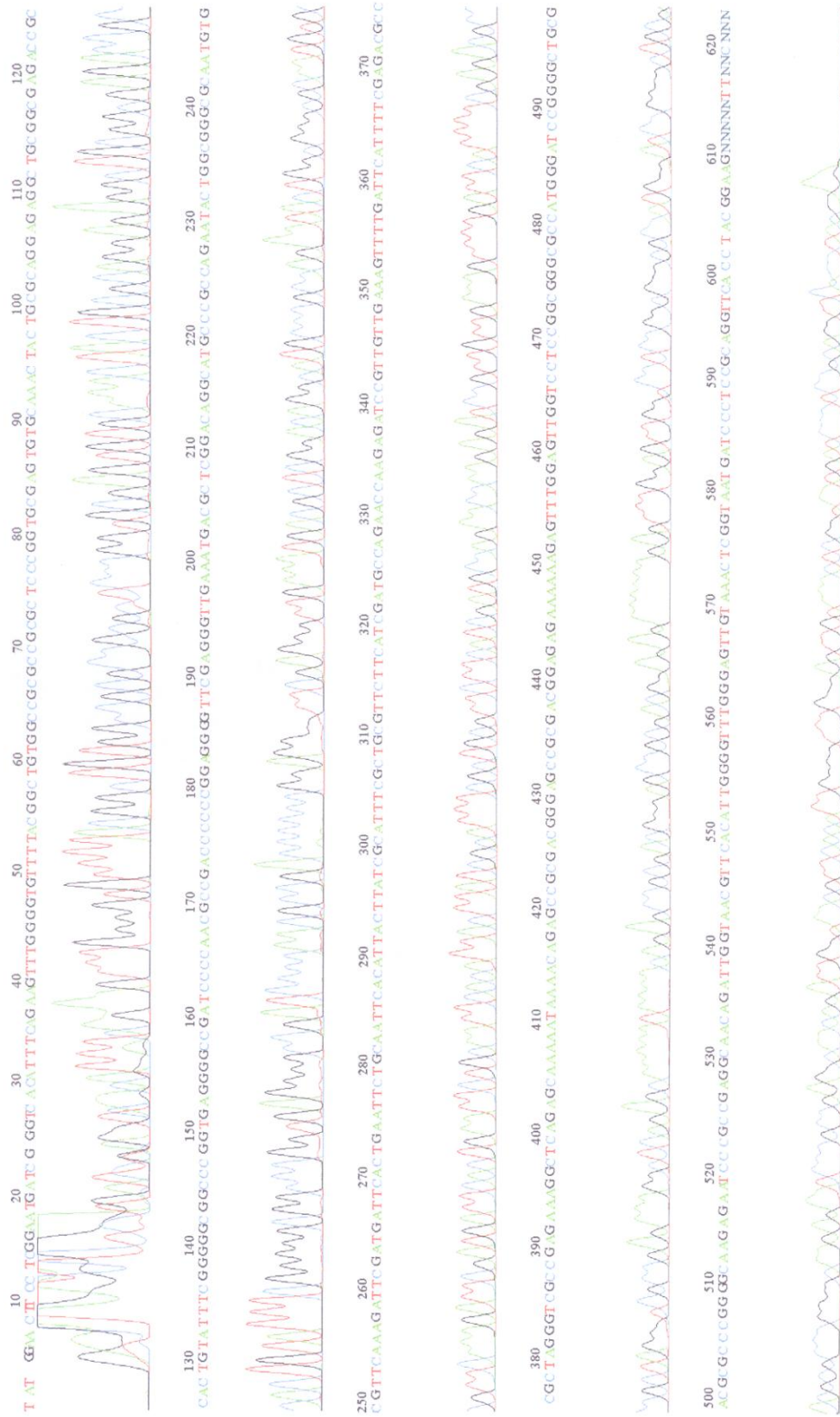
Anexo 9. Costos de aplicación de cada uno de los tratamientos para el control de la enfermedad pudrición de flecha del palmito.

TRATAMIENTO	APLICACIÓN	PRODUCTO	UNIDAD	REQUERIMIENTO	PRECIO	TOTAL
					UNITARIO (\$)	(\$)
	Primera	TC	gr	1406,00	0,10	140,60
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
10	Segunda	Trichoderma	l	2,80	30,77	86,16
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
	Tercera	TC	gr	1406,00	25,00	140,60
		Jornal	u	3,00	7,00	21,00
	Cuarta	Trichoderma	l	2,80	30,77	86,16
		Jornal	u	2,00	7,00	14,00
<b>TOTAL</b>						<b>523,51</b>

Anexo 10. Resultados de secuenciación de la cepa C9 en ITS1



File: 080805-02\_C22\_C91-ITS4.ab1 Run Ended: 2008/8/6 8:10:40 Signal G:612 A:543 C:667 T:376  
 Sample: C91\_ITS4 Lane: 93 Base spacing: 13.84 958 bases in 11302 scans Page 1 of 2

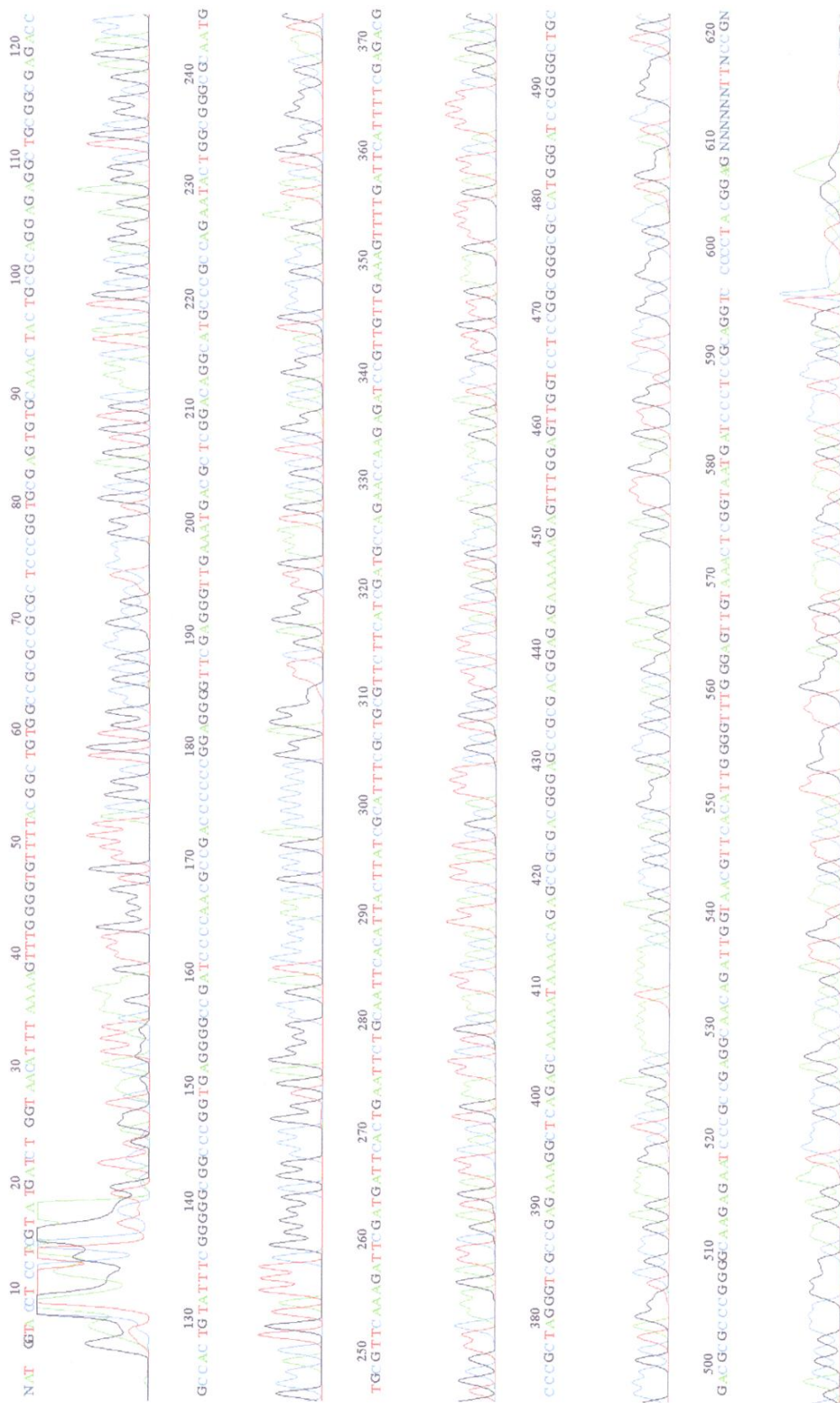


Anexo 12. Resultados de secuenciación de la cepa MT en ITS1

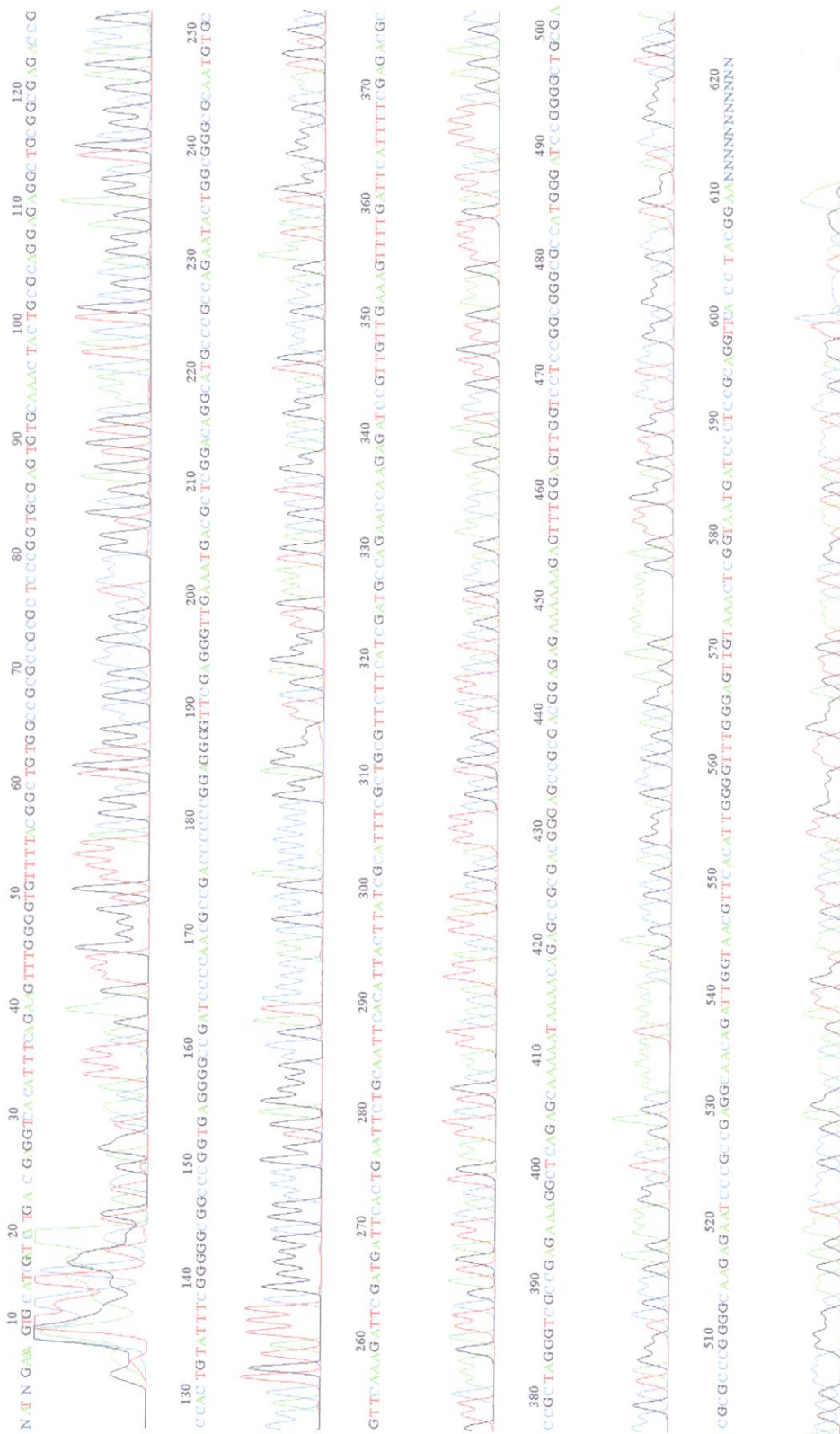




File: 080805-02\_K20\_MTI-ITS4.ab1 Run Ended: 2008/8/6 8:10:40 Signal G:1333 A:1248 C:1775 T:890  
Sample: MTI\_ITS4 Lane: 70 Base spacing: 13.65 934 bases in 11381 scans Page 1 of 2



Anexo 14. Resultados de secuenciación de la cepa SG en ITS1



Anexo 15. Resultados de secuenciación de la cepa SG en ITS1





LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS

**NOMBRE DEL SOLICITANTE:** SRTA. MAYRA RONQUILLO  
**NOMBRE DE LA HACIENDA:** QUIROPLAMA  
**IDENTIFICACION MUESTRA:** COMUNA DOS DE AGOSTO  
**FECHA DE ENTREGA:** 06-oct-08

ANALISIS DE TEXTURA

RESULTADOS :

No. DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN		TEXTURA	
			%	
3224	LOTE 3 SECTOR 7	ARENA	44,80	FRANCO
		ARCILLA	5,20	ARENOSO
		LIMO	46,00	

ING. ELSA BURBANO  
LAB. QUÍMICO



Anexo 17. Reporte de análisis de suelo al inicio de la investigación.



**INIAP**  
INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE  
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

**ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"**  
**LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS**  
Km. 14,1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340  
Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693



GOBIERNO DE SANTA CATALINA  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

**REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS**

<p><b>DATOS DEL PROPIETARIO</b></p> <p>Nombre : VICTOR QUIROLA          Dirección : SANTO DOMINGO          Ciudad :          Teléfono :          Fax :</p>	<p><b>DATOS DE LA PROPIEDAD</b></p> <p>Nombre : QUIROPALMA          Provincia : SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS          Cantón : SANTO DOMINGO          Parroquia :          Ubicación : <b>INVAEXPO</b></p>	<p><b>PARA USO DEL LABORATORIO</b></p> <p>Cultivo Actual : PALMITO          Fecha de Muestreo : 17/01/2008          Fecha de Ingreso : 18/01/2008          Fecha de Salida : 24/01/2008</p>
--	--	---

N° Muestr. Laborat.	Identificación del Lote	pH	ppm			meq/100ml			ppm				
			NH4	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B
68150	LOTE 3 SECTOR 7 A	6,0 LAc	24,00 B	40,00 A	4,40 M	0,83 A	9,80 A	1,30 B	5,0 M	7,6 A	239,0 A	3,4 B	0,60 A
68151	LOTE 3 SECTOR 7 B	5,9 LAc	49,00 A	37,00 A	4,50 M	0,82 A	9,60 A	1,30 B	5,2 M	7,6 A	245,0 A	3,3 B	0,74 A

**INTERPRETACION**

pH		Elementos	
Ac = Acido	N = Neutro	B = Bajo	M = Medio
LAc = Liger. Acido	LAl = Liger. Alcalino	A = Alto	T = Tóxico (Borro)
PN = Prac. Neutro	AI = Alcalino		
RC = Requieren Cal			

**METODOLOGIA USADA**

pH = Suelo: agua (1:2,5) P K Ca Mg = Olsen Modificado  
 S, B = Fosfato de Calcio Cu Fe Mn Zn = Olsen Modificado  
 B = Curcumina

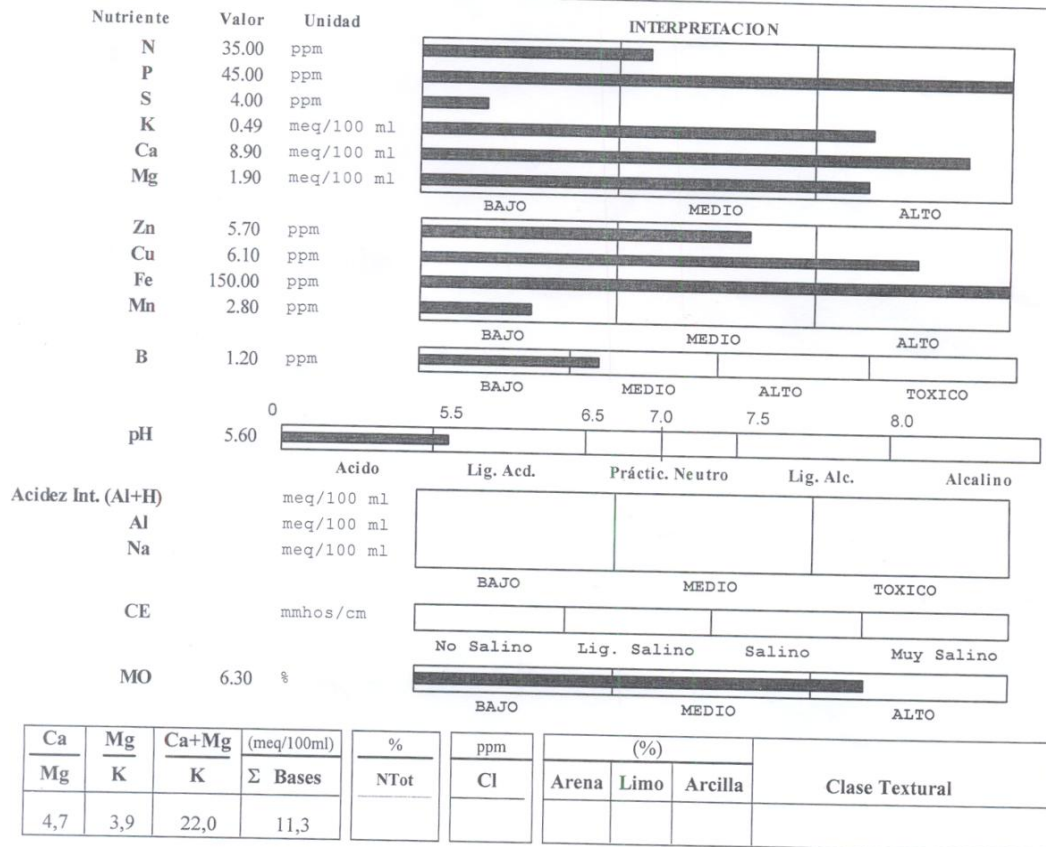
  
 RESPONSABLE LABORATORIO

  
 LABORATORISTA

Anexo 18. Reporte de análisis de suelo al final de la investigación.

**REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS**

<p style="text-align: center;"><b>DATOS DEL PROPIETARIO</b></p> <p>Nombre : VICTOR QUIROLA        Dirección : LOS RIOS        Ciudad :        Teléfono :        Fax :</p>	<p style="text-align: center;"><b>DATOS DE LA PROPIEDAD</b></p> <p>Nombre : I N A E X P O        Provincia : LOS RIOS        Cantón : QUEVEDO        Parroquia : COMUNA 2 DE AGOSTO        Ubicación : I N A E X P O SRTA. MONCAYO</p>
<p style="text-align: center;"><b>DATOS DEL LOTE</b></p> <p>Cultivo Actual : PALMITO        Cultivo Anterior : PALMITO        Fertilización Ant. :        Superficie :        Identificación : LOTE 3 SECTOR 7</p>	<p style="text-align: center;"><b>PARA USO DEL LABORATORIO</b></p> <p>Nº Reporte : 7.884        Nº Muestra Lab. : 69294 ✓        Fecha de Muestreo : 11/08/2008        Fecha de Ingreso : 15/08/2008        Fecha de Salida : 21/08/2008</p>



*[Signature]*  
 RESPONSABLE LABORATORIO

*[Signature]*  
 LABORATORISTA

Anexo 19. Reporte de análisis foliares al inicio de la investigación.



## ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"

LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS

Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340

Quito- Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693



### REPORTE DE ANALISIS FOLIARES

#### DATOS DEL PROPIETARIO

Nombre : VICTOR QUIROLA  
 Dirección : SANTO DOMINGO  
 Ciudad :  
 Teléfono :  
 Fax :

#### DATOS DE LA PROPIEDAD

Nombre : QUIROPALMA  
 Provincia : SANTO DOMINGO  
 Cantón : SANTO DOMINGO  
 Parroquia : SRTA. JESSICA MONCAYO  
 Ubicación : I N A E X P O

#### DATOS DEL LOTE

Cultivo : PALMITO  
 Área :  
 Edad del Cultivo :  
 Identificación : LOTE 3 SECTOR 7

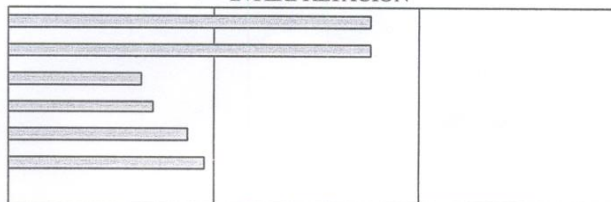
#### PARA USO DEL LABORATORIO

Nº Reporte : 4.402  
 Nº Muestra Lab. : 11824  
 Fecha de Muestreo : 17/01/2008  
 Fecha de Ingreso : 18/01/2008  
 Fecha de Salida : 23/01/2008

#### Elemento Contenido (%)

N 3.27  
 P 0.22  
 K 0.84  
 Ca 0.70  
 Mg 0.20  
 S 0.20  
 Cl

#### INTERPRETACION



BAJO

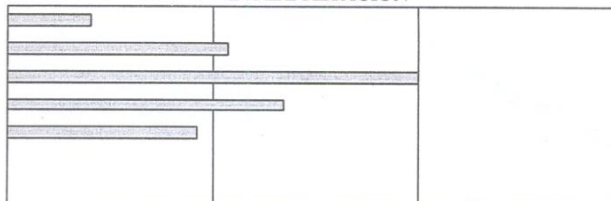
SUFICIENTE

ALTO

#### Elemento Contenido (ppm)

B 7.74  
 Zn 33.10  
 Cu 10.00  
 Fe 168.10  
 Mn 55.30  
 Mo  
 Na

#### INTERPRETACION



BAJO

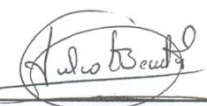
SUFICIENTE

ALTO

Elemento	Nivel Adecuado (%)
N	2,50 - 3,50
P	0,12 - 0,25
K	1,30 - 2,50
Ca	1,00 - 2,00
Mg	0,23 - 0,30
S	0,21 - 0,40
Cl	-

Elemento	Nivel Adecuado (ppm)
B	19,0 - 30,0
Zn	20,0 - 200,0
Cu	6,0 - 10,0
Fe	100,0 - 300,0
Mn	60,0 - 150,0
Mo	-
Na	-

  
 RESPONSABLE LABORATORIO

  
 LABORATORISTA

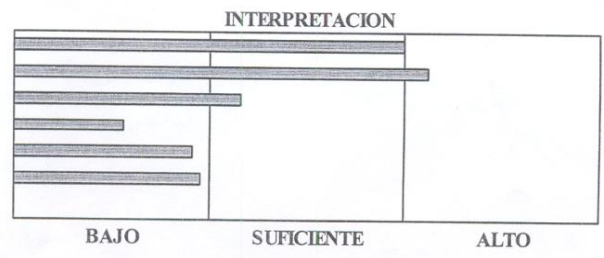
Anexo 20. Reporte de análisis foliar al final de la investigación.

**REPORTE DE ANALISIS FOLIARES**

<p style="text-align: center;"><b>DATOS DEL PROPIETARIO</b></p> <p>Nombre : VICTOR QUIROLA Dirección : LOS RIOS Ciudad : Teléfono : Fax :</p>	<p style="text-align: center;"><b>DATOS DE LA PROPIEDAD</b></p> <p>Nombre : QUIROPALMA Provincia : LOS RIOS Cantón : QUEVEDO Parroquia : COMUNA 2 DE AGOSTO Ubicación : IN A E X P O SRTA. MONCAYO</p>
<p style="text-align: center;"><b>DATOS DEL LOTE</b></p> <p>Cultivo : PALMITO Area : Edad del Cultivo : Identificación : LOTE 3 SECTOR 7 5 AÑOS</p>	<p style="text-align: center;"><b>PARA USO DEL LABORATORIO</b></p> <p>Nº Reporte : 5.006 Nº Muestra Lab. : 12416 Fecha de Muestreo : 11/08/2008 Fecha de Ingreso : 15/08/2008 Fecha de Salida : 21/08/2008</p>

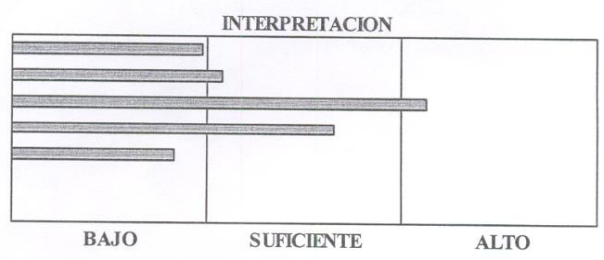
**Elemento Contenido (%)**

N	3.50
P	0.28
K	1.49
Ca	0.56
Mg	0.21
S	0.20
Cl	



**Elemento Contenido (ppm)**

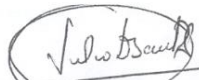
B	18.60
Zn	34.10
Cu	11.30
Fe	230.40
Mn	50.00
Mo	
Na	



Elemento	Nivel Adecuado (%)
N	2,50 - 3,50
P	0,12 - 0,25
K	1,30 - 2,50
Ca	1,00 - 2,00
Mg	0,23 - 0,30
S	0,21 - 0,40
Cl	-

Elemento	Nivel Adecuado (ppm)
B	19,0 - 30,0
Zn	20,0 - 200,0
Cu	6,0 - 10,0
Fe	100,0 - 300,0
Mn	60,0 - 150,0
Mo	-
Na	-

  
RESPONSABLE LABORATORIO

  
LABORATORISTA

Anexo 21. Reporte de análisis microbiológico del suelo al finalizar la investigación.





## MICROBIOLOGÍA

### 1 INFORME DE RESULTADOS

NOMBRE DEL CLIENTE: VICTOR QUIROLA  
EMPRESA: QUIROPALMA  
DIRECCIÓN DEL CLIENTE: COMUNA 2 DE AGOSTO KM 37 VIA A QUEVEDO  
FECHA DE INFORME: 2008-08-18

#### ~~RECuento DE MICROORGANISMOS E IDENTIFICACION~~

IDENTIFICACION: LOTE 3 SECTOR 7 PALMITO

#### RESULTADOS:

##### MICROORGANISMOS SAPROFITOS

###### HONGOS

- *Penicillium spp.* 16 x 10<sup>3</sup> esporas / gramo

##### MICROORGANISMOS BENEFICOS

###### BACTERIAS

- *Bacillus spp.* 14 x 10<sup>5</sup> UFC / gramo

###### HONGOS

- *Trichoderma spp.* 19 x 10<sup>3</sup> esporas / gramo

##### MICROORGANISMOS FITOPATOGENOS

- *Erwinia spp.* 15 x 10<sup>2</sup> UFC / gramo

LIC. KARLA GARCES

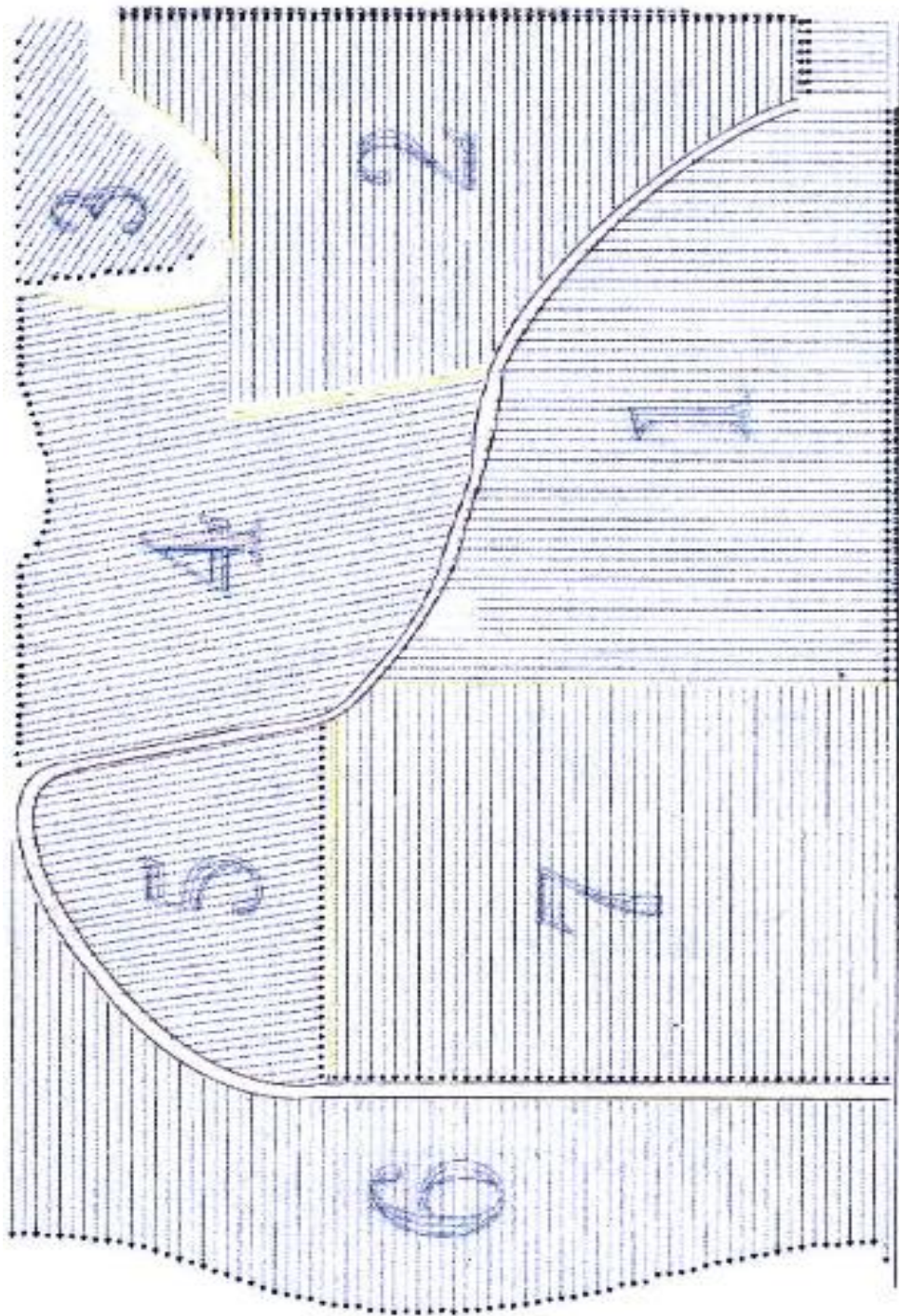
**MICROBIOLOGA AGRODIAGNOSTIC**

Anexo 22. Figura del área experimental. Lote 3 sector 7.

Coordenadas UTM

Este: 668,703.61

Norte: 9.945.640.88



Anexo 23. Fotos con sintomatología de la enfermedad pudrición de flecha del palmito. (1) Hoja flecha con moho blanco, micelio del hongo y cuerpos fructíferos, sintomatología propia de *Fusarium*; (2) Sintomatología causada por *Phytophthora* y *Erwinia* sp.; (3) Sintomatología causada por *Fusarium* + *Erwinia* daño en el área basal del palmito, con posterior pudrición acuosa.

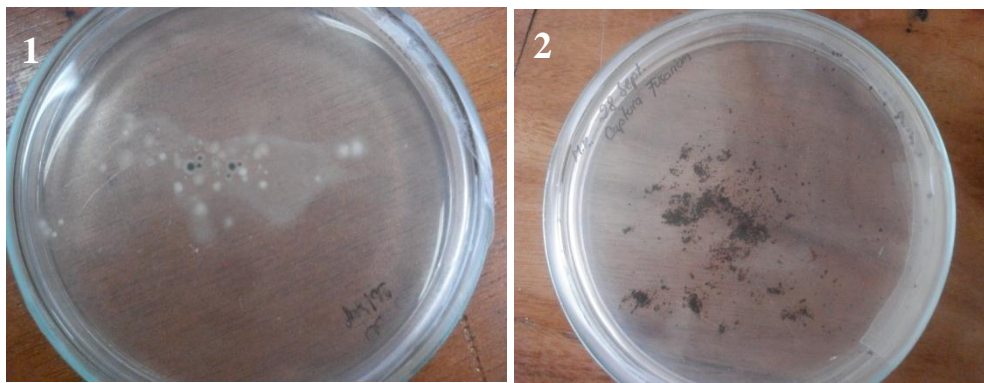


Anexo 24. Fotos del patógenos causantes enfermedad. (1) Corte de secciones de tejido sintomático; (2) siembra; (3) incubación; (4) purificación.

aislamiento de de la

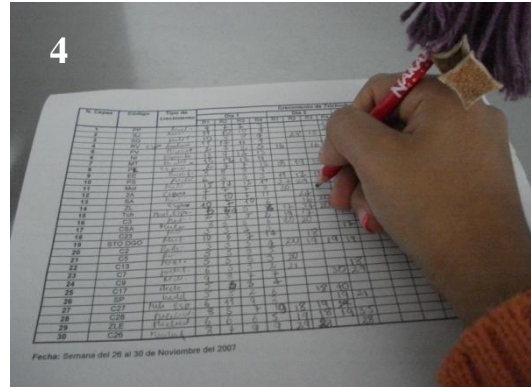


Anexo 25. Fotos del proceso de captura y aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma*. (1) Siembra en dilución; (3) Siembra en grumos.



Anexo 26. Fotos del ensayo de crecimiento radial de cepas nativas de *Trichoderma*; (1) Siembra en la cámara de flujo laminar; (2) Trazado de la línea de medición; (3) Medición en mm por día diaria de crecimiento de micelio; (4) toma de datos.





Anexo 27. Fotos del Ensayo de determinación del antagonismo. (1) Siembra del patógeno y del agente de control biológico; (2) Incubación; (3) Tratamientos y repeticiones del ensayo; (4) Medición del crecimiento de patógeno y antagonista; (5) Control biológico de los patógenos.



