

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
IASA I**

**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma sp. in vitro*,
PARA EL CONTROL DE PROBLEMAS RADÍCULARES
EN FLORES DE VERANO.
CHECA – ECUADOR**

Previa a la obtención del Título de:

Ingeniero Agropecuario

ELABORADO POR:

LUISA PAULINA CHOLANGO MARTÍNEZ

Sangolquí, 19 de Mayo del 2009

RESUMEN

Los fungicidas utilizados para el control de enfermedades radiculares en flores de verano causan problemas ambientales y de toxicidad al suelo, por esto se deben utilizar otros métodos de manejo de los patógenos causantes de enfermedades en plantaciones florícolas. El objetivo de esta investigación fue recuperar del suelo *Trichoderma* como agente de biocontrol. Se aislaron siete cepas de *Trichoderma* spp, en la finca FLORAGRO dedicada a la producción de flores de verano, en pruebas *in vitro* se seleccionaron las mejores cepas de *Trichoderma* por su velocidad de crecimiento y la capacidad de esporulación. Los patógenos radiculares aislados fueron *Fusarium* spp. y *Phytophthora* sp. con los cuales se hicieron pruebas de antagonismo; de esta manera, se identificó la agresividad y el comportamiento de las siete cepas con cada uno de los patógenos; también se evaluó la tolerancia de las cepas frente a los fungicidas utilizados en finca (Dithane, Captan, Maneb, Score, Daconil y Carbendazim) empleados en tres dosis. El fungicida que inhibió el desarrollo de *Trichoderma* fue Score mientras que Dithane y Maneb permitieron un mejor desarrollo. Dos cepas de *Trichoderma* fueron seleccionadas, por su alta capacidad de crecimiento y producción de conidias, identificadas como *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride*. Estas fueron sometidas a pruebas de multiplicación masiva utilizando ocho sustratos (acículas de pino, arrocillo, avena, trigo, maíz, kikuyo, soya y fibra de coco) evaluándose su crecimiento conidial y su viabilidad durante tres meses. El mejor sustrato para la producción masiva fue la avena con una concentración de $1,3 \times 10^9$ ufc/g en el primer mes y $3,3 \times 10^8$ ufc/g a los tres meses.

SUMMARY

The fungicides used to control Summer Flowers's root diseases, produce severe environmental problems and soil toxicity, for this reason, it is important to developed alternative methods to control soilborn pathogens. The objective of this work was to recover *Trichoderma's* strains that could be used as biological control agents. Seven *Trichoderma's* strains were isolated from FLORAGRO's farm. These strains were evaluated through several antagonism trials by measuring their radial growth and sporulation capacity. The root disease pathogens isolated from soil, were *Fusarium* spp. and *Phytophthora* sp. Bioassays of seven *Trichoderma* spp. strains were carried out to determine the antagonistic effect they had on both pathogens. The parameters evaluated were their aggressiveness and capacity to colonize the pathogens.

Another objective of this investigation was to evaluate the sensitivity *Trichoderma* had to the fungicides used in FLORAGRO's farm (Dithane, Captan, Maneb, Score, Daconil and Carbendazim). This evaluation included as a statistical variable, the application of three different doses. The fungicide that best inhibited *Trichoderma's* strains growth was Score, contrary to what happened with Dithane and Maneb.

The best strains selected were *Trichoderma koningii* and *Trichoderma atroviride*. These strains showed the highest antagonistic effect on *Phytophthora* and *Fusarium* by sporulating and invading their mycelium. *Trichoderma's* capacity to produce spores was evaluated in eight substrates (rice, oat, wheat, corn, soybean, coconut fiber, kikuyu grass and pine needles) used for biomass production. The spore concentrations and the spore viability were evaluated during three months. The best substrate for the *Trichoderma* biomass production was oat, with concentrations of $1,3 \times 10^9$ ufc/g in the first month and $3,3 \times 10^8$ ufc/g in the third month.

CERTIFICACION

Ing. Elizabeth Urbano

Ing. Abraham Oleas

Certifican:

Que el trabajo titulado "**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma sp. in vitro*, PARA EL CONTROL DE PROBLEMAS RADÍCULARES EN FLORES DE VERANO**" **CHECA - ECUADOR**, realizado por **LUISA PAULINA CHOLANGO MARTÍNEZ**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a su contenido científico y práctico se recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de 1 documento empastado y 1 disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Luisa Paulina Cholango Martínez que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 19 de Mayo del 2009

Ing. Máster Elizabeth Urbano

DIRECTOR

Ing. Msc. Abraham Oleas.

CODIRECTOR

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

LUISA PAULINA CHOLANGO MARTÍNEZ

Declaro que:

El proyecto de grado denominado "**SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma sp. in vitro*, PARA EL CONTROL DE PROBLEMAS RADÍCULARES EN FLORES DE VERANO**" CHECA - ECUADOR, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 19 de Mayo del 2009

Luisa Paulina Cholango Martínez

AUTORIZACIÓN

Yo, LUISA PAULINA CHOLANGO MARTÍNEZ

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma sp. in vitro*, PARA EL CONTROL DE PROBLEMAS RADÍCULARES EN FLORES DE VERANO. CHECA – ECUADOR**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 19 de Mayo del 2009

Luisa Paulina Cholango Martínez

DEDICATORIA

A mi querida madre, mujer noble, trabajadora, perseverante y alegre quien me dio el regalo más grande, la vida.

A mi querido padre, mi amigo y compañero de tertulia, mi apoyo y fortaleza, quien guía siempre mi camino.

Con cariño Luisa Paulina.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por todo lo lindo que me ha brindado.

A mi linda familia mi gran tesoro quienes son la base de mi ser, por siempre apoyarme en todo momento y por estar conmigo en los éxitos y adversidades, a mis papis Luis y Rebeca por su apoyo y consejos ya que gracias a su sabiduría para educarme he llegado a esta parte del camino, a mis hermanas por su paciencia y alegría, Yasodhara, Helen, Rebeca y su esposo Freddy; y a la luz de nuestra casa Micaela, Camila y Federico.

Al Ingeniero Abraham Oleas por ser una parte fundamental en la realización de este trabajo, por todos sus conocimientos impartidos y por todos esos momentos agradables en el transcurso de este tiempo, por ser un buen profesional y sobre todo un excelente ser humano.

A la finca FLORAGRO por su apertura para la realización de este proyecto de investigación científica.

A la Ingeniera Elizabeth Urbano por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación y por su colaboración.

Al Licenciado Marco Taco, por su absoluta colaboración.

A mis grandes amigos Paty, Diana y Nicolás de quienes aprendí mucho, las personas con las cuales viví esta linda etapa, Alejita y Mechitas amigas y compañeras de laboratorio, y a todo mi lindo curso.

La vida es una bendición, cada persona que encontramos en nuestro camino forman parte de nuestra vida, a pesar, de tan solo compartir minutos, segundos u horas y a cada una les agradezco por ser parte de mi la mía.

Luisa Paulina

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Agricultura orgánica.....	5
3.1.1. Generalidades.....	5
3.2. Agentes Patógenos frecuentes en los cultivos de flores de verano.....	6
3.2.1. Generalidades.....	6
3.3. Control Biológico Microbiano.....	8
3.3.1. Fundamentos de Control Biológico Microbiano.....	9
3.3.2. Control Biológico Microbiano en flores de verano.....	11
3.4. <i>Trichoderma</i> spp.....	12
3.4.1. Generalidades.....	12
3.4.2. Clasificación taxonómica.....	13
3.4.3. Condiciones de crecimiento.....	14
3.4.4. Características microscópicas.....	16
3.4.5. Características macroscópicas.....	17
3.4.6. <i>Trichoderma</i> spp. como controlador biológico.....	18
3.4.6.1. Modo de acción.....	18
3.4.6.1.1. Biocontrol por competencia.....	20

3.4.7. Compatibilidad con plaguicidas.....	24
3.4.7.1. Productos químicos para el control de enfermedades radiculares en flores de verano.....	25
3.5. Multiplicación Masiva de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. Muestreo en campo.....	28
4.1.1. Descripción del lugar.....	28
4.1.2. Materiales para muestreo en campo.....	28
4.1.3. Métodos.....	29
4.1.3.1. Recolección de muestras de suelo.....	29
4.1.3.2. Recolección de plantas con síntomas de problemas radiculares.....	29
4.2. Trabajo en Laboratorio.....	29
4.2.1. Descripción del lugar.....	29
4.2.2. Materiales de laboratorio.....	30
4.2.3. Métodos.....	31
4.2.3.1. Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	31
4.2.3.2. Purificación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
4.2.3.3. Conservación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
4.2.3.4. Aislamiento de Patógenos que causan problemas radiculares en flores de verano.....	33
4.2.3.4.1. Identificación de microorganismos aislados.....	35

4.2.3.5. Pruebas de Evaluación de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	35
4.2.3.6. Pruebas de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. frente a patógenos causantes de enfermedades radicales en flores de verano.....	36
4.2.3.7. Pruebas de tolerancia de <i>Trichoderma</i> sp. a productos químicos.....	37
4.2.3.8. Multiplicación masiva y Viabilidad de <i>Trichoderma</i> spp.....	37
4.2.3.8.1. Determinación de la concentración de esporas de <i>Trichoderma</i> sp. desarrolladas en los diferentes sustratos.....	38
4.2.3.8.1.1. Método de Neubauer.....	38
4.2.3.8.1.2. Método de Plaqueo.....	39
4.2.4. Diseño experimental.....	39
4.2.4.1. Prueba de Evaluación de crecimiento de <i>Trichoderma</i>	39
4.2.4.2. Pruebas de antagonismo <i>Trichoderma</i> sp. vs a patógenos causantes de enfermedades radicales en flores de verano.....	41
4.2.4.3. Pruebas de tolerancia de <i>Trichoderma</i> sp. a productos químicos.....	42
4.2.4.4. Multiplicación masiva y viabilidad de <i>Trichoderma</i> sp.....	44
4.2.4.6. Análisis Económico.....	45

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1. Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	47
5.2. Crecimiento diametral de siete cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	48
5.3. Aislamiento de patógenos causantes de problemas radicales en flores de verano.....	53
5.3.1. Caracterización morfológica de patógenos.....	53
5.4. Pruebas de antagonismo.....	56
5.4.1. Prueba de antagonismo <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Fusarium</i> spp.....	56
5.4.1.1. Comportamiento de <i>Fusarium</i> spp. frente al antagonista <i>Trichoderma</i> spp.....	63
5.4.2. Prueba de antagonismo <i>Trichoderma</i> spp. contra el patógeno <i>Phytophthora</i> sp.....	70
5.4.2.1. Crecimiento del patógeno <i>Phytophthora</i> sp. frente a 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	74
5.5. Evaluación de efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> en función de la Escala de BELL.....	78
5.6. Pruebas de tolerancia de cepas de <i>Trichoderma</i> sp., a químicos.....	80
5.6.1. Crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> en prueba de tolerancia a 6 productos químicos.....	82
5.7. Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i>	100
5.8. Multiplicación masiva de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en ocho sustratos sólidos.....	101
5.8.1. Evaluación por el método de Neubauer.....	101

XIII

5.8.2. Evaluación por el método de Plaqueo.....	111
5.9. Comparación entre dos métodos de evaluación de multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp.....	118
5.10. Análisis de costos.....	119
VI. CONCLUSIONES.....	120
VII. RECOMENDACIONES.....	122
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	123
IX. ANEXOS.....	128

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Productos químicos utilizados en pruebas de susceptibilidad.....	26
CUADRO 2. Identificación de patógenos por especie de cultivo.....	34
CUADRO 3. Escala de clases de Bell <i>et al.</i> (1982)	36
CUADRO 4. Productos químicos utilizados en pruebas de susceptibilidad.....	37
CUADRO 5. Procedencia de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp., aisladas de suelo cultivado con diferentes flores de verano.....	47
CUADRO 6. Análisis de varianza para el crecimiento diametral de siete cepas de <i>Trichoderma</i> sp.....	49
CUADRO 7. Prueba de Duncan al 5% para la evaluación del crecimiento diametral de cepas de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> sp.....	50
CUADRO 8. Crecimiento diametral de siete cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en dos direcciones.....	52
CUADRO 9. Procedencia de patógenos aislados de lesiones radiculares diferentes especies de flores de verano.....	53
CUADRO 10. Caracterización de 5 cepas de <i>Fusarium</i> spp., aisladas de plantas que presentaron problemas radiculares en flores de verano.	54
CUADRO 11. Análisis de Varianza para el crecimiento de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a 5 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	58
CUADRO 12. Prueba de Duncan al 5% para el crecimiento radial en dirección al patógeno de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a 5 cepas del patógeno <i>Fusarium</i> spp.....	61
CUADRO 13. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento radial de <i>Trichoderma</i> spp. en dos direcciones, dirección al patógeno (a) y su perpendicular (b).....	62
CUADRO 14. Análisis de varianza para la capacidad de crecimiento del patógeno <i>Fusarium</i> sp. frente a 7 cepas de <i>Trichoderma</i> sp.....	64
CUADRO 15. Medidas del crecimiento radial de 5 cepas de <i>Fusarium</i> spp. frente a 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	66
CUADRO 16. Prueba de Duncan al 5% para el crecimiento radial en dirección al patógeno de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fusarium</i> spp.....	67
CUADRO 17. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento radial de <i>Fusarium</i> spp. en dos direcciones, dirección al antagonista (a) y su perpendicular (b).....	69

CUADRO 18. Análisis de varianza para el crecimiento radial en dirección al patógeno, de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente <i>Phytophthora</i> spp.....	71
CUADRO 19. Crecimiento radial de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en dirección a <i>Phytophthora</i> spp. Duncan 5%.....	72
CUADRO 20. Tratamientos para el crecimiento radial de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en dos direcciones, dirección al patógeno (a) y su perpendicular (b).....	73
CUADRO 21. Análisis de varianza para el crecimiento radial del patógeno <i>Phytophthora</i> sp. en dirección a siete cepas del antagonista <i>Trichoderma</i> spp.....	75
CUADRO 22. Prueba de Duncan al 5% para el crecimiento radial del patógeno <i>Phytophthora</i> sp. en dirección a 7 cepas del antagonista <i>Trichoderma</i> spp.....	76
CUADRO 23. Tratamientos para el crecimiento radial de <i>Phytophthora</i> sp. en dos direcciones, dirección al antagonista (a) y su perpendicular (b).....	76
CUADRO 24. Análisis de Varianza para tolerancia de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a 6 productos químicos.....	81
CUADRO 25. Promedios del crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp., analizadas mediante la prueba de Duncan al 5%.....	82
CUADRO 26. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> sp., en la prueba de tolerancia a 6 productos químicos.....	85
CUADRO 27. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Captan 80.....	87
CUADRO 28. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Dithane FMB.....	88
CUADRO 29. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Maneb.....	89
CUADRO 30. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Score.....	90
CUADRO 31. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Daconil.....	92
CUADRO 32. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Carbendazim.....	93
CUADRO 33. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de siete cepas de <i>Trichoderma</i> sp., en la prueba de tolerancia a Captan.	94
CUADRO 34. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de <i>Trichoderma</i> sp., en prueba de tolerancia a Dithane.....	95

CUADRO 35. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de <i>Trichoderma</i> sp., en la prueba de tolerancia a Maneb.....	95
CUADRO 36. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de <i>Trichoderma</i> sp., en la prueba de tolerancia a Score.....	96
CUADRO 37. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de <i>Trichoderma</i> sp., en la prueba de tolerancia a Daconil.....	97
CUADRO 38. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de <i>Trichoderma</i> sp., en la prueba de tolerancia a Carbendazim.....	98
CUADRO 39. Análisis de Varianza para la multiplicación masiva de tres especies de <i>Trichoderma</i> spp. en ocho sustratos.....	102
CUADRO 40. Prueba de Duncan al 5% para la multiplicación masiva de tres especies de <i>Trichoderma</i> spp.....	103
CUADRO 41. Evaluación de 8 sustratos para la multiplicación masiva 2 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	105
CUADRO 42. Efecto del crecimiento de 3 especies de <i>Trichoderma</i> en ocho sustratos.....	109
CUADRO 43. Análisis de Varianza para la multiplicación masiva de tres especies de <i>Trichoderma</i> spp. en ocho sustratos.....	112
CUADRO 44. Prueba de Duncan al 5% para la multiplicación masiva de tres especies de <i>Trichoderma</i> spp. en ocho sustratos sólidos.	113
CUADRO 45. Evaluación de 8 sustratos para la multiplicación masiva 2 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	114
CUADRO 46. Efecto del crecimiento de 3 especies de <i>Trichoderma</i> en ocho sustratos.....	117
CUADRO 47. Comparación de dos métodos de evaluación de ufc/g de <i>Trichoderma</i> spp. en ocho sustratos.....	118
CUADRO 48. Análisis de costos para sustratos utilizados en multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp.....	119
CUADRO 49. Análisis de costos para multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp. en sustrato de avena	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas.....	48
Figura 2. Prueba de velocidad de crecimiento <i>in vitro</i>	49
Figura 3. Crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	51
Figura 4. Esquema de la toma de datos en la evaluación de crecimiento.....	52
Figura 5. Patógenos encontrados en lesiones radiculares de especies de flores de verano.....	55
Figura 6. Dirección del crecimiento radial tomada para las evaluaciones.....	57
Figura 7. Prueba de antagonismo <i>Fusarium</i> sp. vs <i>Trichoderma</i>	59
Figura 8. Prueba de antagonismo <i>Fusarium</i> spp. vs <i>Trichoderma</i> spp.....	60
Figura 9. Direcciones de toma de datos para <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp..	61
Figura 10. Crecimiento de 5 cepas del patógeno <i>Fusarium</i> spp.....	66
Figura 11. Proceso de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fusarium</i> spp.....	68
Figura 12. Crecimiento del patógeno <i>Phytophthora</i> sp. frente a <i>Trichoderma</i> spp.....	74
Figura 13. Invasión de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Phytophthora</i> sp.....	78
Figura 14. Capacidad antagónica de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp., de acuerdo a la escala establecida por Bell <i>et al</i> (1982)	79
Figura 15. Escala 1 y 2 establecida por Bell <i>et al</i> (1982).....	79
Figura 16. Crecimiento de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp., frente a 6 productos químicos.....	83
Figura 17. Efecto de 6 productos químicos en el desarrollo diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	86
Figura 18. Efecto de 6 productos químicos en el desarrollo diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	86
Figura 19. Efecto de la aplicación de Captan en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	88

Figura 20. Efecto de la aplicación de Dithane FMB en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	89
Figura 21. Efecto de la aplicación de Maneb en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	90
Figura 22. Efecto de la aplicación de Score en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	91
Figura 23. Efecto de la aplicación de Daconil en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	92
Figura 24. Efecto de la aplicación de Derosal en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	93
Figura 25. Efecto de la aplicación de 6 productos químicos en el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	99
Figura 26. Identificación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp., promisorias.	100
Figura 27. Dinámica de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en ufc/g por el método de Neubauer.....	104
Figura 28. Multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp. en ochos sustratos sólidos evaluados por el método de Neubauer.....	107
Figura 29. Multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp. en función del tiempo, evaluadas por el método de Neubauer.....	108
Figura 30. Multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp en sustratos de avena y fibra de coco.....	110
Figura 31. Dinámica de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en ufc/g por el método de plaqueo.....	113
Figura 32. Multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp. en ochos sustratos sólidos evaluados por el método de plaqueo.....	115
Figura 33. Multiplicación masiva de <i>Trichoderma</i> spp. en función del tiempo, evaluadas por el método de plaqueo.....	116
Figura 34. Comparación de dos métodos de evaluación (Plaqueo y Neubauer) de ufc/g del antagonista <i>Trichoderma</i> spp.....	119

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Medios de Cultivos utilizados para el asilamiento de Hongos.....	128
ANEXO 2. Efecto de 6 productos químicos en el crecimiento diametral de 7 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	128
ANEXO 3. Liofilización de <i>Trichoderma koningii</i> y <i>Trichoderma atroviride</i> .	130

NOMENCLATURA UTILIZADA

AMCB	Agente Microbiano de Control Biológico
cm	centímetro.
°C	Centígrados.
g	gramo
Kg	kilogramo.
l	litro.
ml	mililitro
msnm.	metros sobre el nivel del mar.
PDA	Agar Papa Dextrosa
ufc	unidades formadoras de colonias.
μl	microlitro.

I. INTRODUCCIÓN

La producción florícola en el país es de suma importancia, ya que aparece como un sector que aporta significativamente con puestos de trabajo, alrededor de 50.000 directos y otros 50.000 indirectos, generados por la producción de servicios. Así mismo en su comercialización se obtiene divisas. De tal manera que empleo e ingresos son resultados destacados de su presencia en la economía ecuatoriana, a la vez que crea polos de desarrollo regional, si bien se trata de productos primarios, permite ampliar la oferta al mercado mundial diversificando la producción agrícola del Ecuador.

En la periferia de plantaciones productoras de flores de verano se han desarrollado verdaderos polos regionales económicos en donde crecen los servicios, diversos centros de comercialización creando diferentes tipos de estructuras económicas y productivas.

El factor de riesgo prevalente en la producción florícola, aunque por cierto no el único, es el uso intensivo de fungicidas y fumigantes, como el bromuro de metilo, ya que esta es la causa de un alto nivel de contaminación ambiental y toxicidad, esto ha motivado la búsqueda de otros métodos no perjudiciales para combatir los patógenos de plantas, en los que se encuentran varias especies de organismos parecidos a hongos y hongos de los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*, entre otros, los mismos que causan serios problemas de importancia económica en el sector florícola.

Los controles más efectivos se han obtenido con el empleo de fungicidas químicos, método que presenta desventajas económicas y ecológicas, por los costosos y su agresividad al medio ambiente. Por esta razón es necesario introducir otras medidas de control que al combinarse con los fungicidas químicos disminuyan el efecto negativo al ambiente; es decir integrar diversas opciones de manejo.

Una de las alternativas más positivas y que han dado una respuesta efectiva y concreta, para la protección de los cultivos atacados por patógenos fúngicos del suelo, es la utilización de microorganismos antagónicos competitivos como las especies del género *Trichoderma*.

Trichoderma sp., es un modelo excepcional para el estudio del biocontrol, por tratarse de un hongo fácilmente cultivable en diferentes medios; de crecimiento rápido en varios sustratos; productor de antibióticos y promotor de crecimiento; atacando a una amplia gama de hongos fitopatógenos (Yáñez, 2003).

Trichoderma es un hongo comúnmente utilizado como agente de biocontrol, con el cual se han conseguido buenos resultados frente algunos patógenos del suelo en condiciones experimentales (Baker & Cook, 1983).

Según (Prokkola, 1992) citado por Stefanova *et al* 1999 menciona que la eficacia del biocontrol realizado por *Trichoderma* está asociada con la producción de antibióticos no volátiles y con otros mecanismos tales como el micoparasitismo, en el cual posee gran importancia, la excreción de quitinasa y proteasas.

Este hongo hiperparásito actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, y micoparasitismo, además produce sustancias promotoras de crecimiento de las plantas (Stefanova, *et al* 1999).

La tendencia actual es desarrollar nuevas alternativas para el manejo a través del uso de agentes de biocontrol. A escala mundial se reconoce un grupo de hongos y bacterias con acción antagónica, donde sobresale la efectividad de *Trichoderma*.

La florícola FLORAGRO consiente del daño ambiental que se está haciendo con las aplicaciones de productos químicos y la toxicidad que día a día éstas causan al suelo, se ha propuesto como meta fundamental usar otras estrategias de manejo de los problemas sanitarios, considerando al control biológico como una de las opciones de mayor viabilidad; en tal virtud, ha creído conveniente la recuperación de agentes de biocontrol eficientes entre ellos *Trichoderma* sp., para más adelante reproducirlos masivamente para su incorporación al campo.

Dada la importancia que representa la disminución del uso de agroquímicos el presente trabajo tuvo como objetivo la selección de cepas de *Trichoderma* sp., *in vitro* para el control de problemas radiculares en flores de verano.

II. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GENERAL

Seleccionar cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro* para el control de problemas radiculares en flores de verano.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar cepas nativas de *Trichoderma* spp. de los diferentes lotes de la finca FLORAGRO.
- Caracterizar morfológicamente las cepas aisladas.
- Evaluar *in vitro* la capacidad de biocontrol de las cepas de *Trichoderma* sp. seleccionadas frente a patógenos causantes problemas radiculares en flores de verano.
- Evaluar el comportamiento de las cepas de *Trichoderma* sp., frente a los plaguicidas más utilizados para el control de enfermedades radiculares de la finca.
- Validar la viabilidad de las cepas en el tiempo.
- Establecer un análisis de costos de la elaboración de métodos artesanales de producción de *Trichoderma* sp.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Agricultura Orgánica

3.1.1 Generalidades

La agricultura orgánica se define como una visión sistemática de la producción agrícola que usa como guía los procesos biológicos de los ecosistemas naturales.

Este tipo de agricultura, propone alimentar los microorganismos del suelo, para que estos a su vez de manera indirecta alimenten a las plantas, esta alimentación se hará mediante la adición al suelo de desechos vegetales reciclados, abonos verdes con énfasis en leguminosas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno, estiércol de animales, desechos orgánicos urbanos compostados, conjuntamente con polvo de rocas minerales, etc.

En la agricultura orgánica o biológica se plantea el uso reducido o la exclusión de insumos, con la correspondiente disminución de los costos de producción, y mejoramiento de los efectos sobre la salud y el ambiente (Martínez, M. 2001).

Por otra parte la agricultura orgánica propone, tanto para el mantenimiento de la vida del suelo, como para el manejo de plagas y enfermedades, la conservación del principio de la biodiversidad a través de la implementación de agroecosistemas altamente diversificados, el uso de plantas repelentes, la asociación y rotación de cultivos, el uso de insectos benéficos (predadores o parasitoides), entomopatógenos (hongos, virus, bacterias, rickettsias), hongos antagonistas, insecticidas y fungicidas

de origen botánico, permitiendo la utilización de algunos productos químicos puros como: azufre, cobre, cal u oligoelementos, de manera que esto contribuya a conservar el equilibrio ecológico, manteniendo la actividad biológica del suelo, fortaleciendo los tejidos de las plantas para que soporten ataques de insectos y patógenos.

3.2. Agentes Patógenos frecuentes en los cultivos de flores de verano

3.2.1. Generalidades

La floricultura constituye una de las principales actividades productivas de nuestro país. Los problemas fitosanitarios afectan el ciclo de vida de las plantas y su calidad comercial y en algunos casos determina el abandono de determinados cultivos. Por tratarse de una actividad que ha crecido y se ha diversificado mucho en cuanto a la variedad de cultivos, han surgido numerosas enfermedades. Dentro de los principales problemas radiculares que afectan los cultivos de flores de verano se mencionan a *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* y *Phytophthora*.

Pythium sp., es el agente causal del ahogamiento de plántulas y pudriciones blandas de la raíz. Esta enfermedad afecta tanto a semillas como plántulas y plantas adultas de casi todos los cultivos. Las plántulas rara vez son destruidas cuando son infectadas por el patógeno, pero muestran lesiones en su tallo y pudriciones en la raíz lo que retrasa considerablemente su crecimiento y reduce su producción (Agrios, 1996).

Rhizoctonia solani es un hongo fitopatógeno que ataca al nivel de la corona, induciendo una pudrición de color café que acaba por marchitar a la planta completamente (Agrios, 1996).

Phytophthora cinnamomi provoca una pudrición del sistema radicular que afecta en primer lugar a las raíces absorbentes más desprotegidas, produciendo una rápida maceración de las mismas afectando finalmente a las raíces gruesas y al cuello de la planta. Las raíces finas aparecen ennegrecidas y blandas o con una coloración negro azulada. A medida que el hongo va invadiendo el sistema radicular los síntomas se van haciendo más extremos. La pudrición alcanza el cuello de la raíz agrietándose la corteza en la base del tronco la misma que se desprende con facilidad, a la vez se observa exudaciones de una sustancia gomosa de color negro característica Mansilla *et al.*, 2000 citado por (Rial C., *et al.*, 2005)

Los daños que ocasionan las heladas en las flores de las plantas, generalmente van seguidos de una infección producida por *Botrytis*, *Alternaria* o *Pseudomonas*; asimismo, es probable que los daños causados por herbicidas vayan acompañados por pudriciones de la raíz ocasionadas por los hongos *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Por último los daños ocasionados por inundaciones suelen ir seguidos de infecciones de la raíz producidas por *Pythium* (Agrios, 1996).

3.3. Control Biológico Microbiano

El control biológico es una práctica agrícola en la cual se aprovecha las características alimenticias de un organismo, en contra de otro que le servirá de alimento y las condiciones naturales de control. El control puede darse intercepas (individuos de un mismo género y especie con algunas modificaciones genéticas) o interespecies (individuos de diferentes especies). Los organismos más comúnmente utilizados en esta práctica son hongos, bacterias, insectos, virus y parasitoides (Martínez, M 2001).

El control biológico microbiano ha ido creciendo poco a poco en los últimos años, en la actualidad se conoce más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus (Claro, 2006).

Los mejores resultados prácticos de control biológico se han obtenido en dos campos: el control de patógenos que sobreviven o se transmiten en el suelo y de aquellos que penetran a heridas de plantas leñosas. Existe un número considerable de preparados comerciales en diferentes países. Últimamente se prioriza la inoculación de las semillas con antagonistas, por que resulta más fácil y barato que la aplicación al suelo (Cook, 1994, citado por Benzing 2001).

Entre los microorganismos de naturaleza fúngica de más amplio uso contra especies de invertebrados plaga en la agricultura están los hifomicetos donde sobresalen *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L.*

muscarium (anteriormente *Verticillium lecanii*), *Pochonia chlamidosporia* (*V. chlamidosporium*), *Paecilomyces* spp. con *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*. Para el control de enfermedades fúngicas y también para nemátodos se encuentra *Trichoderma* spp. donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii* (Claro, 2006).

3.3.1. Fundamentos de Control Biológico Microbiano

Según Nighann y Mukerji (1988) citado por Falconí (2007), control biológico es la manipulación directa o indirecta por parte del hombre de los agentes vivos que de forma natural tienen capacidad de control. Esta manipulación provoca el aumento de su capacidad de ataque sobre las enfermedades. Bajo esta premisa, el control biológico está basado en la utilización de procesos ecológicos y su importancia radica en el impacto beneficioso para la conservación del ambiente y a su vez la factibilidad tecnológica de poder manejar agentes naturales de biocontrol.

Llegar a controlar por medio biológicos a los hongos fitopatógenos, constituye un punto importante dentro del sistema de agricultura sostenible (Miranda, *et al* 1996).

Según Oyarzun (2004) citado por Falconí *et al* (2007), en las últimas dos décadas, a nivel mundial y local, se han realizado esfuerzos para determinar la potencialidad de agentes de control biológico (ACB), recopilando información técnica de base sobre su ecología, biología e interacciones con los patógenos.

Control biológico puede estar definido como la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno mediante la acción natural o de uno o más microorganismos a través de la manipulación del ambiente, hospedero, antagonistas o por introducción masiva de uno o más microorganismos antagonistas (Baker & Cook, 1983).

Los factores que forman parte de un control biológico son el hospedero, patógeno y el ambiente. La población de hospederos que se encuentra en el ambiente natural forma parte siempre de un control biológico ya que esta población se encarga de mantener el balance natural del suelo, manteniendo a los patógenos suprimidos en su mayoría de veces (Baker & Cook, 1982).

Las exudaciones de raíces de las plantas sirven como estímulo y recursos de alimento para los hongos antagonistas y en muchos casos para el patógeno también. Los desechos de tallos, raíces o hojas sirven como un lugar de sobrevivencia para el patógeno y también sirven como un recurso de energía para los microorganismos saprofitos (Baker & Cook, 1982).

Según Martínez (2001), es de suma importancia saber escoger el agente de biocontrol. Varios factores son de importancia al momento de escoger un buen agente de control:

- Habilidad para la búsqueda es primordial para un buen agente biológico, pues de ella depende el que sea o no capaz de encontrar la especie que espera controlar.
- Elevado grado de reproducción para proliferar con rapidez suficientemente superior a la velocidad de reproducción de la plaga.
- Capacidad para operar efectivamente contra la plaga, es decir, sin interferencia con miembros de su misma especie.
- Debe actuar con plenas capacidades bajo las condiciones ambientales a las cuales se libera.
- Baja sensibilidad a la competencia con otros enemigos de la plaga que puedan ser liberados o que se encuentren presentes naturalmente.

3.3.2. Control Biológico Microbiano en flores de verano

Herrera (2005), manifiesta que se puede obtener buenas producciones de “Larkspur” u otras especies de flores de verano, sin la necesidad de aplicar Bromuro de Metilo, Dazomet, o cualquier químico para desinfectar los suelos; aplicando productos orgánicos y con un manejo racional que permita mantener el equilibrio de las poblaciones y la fertilidad en el suelo, se alcanza niveles altos de producción. En este cultivo los lotes en los que se aplicaron como tratamientos Agrolac + *Trichoderma*

spp. de finca, Bihobac + *Trichoderma* spp. de finca, Bocashi, *Trichoderma* spp. de finca, y Dazomet; tuvieron menor incidencia de enfermedades radiculares.

En un trabajo de investigación en campo se determinó, que el mayor peso fresco de la raíz se presentó en plantas tratadas con microorganismos antagonistas, a pesar, que los promedios del número de tallos cosechados bajo el efecto de la presencia o ausencia de antagonistas no fueron significativos estadísticamente, se puede apreciar que se obtuvo un mayor número de tallos cosechados de 60cm ante la presencia de microorganismos antagonistas (Montalvo, 2004).

Moreno (2005), utilizó como antagonista a *T. pseudokoningii* y constató que los bulbos desinfectados con este antagonista, registraron mayores alturas, también verificó que únicamente existe un rango de validación, en la que C1A1 (2 sacos de compost con la aplicación foliar de *T. harzianum*), registró un incremento leve en el número de tallos cosechados.

3.4. *Trichoderma* spp.

3.4.1. Generalidades

Trichoderma es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenece a la subdivisión Deuteromycetes 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. Este hongo se

encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente aquellos que son atacados por otros hongos (Páez, 2006).

3.4.2. Clasificación taxonómica

División 1	MYXOMICOTINA
Subdivisión 4	DEUTEROMYCOTINA
Clase 2	HYPHOMICETES
Orden	<i>Hyphales</i>
Familia	<i>Monilaceae</i>
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>T. harzianum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. viride</i> , entre otras.

(Agrios, G. 1996)

Trichoderma es un hongo filamentoso anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesto por quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Kubicek C. & Harman G., 1998).

El género *Trichoderma* comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente. Presentan micelio septado, conidias generalmente ovaladas, conidioforo hialino no verticilado, fialides singulares o en grupos, conidias unicelulares coloreadas, de rápido desarrollo en medios sintéticos, la colonia se muestra de color verde, básicamente es saprofitico (Rodríguez, 2002) citado por (López, 2007).

La mayoría de cepas de *Trichoderma* no poseen etapa sexual, por lo que producen únicamente esporas asexuales. Sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas cepas, pero no han sido consideradas para propósitos de biocontrol. La etapa sexual cuando está presente, corresponde a *Hypocrea*, que es un hongo Ascomycotina.

Las cepas de *Trichoderma* a menudo son rápidamente identificadas en su género por sus características morfológicas distintivas, que incluye rápido crecimiento, el color de las conidias es verde intenso o blanco y una gran cantidad de ramificaciones, pero de manera diferente una pobre estructura de conidioforos (Gams & Bisett, 1998).

3.4.3. Condiciones de crecimiento

Es un hongo de distribución cosmopolita muy común en suelos, aunque también se encuentra en H₂O crece muy bien en temperaturas que oscilan entre 20°C y 28 °C; se puede obtener un crecimiento dentro de un rango de pH de 2,5 a 9,5, pero preferiblemente se desarrolla a un pH neutro o ácido (5,5). Cuando se encuentra en sitios de buena luz esporula rápidamente y en la obscuridad pierde esta capacidad. Es capaz de utilizar un amplio espectro de fuentes de CO₂ y N y su resistencia a

inhibidores microbianos le permiten colonizar casi todos los tipos de suelo, inclusive ácidos y ricos en M.O (Benítez S. & González, 2003).

(Domsch *et al.*, 1980) citado por (Díaz & Cruz, 2007) menciona que dentro de los factores que afectan el crecimiento de *Trichoderma* se encuentran los de tipo físico como la fototrofia, la mayoría de las especies de este género son fotosensibles, puesto que presentan una mayor esporulación al ser expuestas a luz. Sin embargo, cuando se someten a períodos alternados de luz y oscuridad, se favorece la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos.

Trichoderma es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996) citado por (Agamez E., *et al.* 2008).

Adicionalmente, se ha demostrado que la adición de nitrógeno en forma de sulfato de amonio al medio estimula e incrementa el crecimiento de este hongo, mientras que la adición de nitrógeno como nitrato de calcio genera un efecto supresivo en el crecimiento de *Trichoderma koningii*. (Danielson *et al.*, 1973; Wakelin *et al.*, 1999) citados por (Díaz & Cruz, 2007)

(Gams & Bisett, 1998) mencionan que las colonias de *Trichoderma* crecen rápidamente, inicialmente el micelio es sumergido, con algunas variables, el micelio aéreo enmarañado, lleno de células, algodonoso y transparente o con poco color dependiendo de la cepa y del medio de cultivo utilizado, presenta varios tonos de marrones, amarillo ámbar, rojizo apagado o verde amarillento. Tiene olor a coco o alcanfor la mayoría de veces muy pronunciado o a veces imperceptible es una característica propia del género; la esporulación se presenta de forma plana lisa o abultada formando pústulas compactas, típicos cuerpos verdes o a veces blancos, plomos o cafeses.

3.4.4. Características microscópicas

Las características microscópicas por las que se identifica a *Trichoderma* según (Gams & Bisett, 1998) son:

a) Fialides.- pueden estar dispuestos regularmente en forma de verticilos, en parejas alternadamente o en disposiciones irregulares. El cuerpo de los fialides es una característica de algunas divisiones, así en la división *Pachybasium* los fialides son característicamente pequeños y verticales, mientras que en la división *Longibrachiatum* son alargadas en forma de cilindro, en la mayoría de las cepas las partes terminales de los fialides tienden a ser alargadas y estrechas.

b) Hifas.- pueden ser anchas y rectas o relativamente angostas y flexibles. La punta de los conidioforos en especies de la división *Pachybasium* termina en una elongación la cual podría ser recta ondulada y espiralada.

c) **Conidias.**- existen varias formas de conidias desde globosas, elipsoides, ovoidales y de pequeños cilindros, la parte final en forma estrecha basal y truncada. En general las variaciones de las dimensiones de las conidias en *Trichoderma* no son grandes; sin embargo, las especies que son parecidas pueden ser usualmente diferenciadas en tamaño. La superficie de las conidias aparecen lisas en la mayoría de las especies en observaciones a través de la luz del microscopio, aunque algunas especies tienen conidias aparentemente lisas y con estructuras adicionales. En algunos grupos de *Trichoderma viride* las conidias suelen ser ásperas y rugosas, y las conidias pueden tener proyecciones laterales en forma de balas al exterior en dos especies *T. saturnisporum* y *T. ghanense*. Los pigmentos de las conidias también son características que varían de color desde cuerpos verdes o plomo o café pero estos colores no son frecuentes; en algunas especies maduras las conidias suelen ser de color verde oscuro y otras suelen ser más pálidas.

d) **Clamidosporas.**- son muy comunes en las especies de *Trichoderma* pero estas tienden a ser en forma de globo o elipse, terminal o intercalada, con olores a moho o humedad, de color amarillento o verdoso y de 6-15 μm de diámetro en la mayoría de especies.

3.4.5. Características macroscópicas

Trichoderma harzianum posee colonias de rápido crecimiento en PDA, 7-9 cm diámetro después de 3 días, micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o

raramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8mm en diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas. Pocos aislados producen abundantes cristales amarillos. Exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso (Claro, 2006).

Pigmentaciones amarillo grisáceas son comunes en algunas especies, pero no son muy distintivas, al contrario algunas especies son mejor caracterizadas por una completa ausencia de pigmentación, mientras que algunos aislamientos muestran pigmentaciones rojizas. Características como cristales en el medio son producidas únicamente por *Trichoderma aureoviride*. Indistintamente olores de mohos o humedad son producidos por diferentes cepas de *Trichoderma*. Características de olores aromáticos parecidos a coco son producidos comúnmente por algunas cepas de *Trichoderma viride* y a veces por *Trichoderma auroviride* (Gams & Bisett, 1998).

3.4.6. *Trichoderma* spp. como controlador biológico

3.4.6.1. Modo de acción

El uso comercial de *Trichoderma* como agente de control biológico se da por la identificación precisa, adecuada formulación y estudios acerca de los efectos sinérgicos de sus mecanismos de biocontrol (Hermosa *et al.*, 2000) citado por Díaz y Cruz, (2007).

Este hongo hiperparásito actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, y micoparasitismo, además produce sustancias promotoras de crecimiento de las plantas. El mismo coloniza las semillas y protege las plántulas en la fase post-emergente de patógenos fúngicos, la aplicación directa al suelo ofrece incluso una protección mayor a los cultivos (Stefanova *et al*, 1999).

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa, por esta razón estas especies son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas *et al*. 1982) citado por Agamez (2008) .

Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Ezziyani, 2004).

3.4.6.1.1 Biocontrol por competencia

Otros autores citados por Tovar (2008), mencionan algunos métodos de biocontrol los mismos que se describen a continuación:

- a) **Fungistasis.-** un buen antagonista es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de diferentes metabolitos producidos por otras especies, incluyendo plantas, y sobrevive bajo condiciones adversas o competitivas (Benítez *et al*, 2004 citado por Tovar 2008).

- b) **Competencia por nutrientes.-** la inanición es la causa más común de muerte para microorganismos, la competencia por nutrientes limitantes, resulta en un control biológico de hongos fitopatógenos, antagonistas y micoparasitos (Chet *et al.*, 1997 citado por Tovar 2008).

- c) **Antibiosis.-** ocurre durante la interacción de los componentes difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por las cepas de *Trichoderma* que inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Además las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de patógenos (Howell *et al.*, 1998 citado por Tovar 2008).

- d) **Micoparasitismo.-** el ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque

y penetración subsecuente y muerte al huésped. *Trichoderma* spp., puede ejercer control directo por el rango de parasitismo de hongo, detectando otros hongos y creciendo sobre el (Benítez *et al.*, 2004 citado por Tovar 2008).

Los hongos del género *Trichoderma* se adhieren con carbohidratos unidos a lectinas en la pared celular del patógeno. Una vez *Trichoderma* es adherido se enrosca alrededor del patógeno y forma el apresorio (Howell, 2003). El paso siguiente consiste de la producción de peptaiboles y enzimas hidrolíticas, lo que facilita la entrada de la hifa de *Trichoderma* dentro del lumen del hongo parasitado y la asimilación del contenido de la pared celular (Benítez *et al.*, 2004 citados por Tovar 2008).

En la degradación de la pared celular, la lisis es el mecanismo en el cual interviene las enzimas hidrolíticas producidas por los microorganismos antagonistas como factores biocontroladores. Se ha observado que *Trichoderma* spp., produce celulasas, glucanasas y quitinasas que degradan *in vitro*, la celulosa de las paredes celulares de microorganismos oomycetes y la quitina y B-1,3 glucanos de las paredes celulares de microorganismos Deuteromycetes como *Gliocladium* spp (Elad *et al.*, 1982 citado por Tovar 2008).

- e) **Sinergismo.-** el sinergismo entre la actividad de enzimas líticas y antibióticos, es la mejor estrategia para ser un buen controlador, además de abrir el campo para posibles cepas transformantes que puedan producir las

diferentes enzimas logrando un sinergismo que sea relevante (Benítez, 2004 citado por Tovar 2008).

El hongo y las raíces forman una simbiosis. El hongo se alimenta y vive del exudado que producen las raíces pero el hongo al colonizar las raíces les confiere una protección. Esta protección la hace de tres maneras:

- a. El primer tipo de protección la logra al consumir ese exudado que liberan las raíces. Este exudado es el alimento inicial que usan los patógenos para infectar la planta y muchos de estos hongos patógenos usan este exudado para encontrar las raíces que ellos infectan.
- b. El segundo tipo de protección del *Trichoderma* sp. se debe a que es un hongo antagonista, por lo que cualquier hongo patógeno que atraviesa el “Guante” protector es destruido, consumiéndolo y usándolo como alimento.
- c. El tercer tipo de protección es por exclusión. Esto es por que el *Trichoderma* sp. ocupa todos los espacios cercanos a las raíces dando una barrera física y excluyendo de esa área a cualquier hongo patógeno que se encuentre en esos espacios.

Este hongo tiene algunas ventajas:

- Coloniza el suelo alrededor de las raíces (rizosfera) ayudando a la planta en su nutrición por que vuelven los nutrientes más disponibles para la planta.
- Provee una protección más duradera ya que crece con las raíces durante el ciclo de vida de la planta.
- Protege las raíces de infecciones secundarias. Como por ejemplo, cuando insectos causan daños a las raíces, el *Trichoderma* sp. no permite que los patógenos tengan acceso a estas lesiones.
- Protegen de patógenos como bacterias por exclusión y por que muchas de las bacterias penetran después de daños que causan insectos, hongos o labores de campo.
- Las raíces se desarrollan más rápido y producen sistemas radiculares más grandes.

Rodríguez (2002) menciona que existen cuatro técnicas diferentes para la aplicación de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol y cada una puede ser efectiva en el

campo, especialmente son económicos aquellos métodos que introducen los antagonistas con el material a plantar.

Estas técnicas incluyen:

1. Diseminación, en este caso el preparado de *Trichoderma* se disemina sobre la superficie y se incorpora dentro del suelo infestado.
2. Surcos, la preparación se coloca dentro del surco a plantar.
3. Zona radicular, para esto se mezcla el suelo del campo con *Trichoderma* antes del transplante.
4. Cubriendo la semilla de esporas de *Trichoderma* usando un adhesivo.

3.4.7 Compatibilidad con plaguicidas

Los productos químicos afectan al suelo en especial en su parte biológica y tienen efecto en el ciclo del carbono. Compuestos análogos de hormonas vegetales (ácido fenoxiacéticos), sustitutos de triazinas o ureasas, carbonatos, carbosimidias, sales de metales pesados, organofosforados y organoclorados como el DDT, no se encuentran naturalmente y son tóxicos para los microorganismos y persistentes por largos períodos de tiempo acumulándose en organismos próximos al último nivel de la cadena trófica (Martínez, M. 2001).

Trichoderma posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos incluyendo a los fungicidas. Sin embargo, el nivel de resistencia difiere entre cepas. Algunas líneas seleccionadas o modificadas para ser resistentes a agroquímicos específicos. La

mayoría de productores de cepas de este hongo destinadas a control biológico poseen información relacionada con la susceptibilidad o resistencia a un amplio rango de agroquímicos (revisado por Páez O, 2006)

3.4.7.1 Productos químicos para el control de enfermedades radicales en flores de verano.

Según Izquierdo (1995) citado por Siannah M. *et al.* (2001), mencionan que los pesticidas sintéticos, usados ampliamente en el control, mantienen su uso por la efectividad, su vida de almacenamiento relativamente alta y la facilidad con que pueden ser transportados y almacenados; sin embargo, en su mayor parte son tóxicos y se estiman en 3 millones o más casos de envenenamiento por pesticidas anualmente, contaminan el agua, suelo y aire, provocan consecuencias a largo plazo aun no conocidas sobre humanos, la vida salvaje y el ambiente.

Existe una gama de productos químicos utilizados para el control de numerosas enfermedades en flores de verano en la actualidad se usan productos como los Dithiocarbamatos, clorotaloniles entre los más utilizados, también se utiliza un grupo muy heterogéneo de compuestos heterocíclicos como el captan, los benzimidazoles como el Benomyl y el carbendazim.

CUADRO 1. Productos químicos utilizados en pruebas de susceptibilidad.

PRODUCTO	Nombre común	Grupo químico	Modo de acción	Intervalo de seguridad	Toxicidad	Categoría Toxicológica
Captan 80	Captan		Fungicida protectante	7 a 21 días	DL50 Oral 10,000 mg/kg	IV Franja verde
Dithane FMB	Mancozeb	Etilen Bis-ditiocarbamato de Manganeso	Acción preventiva y protectante	7 a 21 días	DL50 oral 11200 mg/kg. DL50 dermal > 15000 mg/kg.	IV
Maneb	Maneb	Etilen – bis – ditiocarbamato de manganeso.	Preventivo.	7 a 15 días	DL50 Oral: 6750 mg/kg. DL50 Dermal : > 5.000mg/kg	IV Franja verde
Score	Difenoconazol	Triazoles	Fungicida sistémico	7 a 21 días.	DL50 Oral rata 3,442 mg/kg DL50 Dermal rata 2,000 mg/kg	III Ligeramente Peligroso
Daconil	Clorotalonil	Cloronitrilo	Fungicida de contacto	7 a 15 días	DL50 Oral 3,100 mg/kg DL50 Dermal > 2,000 mg/kg	IV Franja verde
Carbendazim	Carbendazim	Benzi-midazoles	Sistémico preventivo y curativo de amplio espectro.	15 días		IV Ligeramente peligroso.

3.5 Multiplicación Masiva de cepas de *Trichoderma* spp.

Para la reproducción masiva de las cepas promisorias de *Trichoderma* para el control de hongos patógenos del suelo se utilizan métodos bifásicos, líquido-líquido y líquido-sólido, sólido (Claro, 2006).

En los hongos, se necesita que la fuente C esté en exceso en el medio o sustrato y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo. Los inóculos se preparan a partir de subcultivos de preinóculos a una concentración final en el sustrato inoculado de propágulos/g.

Los preinóculos pueden desarrollarse sobre sustratos sólidos (grano arroz, grano trigo, cáscara de trigo, cáscara de arroz, harina de maíz, etc.) incluyendo los medios agarizados de cultivo o por cultivos líquido estático o agitado (compuestos por combinaciones de materias primas carbonadas y nitrogenadas como melaza de caña de azúcar, licor de maíz, almidón de maíz, sacarosa, extracto de levadura, extracto de levadura cervecera, etc.) siendo el objetivo fundamental la obtención de una biomasa homogénea. La relación carbono (C): Nitrógenos (N) es esencial y de este balance en lo fundamental dependerá el que se logre la formación de los propágulos deseados (Claro, 2006).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MUESTREO EN CAMPO

4.1.1 Descripción del Lugar

4.1.1.1 Ubicación Política

El muestreo se realizó en la finca FLORAGRO ubicada en la parroquia Checa, cantón Quito, provincia de Pichincha

4.1.1.2 Ubicación Geográfica

Se encuentra localizada, en las siguientes coordenadas 0°06'49''25 latitud sur y 78°19'26''11 longitud oeste.

4.1.1.3 Ubicación Ecológica

La empresa FLORAGRO donde se realizó el muestro se ubica a 2300 msnm, con una pluviosidad de 1000 milímetros, suelo de tipo franco arenoso y con un porcentaje de M.O. de 0,8-1,2%.

4.1.2 Materiales para muestreo en campo

- Barreno
- Pala
- Fundas de polipropileno
- Baldes

4.1.3 Métodos

4.1.3.1 Recolección de muestras de suelo

Para la recolección de muestras de suelo en la finca, se tomo en cuenta el número de hectáreas por cultivo, se hicieron 40 picadas en cada lote de los diferentes cultivos de flores de verano, entre los 20cm y 30cm de la rizosfera; se mezcló uniformemente las muestras de suelo y se seleccionó una muestra compuesta de 500g.

4.1.3.2 Recolección de plantas con síntomas de problemas radiculares

Se realizó un análisis visual en los diferente lotes de las especies: *Gypsophila*, *Aster*, *Molucella* y *Delphinium*; identificando así las plantas que presentaban síntomas de problemas radiculares se extrajeron 10 plantas enfermas por especie, se guardaron en fundas plásticas con una torunda de algodón formando así una cámara húmeda.

4.2 TRABAJO EN LABORATORIO

4.2.1 Descripción del lugar

4.2.1.1 Ubicación Política

La investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones del Departamento de Ciencias de la vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada en la Hacienda el Prado, localidad de San Fernando, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia Pichincha.

4.2.1.2 Ubicación Geográfica

Teniendo una localización en coordenadas de 0° 23 20" latitud sur y 78°24 44" longitud oeste.

4.2.1.3 Ubicación Ecológica

A una altitud de 2748msnm, con una humedad relativa de 68 % y una temperatura media de 12°C. Bosque montano bajo del Norte de la Sierra.

4.2.2 Materiales

4.2.2.1. Materiales de Laboratorio

- Material de vidrio
- Balanza analítica
- Incubadora
- Autoclave
- Microscopio
- Contador de colonias
- Agitador
- Pipetas mecánicas
- Material de papelería
- Papel toalla
- Algodón
- Mechero de alcohol
- Cubre y porta objetos

- Cajas de petri de plástico
- Aza de platino
- Estilete
- Bisturí
- Sacabocados
- Alcohol potable y antiséptico
- Microondas
- Refrigeradora

4.2.3 Métodos

4.2.3.1 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Las muestras de suelo obtenidas de los diferentes lotes de la finca se mezclaron uniformemente, de la muestra compuesta se tomaron 30g de suelo, el mismo que fue colocado en frascos que contenían 70 ml de agua destilada luego se autoclavó el material a 121°C por una hora, se llevó a agitación por 20 min. luego se realizó una dilución 10^{-1} en agua destilada y se agitó por 1 min. en un vortex.

De la primera dilución obtenida se realizó una siguiente dilución 10^{-2} y de esta se tomó 50 μ l para sembrar en cajas petri que contenían medio Martin, las cajas fueron selladas con parafilm e incubadas a una temperatura 25°C, durante 7 días.

4.2.3.2 Purificación de cepas de *Trichoderma* spp.

Para la purificación de *Trichoderma* spp., se extrajo cuidadosamente micelio con pequeñas proporciones de agar de cada colonia identificada como *Trichoderma*, se sembró con un estilete en cajas petri que contenían PDA más antibiótico. Las cepas de *Trichoderma* sp., purificadas fueron almacenadas en tubos con PDA.

4.2.3.3 Conservación de cepas de *Trichoderma*

4.2.3.4.1 Conservación de cepas de *Trichoderma* en espigas de Trigo.

Se preparó un té de zanahoria con azúcar al 25%, se sumergieron las espigas en el té preparado por una hora y media aproximadamente, luego de esto se escurrió el agua y las espigas fueron colocadas en tubos se selló y se esterilizó el material a 121°C durante una hora, cuando los tubos se enfriaron después de la esterilización se procedió a sembrar esporas de las diferentes cepas de *Trichoderma* sp. se selló herméticamente con parafilm y se almacenó en la incubadora a 22°C.

4.2.3.4.2 Conservación de cepas de *Trichoderma* en suelo esterilizada.

Muchos de los hongos, especialmente del suelo, se mantienen bien por años si se agrega una suspensión de propágulos a un suelo esterilizada. Para la conservación de

cepas de *Trichoderma* sp, en suelo se pesó una muestra de 200g de suelo Franco Arenoso de la finca FLORAGRO, dejándola secar por 3 días se procedió a tamizar en un tamiz de 300 μm , para luego colocar en viales ependor de 4cc que fueron esterilizados, más adelante se puso 0,4 ml de H_2O esterilizada, para mantener una humedad en capacidad de campo.

De las cajas petri con cepas puras se tomaron con el aza de platino esporas y micelio, luego se procedió a poner en tubos que contenían 1,5 ml de agua esterilizada, después la suspensión fue homogenizada y se evaluó la concentración de su población en una cámara de Neubauer dando un promedio de $3,4 \times 10^7$ conidias. Se extrajo 0,6 ml de suspensión y se colocó en los viales ependor que contenían suelo esterilizado previamente tratado, se los selló y etiquetó.

4.2.3.4 Aislamiento de Patógenos que causan problemas radicales en flores de verano.

Se realizó un análisis visual a las raíces de las diferentes especies de flores de verano: *Gypsophila*, *Aster*, *Molucella* y *Delphinium* con un esteromicroscopio; para seleccionar las raíces que presentaron lesiones.

Para el aislamiento de los patógenos se utilizó la técnica propuesta por Falconí C (1998), de las raíces seleccionadas se cortaron pedazos de las partes necrosadas, se realizó un lavado para eliminar la tierra que se encontraba en la superficie, después se desinfectó las muestra con hipoclorito durante un minuto, luego se hizo tres enjugues

sucesivos con agua destilada y se procedió a sembrar en cajas petri con PDA más antibiótico, a las 24 horas se realizó una observación al material sembrado identificando crecimiento micelial alrededor de las partes de raíces sembradas se identificó los hongos de interés; de esta forma, se procedió a aislar los hongos de importancia para la investigación en cajas petri con PDA más antibiótico.

CUADRO 2. Identificación de patógenos por especie de cultivo IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

ESPECIE	IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENO
<i>Gypsophila</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Phytophthora</i> sp.
<i>Aster</i>	<i>Fusarium</i> spp.
<i>Molucella</i>	Micelio
<i>Delphinium</i>	Micelio Género <i>Cladosporium</i>

Para el aislamiento de *Phytophthora* sp., se extrajo suelo aledaño a las raíces que presentaban sintomatología de enfermedad, este suelo se colocó en un pequeño orificio que se lo hizo en manzanas, el suelo colocado en las manzanas se humedeció con H₂O esterilizada y se lo tapó con cinta adhesiva, al cabo de 5 días se realizó un corte por la mitad en donde se identificó presencia de micelio, el mismo que por observación al microscopio se idéntico como *Phytophthora*, para la siembra este hongo se prepara un medio específico como es el medio V8 (Anexo 1), de ahí se aisló y purificó en cajas petri que contenían medio PDA.

4.2.3.4.1 Identificación de microorganismos aislados

De los aislamientos obtenidos en los muestreos de campo tanto de suelo como de material vegetal, se obtuvieron cultivos puros, a partir estos cultivos mantenidos en tubos con PDA y bajo refrigeración se transfirieron a cajas de petri con PDA. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 2 a 3 días hasta observar el apareamiento de micelio y esporas.

La identificación de aislados se realizó mediante reconocimiento de crecimiento de estructuras microscópicas (hifas, esporas y clamidosporas) y macroscópicas (color de micelio, forma de micelio y crecimiento) de cada aislado en PDA se prepararon muestras frescas de micelio sobre placas portaobjetos, con lactofenol para determinar los hongos aislados. Las características macro y microscópicas fueron comparadas con la clave de identificación de géneros de Kubicek C. & Harman G., (1998), para especies de *Trichoderma*; para la identificación de especies del patógeno *Fusarium* utilizamos la clave de Booth, C. (1977).

4.2.3.5 Pruebas de Evaluación de crecimiento de *Trichoderma* sp.

Siete cepas de *Trichoderma* sp., aisladas de suelos de cultivos de flores de verano (*Gypsophyla*, *Aster*, *Delphinium* y *Mollucella*) fueron reactivadas en cajas petri con PDA más antibiótico (Cloranfenicol), después de haber dejado 48 horas en incubación a 25°C se procedió a extraer con un saca bocados de 5mm de diámetro

muestras de la periferia de cada caja petri, para después sembrar cuidadosamente en el centro de las cajas petri con PDA y así evaluar la velocidad de crecimiento diametral cada 24 horas. Para el ensayo se utilizaron siete cepas de *Trichoderma* sp., cada una con cuatro repeticiones.

4.2.3.6 Pruebas de antagonismo de *Trichoderma* sp. frente a patógenos causantes de enfermedades radicales en flores de verano.

A partir de los cultivos puros de las siete cepas de *Trichoderma* aisladas de los suelos de diferentes zonas de la finca FLORAGRO, se multiplicó el hongo en cajas petri con PDA, se utilizándose el mismo procedimiento para la multiplicación de los patógenos; a partir de las cajas de multiplicación de hongos se extrajeron de la periferia discos de 5mm los cuales fueron sembrados en cajas petri con PDA equidistantes entre si, para de esta manera evaluar el comportamiento del antagonista frente al patógeno durante un período de siete días. También se evaluó el efecto antagónico mediante la utilización de una escala de medición para el análisis de Baker y Cook, utilizada por Bell en 1982.

CUADRO 3. Escala de clases de Bell *et al.* (1982)

Clase 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Clase 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo

4.2.3.7 Pruebas de tolerancia de *Trichoderma* sp. a productos químicos.

Se preparó como medio PDA más 6 productos químicos, Captan 80, Dithane FMB, Score, Maneb, Daconil y Carbendazim, cada uno de los químicos en tres dosis: baja, alta y de finca. A partir de los cultivos puros se multiplicó *Trichoderma* en cajas petri las mismas que contenían medio PDA; de la periferia de la caja petri se extrajeron discos de 5mm de diámetro para sembrar en cajas petri que contenían PDA más el producto químico en sus tres dosis, para determinar la susceptibilidad de las diferentes cepas de *Trichoderma* evaluando el crecimiento diametral diario del antagonista durante 8 días.

CUADRO 4. Productos químicos utilizados en pruebas de susceptibilidad.

PRODUCTOS QUÍMICO	DOSIS		
	BAJA	ALTA	DE FINCA
Captan 80	1,0 g/l	1,5 g/l	2,0 g/l
Dithane FMB	1,0 g/l	1,5 g/l	2,0 g/l
Maneb	1,25 g/l	2,5 g/l	2,0 g/l
Score	0,6 ml/l	0,8 ml/l	0,7 ml/l
Daconil	0,9 ml/l	1,8 ml/l	1,2 ml/l
Carbendazim	0,6 ml/l	0,9 ml/l	1,0 ml/l

4.2.3.8 Multiplicación masiva y Viabilidad de *Trichoderma* sp.

La multiplicación masiva de *Trichoderma* sp. se realizó utilizando ocho sustratos: avena, maíz, soya, trigo, arrozillo, fibra de coco, kikuyo y acículas de pino, los sustratos como la avena, maíz, soya y trigo fueron triturados hasta obtener partículas de 0,5mm a 3,0mm de diámetro. Los ocho sustratos fueron sumergidos durante 1

hora en una solución de melaza al 5% más te de papa a razón de 200g/l, luego de esto se escurrió los diferentes sustratos logrando una humedad adecuada entre el 25% y 50%, se colocó 200 cm³ de cada sustrato en botellas estas fueron selladas con algodón y papel, se esterilizó a 121°C durante una hora, después se colocó en cada botella 5 discos de 8mm de diámetro que fueron extraídos del margen de la colonia miceliana de *Trichoderma* sp. que se desarrolló en una caja petri con agar papa dextrosa, y se incubo a 25 °C durante 8 días con luz constante.

4.2.3.8.1 Determinación de la concentración de esporas de *Trichoderma* spp. desarrolladas en los diferentes sustratos.

4.2.3.8.1.1 Método de Neubauer

De los diferentes frascos en donde se hizo la multiplicación masiva de *Trichoderma* se peso 1g de muestra (sustrato + *Trichoderma*), esto se colocó en 99 ml de agua esterilizada, se lo mezclo en un agitador orbital durante 30 min.; luego con una pipeta automática se extrajo 10µl de la solución madre y se determinó la concentración de conidias con una cámara de Neubauer a través de la observación en un microscopio óptico, de acuerdo al protocolo propuesto por Falconí, C (1998) la evaluación se realizó durante tres meses cada 15 días.

4.2.3.8.1.2 Método de Plaqueo

Luego de haber efectuado el conteo de conidias en los diferentes sustratos se realizó el método de plaqueo se tomó 1 ml de la suspensión preparada y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua, así sucesivamente hasta llegar a una dilución de 10^{-4} , para luego hacer un conteo de conidias de la solución madre y de la dilución 10^{-4} en una cámara de Neubauer para en función de esto evaluar el número de colonias que se identificaran luego de haber sembrado las diluciones de 10^{-4} en cajas petri con PDA para realizar plaqueo.

4.2.4 Diseño experimental

4.2.4.1 Pruebas de Evaluación de crecimiento de *Trichoderma* sp.

a) Factores en estudio:

Las 7 diferentes cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de FLORAGRO

b) Tratamientos a comparar:

Los tratamientos corresponden al factor en estudio.

T1 *Trichoderma* spp. Cepa 1

T2 *Trichoderma* spp. Cepa 2

T3 *Trichoderma* spp. Cepa 3

T4 *Trichoderma* spp. Cepa 4

T5 *Trichoderma* spp. Cepa 5

T6 *Trichoderma* spp. Cepa 6

T7 *Trichoderma* spp. Cepa 7

c) Tipo de diseño experimental:

El diseño empleado fue completamente al azar.

d) Número de repeticiones:

Se utilizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

e) Análisis estadístico

e.1) Esquema del análisis de varianza:

FUENTES DE VARIACIÓN	Grados de Libertad
Total	55
Tratamiento	(13)
Cepas	6
DC1	1
DC2	1
DC3	1
.....	1
DC7	1
Error	42

e.1.1) Análisis funcional:

Se realizó la prueba de Duncan al 5 %, para la medición de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* spp.

f) Datos a tomar y métodos de evaluación

Crecimiento diametral en dos direcciones (D1, D2) de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. La medida fue tomada desde el borde del círculo de siembra hasta el límite de crecimiento que presentaba cada día.

4.2.4.2 Pruebas de antagonismo *Trichoderma* sp. vs a patógenos causantes de enfermedades radiculares en flores de verano.**a) Factores de estudio**

Siete cepas del antagonista *Trichoderma* spp., cinco cepas del patógeno *Fusarium* spp., y una cepa del patógeno *Phytophthora* sp.

b) Tratamientos a comparar

Se utilizaron 7 Cepas de *Trichoderma* sp. x 5 cepas de *Fusarium* sp. x 2 distancias formado así 70 tratamientos.

c) Tipo de Diseño Experimental:

Diseño completamente al azar.

d) Número de repeticiones:

Se utilizaron 3 repeticiones por cada tratamiento

e) Análisis estadístico:

e.1) Esquema de análisis de varianza:

FUENTES DE VARIACION	Grados de Libertad
Total	209
Tratamiento	69
<i>Trichoderma – Fusarium</i>	34
Cepas <i>Trichoderma</i>	6
Cepas <i>Fusarium</i>	4
Cepasx <i>Fusarium</i>	24
Error	175

e.1.1) Análisis Funcional

Se realizó la prueba de Duncan al 5 %, para los medios de crecimiento de las cajas del antagonista, patógenos y las eficiencias de los antagonistas como biocontroladores.

f) Datos a tomar y métodos de evaluación

Se determinó el crecimiento radial diario de los fitopatógenos y de las cepas de *Trichoderma* spp., hasta que una cepa de las dos cepas se intercepten en un mismo punto.

4.2.4.3 Pruebas de tolerancia de *Trichoderma* sp. a productos químicos.

a) Factores de estudio

Siete cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de la florícola FLORAGRO, seis productos químicos en tres dosis, los mismos que se utilizan para el control en campo de problemas sanitarios en flores de verano.

b) Tratamientos

Cada tratamiento se formó con la utilización de las 7 Cepas de *Trichoderma* sp. x 6 Productos x 3 Dosis; obteniendo 126 tratamientos.

c) Tipo de diseño Experimental:

Diseño en completamente al azar.

d) Número de repeticiones:

Se utilizaron 3 repeticiones de cada tratamiento

e) Análisis estadístico:

e.1) Esquema de análisis de varianza:

FUENTES DE VARIACION	Grados de Libertad
Total	377
Tratamiento	125
Cepas <i>Trichoderma</i>	6
Dosis	2
Producto	5
Cepas x Dosis	12
Cepas x Producto	30
Dosis x Producto	10
Cepas x Dosis x Producto	60
Error	252

e.2) Análisis Funcional

Se realizó la prueba de Duncan al 5 %, para determinar rangos de diferenciación en la tolerancia de siete cepas de *Trichoderma* spp., a seis productos químicos.

f) Datos a tomar y métodos de evaluación

Se midió el crecimiento diametral de las cepas cuando están en presencia de 6 productos químicos que utilizan para el control fitosanitario en FLORAGRO.

4.2.4.4 Multiplicación masiva y viabilidad de *Trichoderma* sp.

a) Factores de estudio

Tres cepas de *Trichoderma* sp., *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma koningii* escogidas en base a las pruebas anteriores y la C19 (*Trichoderma pseudokoningii*), la misma que sirve como testigo. Ocho sustratos utilizados para la multiplicación masivas de *Trichoderma* sp., para cada una de estas cepas se determinó el número de conidios/g.

b) Tratamientos

Cada tratamiento se formó con la utilización de las 3 Cepas de *Trichoderma* sp. x 8 sustratos; obteniendo 24 tratamientos.

c) Tipo del Diseño Experimental

Los datos del número de conidios/g de cada sustrato fueron transformados ($\log x$), y se utilizó un Diseño completamente al azar, con pruebas de Duncan al 5%.

d) Número de repeticiones:

Se utilizaron 3 repeticiones de cada tratamiento

e) Análisis estadístico:

e.1) Esquema de análisis de varianza:

FUENTES DE VARIACION	Grados de Libertad
Total	72
Tratamiento	7
Cepas	2
Error	63

e.2) Análisis Funcional

Se realizó la prueba de Duncan al 5 %, para establecer los rangos de diferenciación para la determinación de los mejores sustratos para multiplicación masiva.

f) Datos a tomar y métodos de evaluación

Se determinó el número de conidias/g en cada uno de los sustratos, evaluado de esta forma la dinámica poblacional de las esporas que producen cada una de las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

4.2.4.5 Análisis Económico

Se realizó un análisis de costos, utilizando los costos de cada uno de los sustratos que fueron utilizados para la multiplicación masiva comparándolos entre si para de esta forma establecer cual fue el menor costo para la producción masiva de *Trichoderma*.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 AISLAMIENTO DE *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron un total de 7 cepas del género *Trichoderma*, las mismas que fueron aisladas de diferentes lotes sembrados con flores de verano; al respecto Harman (1990) citado por Agamez (2008), manifiesta que los hongos del género *Trichoderma* sp., son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces.

CUADRO 5. Procedencia de 7 cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con diferentes flores de verano. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas	Código	Lote de procedencia
C1	F2L18B1	<i>Delphinium</i>
C2	F3B7A	<i>Aster</i>
C3	F2L1A	<i>Gypsophila</i>
C4	F3B3	<i>Aster</i>
C5	F2L1B2	<i>Gypsophila</i>
C6	F2L1A3	<i>Gypsophila</i>
C7	F2L18B3	<i>Delphinium</i>

En la figura 1 se puede diferenciar a simple vista las diversas formas de crecimiento de cada una de las cepas y la diferencia entre la esporulación que cada una de las cepas de *Trichoderma* presentaron a la culminación de la prueba de velocidad de crecimiento, también se puede apreciar la coloración de las colonias y su forma.

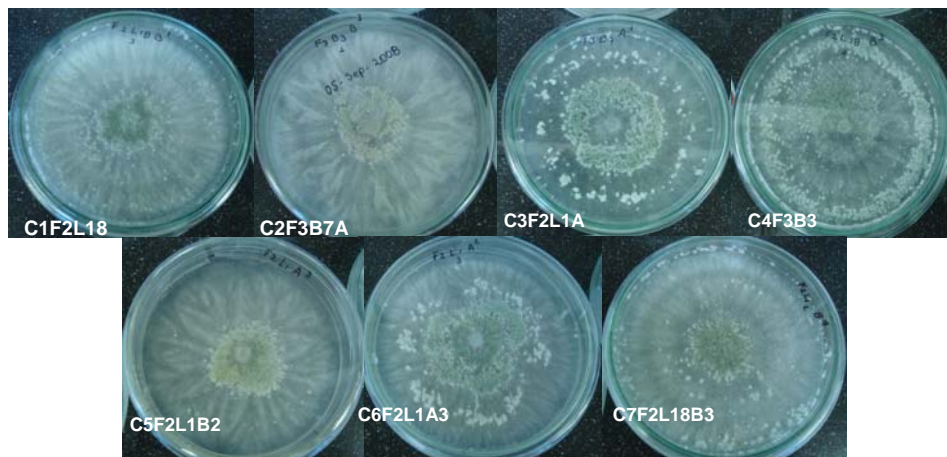


Figura 1. Cepas de *Trichoderma* aisladas. IASA, Ecuador, 2009

5.2 CRECIMIENTO DIAMETRAL DE SIETE CEPAS DE *Trichoderma* spp.

Al establecer el análisis de varianza para el crecimiento diametral de siete cepas de *Trichoderma*, se encontró diferencias estadísticas para tratamientos a nivel del 1% en los cinco días de evaluación, las cepas también se diferenciaron a nivel del 1% en todas las evaluaciones. Dentro de cada una de las cepas el crecimiento diametral evaluado en dos direcciones (latitudinal y longitudinal), fueron similares entre si, por lo tanto no presentaron diferencias estadísticas en cada una de las evaluaciones dentro de los dos sentidos (Cuadro 6).

Los crecimientos diametrales de las siete cepas de *Trichoderma* dentro de la caja petri fueron incrementándose de 2,59cm en el primer día hasta alcanzar 8,83cm en el quinto día, al sexto día ocupó la totalidad de la caja petri con CV entre 4,19% a 11,48%, notando que a medida que se incrementaba el tiempo de evaluación disminuyó el coeficiente de variabilidad (Cuadro 6).

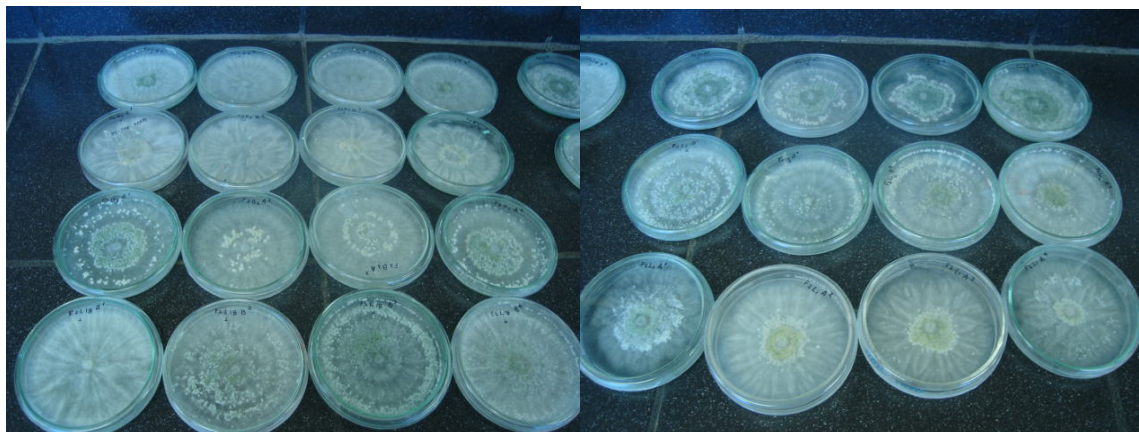


Figura 2. Prueba de velocidad de crecimiento *in vitro*. IASA, Ecuador, 2009

CUADRO 6. Análisis de varianza para el crecimiento diametral de siete cepas de *Trichoderma* sp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DIAS DE EVALUACIÓN				
		1	2	3	4	5
TOTAL	55					
TRATAMIENTOS	(6)	1,13**	4,31**	11,02**	3,72**	0,77**
ENTRE CEPAS	6	1,15**	4,39**	11,02**	3,66**	0,70**
DIRECCION	1	0,39ns	0,83ns	0,88ns	0,06ns	0,03ns
DC1F2 L18B1	1	0,08ns	0,06ns	0,66ns	0,03ns	0,00ns
DC2F3 B7A	1	0,21ns	0,08ns	0,06ns	0,00ns	0,00ns
DC3F2 L1A	1	0,05ns	0,55ns	0,13ns	0,05ns	0,21ns
DC4F3 B3B1	1	0,04ns	0,04ns	0,08ns	0,00ns	0,00ns
DC5F2 L1B2	1	0,03ns	0,04ns	0,00ns	0,00ns	0,00ns
DC6F2 L1A3	1	0,02ns	0,18ns	0,25ns	0,06ns	0,00ns
DC7F2 L18B3	1	0,03ns	0,08ns	0,04ns	0,00ns	0,00ns
ERROR	49	0,09	0,28	0,43	0,36	0,14
\bar{X} (cm)		2,59	5,01	7,56	8,60	8,83
CV (%)		11,48	10,57	8,63	6,95	4,19

En términos generales los mayores diámetros se presentaron dentro de las cepas, 1 aislada de suelos del cultivo de *Delphinium*, cepas 2 y 4 aisladas de suelos de cultivo de *Aster* y cepas 5 y 6 se aislaron de cultivos de *Gypsophila*; transcurridos cuatro días de evaluación algunas de las cepas evaluadas ocuparon totalmente la caja petri,

llegando a alcanzar un diámetro de 9cm; los menores crecimientos correspondieron a las cepas 3 y 7 aisladas de suelos de cultivos de *Gypsophila* y *Delphinium* respectivamente, al quinto día las mencionadas cepas 3 y 7 todavía no ocuparon toda la caja petri. Los aislamientos de las cepas de *Trichoderma* se realizaron de diferentes zonas de la finca con diversos lotes de cultivo (*Delphinium*, *Gypsophila*, *Aster*), hay que tomar en cuenta que la diferencia entre cepas aisladas de un mismo cultivo se debe al manejo que se da en cada una de las zonas ya sea por su necesidad de riego o el relieve del suelo, de esta forma se establece un desarrollo diferente en los microorganismos del suelo y por ende en los aislamientos de los hongos de interés, en este caso de *Trichoderma* (Cuadro 7).

CUADRO 7. Prueba de Duncan al 5% para la evaluación del crecimiento diametral de cepas de 7 cepas de *Trichoderma* sp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	DÍAS DE EVALUACIÓN				
	1	2	3	4	5
C1 F2L18B1	2,95 a	5,69 a	8,36 a	8,94 a	9,00 a
C2 F3B7A	2,41 cd	4,85 b	7,46 b	9,00 a	9,00 a
C3 F2L1A	2,25 de	4,29 c	6,28 c	7,80 b	8,41 b
C4 F3B3B1	2,80 ab	5,35 ab	8,23 a	9,00 a	9,00 a
C5 F2L1B2	3,09 a	5,80 a	8,70 a	9,00 a	9,00 a
C6 F2L1A3	2,59 bc	5,30 ab	8,25 a	9,00 a	9,00 a
C7 F2L18B3	2,05 e	3,80 c	5,63 c	7,44 b	8,38 b

En el crecimiento diametral de siete cepas de *Trichoderma* aisladas de diferentes lotes de flores de verano, se puede observar que el mejor crecimiento correspondió a la cepa 5 aislada del suelo perteneciente a cultivos de *Gypsophila*, esta fue la primera en crecer en los cinco días de evaluación, a la vez se observó un buen crecimiento en la cepa 1 aislada de suelo del cultivo de *Delphinium* (Figura 3).

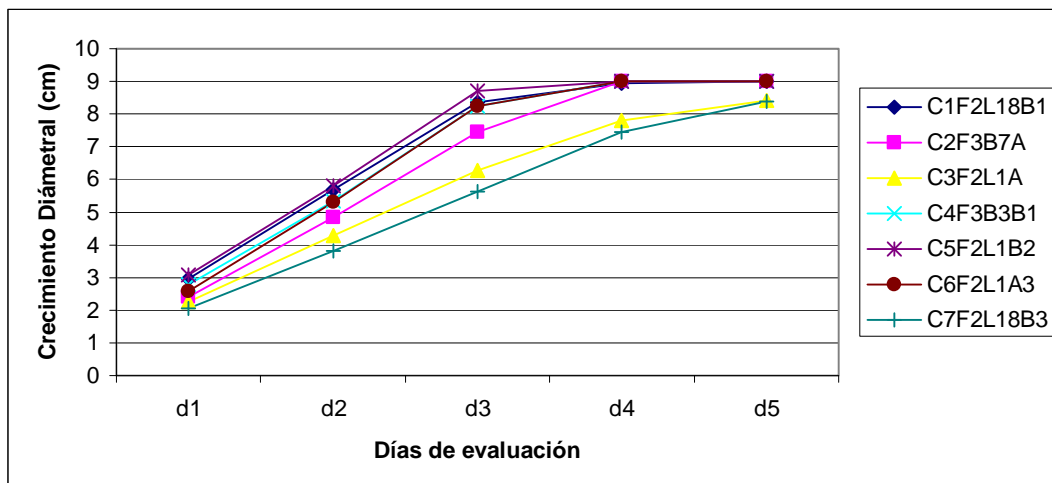


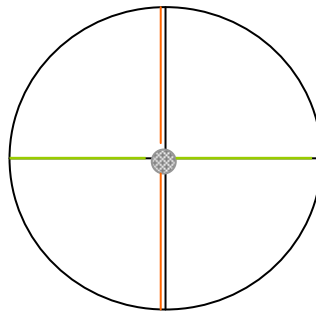
Figura 3. Crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp., IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Los tratamientos que mostraron los mayores crecimientos diametrales al primer día de evaluación fueron los T9 y T10 los mismos que se refieren a la dirección en sentido longitudinal y latitudinal respectivamente, la cepa que corresponde a estos tratamientos es la C5 asilada de suelo de cultivos de *Gypsophila*, la misma que fue la primera cepa en cubrir toda la caja petri, se puede observar los diferentes crecimientos que tiene cada una de las 7 cepas de *Trichoderma* debido a su propia capacidad de crecimiento que estas presentan en el tiempo; así Baker & Cook (1983), afirman que la velocidad de crecimiento presentada por las especies de *Trichoderma* sirve de guía para su utilización como antagonista, en el control de fitopatógenos, demostrando así la variabilidad de la actividad antagónica de las diferentes especies de *Trichoderma* (Cuadro 8).

CUADRO 8. Crecimiento diametral de siete cepas de *Trichoderma* spp. en dos direcciones IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS		DÍAS DE EVALUACIÓN				
		1	2	3	4	5
T1	C1F2L18B1 D1	3,05 a	5,78	8,65	9,00	9,00
	C1F2L18B1 D2	2,85 b	5,60	8,08	8,88	9,00
T2	C2F3B7A D1	2,58 a	4,95 a	7,55 a	9,00	9,00
	C2 F3B7A D2	2,25 b	4,75 b	7,38 b	9,00	9,00
T3	C3 F2L1A D1	2,33	4,55	6,40	7,88	8,58
	C3 F2L1A D2	2,18	4,03	6,15	7,73	8,25
T4	C4 F3B3B1 D1	2,88	5,43	8,33	9,00	9,00
	C4 F3B3B1 D2	2,73	5,28	8,13	9,00	9,00
T5	C5 F2L1B2 D1	3,15	5,88	8,73	9,00	9,00
	C5 F2L1B2 D2	3,03	5,73	8,68	9,00	9,00
T6	C6 F2L1A3 D1	2,65	5,40	8,33	9,00	9,00
	C6 F2L1A3 D2	2,53	5,20	8,18	9,00	9,00
T7	C7 F2L18B3 D1	2,10	3,95	5,80	7,53	8,38
	C7 F2L18B3 D2	2,00	3,65	5,45	7,35	8,38

En forma general dentro de cada uno de los crecimientos diametrales (D1 y D2) no se ven diferencias, sin embargo, las cepas 1 y 2 muestran significación, esto se debió al comportamiento de las cepas en su formación en la caja petri, la cepa dos muestra esta diferencia con mayor connotación ya que sus diferencias se manifiestan para los 3 primeros días de evaluación en comparación a las otras 6 cepas (Cuadro 8).



- Crecimiento latitudinal (D1)
- Crecimiento longitudinal (D2)

Figura 4. Esquema de la toma de datos en la evaluación de crecimiento diametral de *Trichoderma* spp., en dos direcciones IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

5.3 AISLAMIENTO DE PATÓGENOS CAUSANTES DE PROBLEMAS RADICULARES EN FLORES DE VERANO.

Los patógenos aislados de plantas que presentaron síntomas de problemas radiculares al realizar observaciones a través del microscopio y estereomicroscopio, fueron *Fusarium* spp. y *Phytophthora* sp. los mismos que se extrajeron de diferentes zonas de la raíz, es decir desde el cuello de la raíz hasta las raíces secundarias. Estos géneros tienen interés, ya que son unos de los principales causantes de problemas radiculares en flores de verano; con relación a esto Agrios (1996) determinó que las pudriciones de la raíz son ocasionadas por los hongos de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium* (Cuadro 9).

CUADRO 9. Procedencia de patógenos aislados de lesiones radiculares diferentes especies de flores de verano. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

ESPECIE	IDENTIFICACION DE PATÓGENO
<i>Gypsophila</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Phytophthora</i> sp.
<i>Aster</i>	<i>Fusarium</i> spp.
<i>Molucella</i>	Micelio
<i>Delphinium</i>	Micelio Género <i>Cladosporium</i>

5.3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE PATÓGENOS CAUSANTES DE PROBLEMAS RADICULARES EN FLORES DE VERANO.

De los diferentes aislamientos debidamente purificados se identificaron morfológicamente 5 cepas del género *Fusarium* para lo cual se consideraron las

características microscópicas y macroscópicas. *Fusarium oxysporum* desarrolló colonias con micelio de color violeta a púrpura, clamidosporas esféricas y microconidios producidos en fíalides cortos y ramificados, así Booth, (1977) manifiesta que las colonias varían de un color blanco, durazno a púrpura y violeta; además menciona que tiene un radio de crecimiento diametral aproximadamente de 4,5cm en 8 días que se asemeja a los datos generados por este hongo durante el proceso de evaluación.

Mientras que las colonias identificadas como *Fusarium moniliforme* desarrollaron colonias con micelio aéreo blanco, poco a poco este se fue tornando con el tiempo en púrpura hasta llegar a un color vinaceo, presentaron microconidios en cadenas en fíalides simples, no fue consistente la presencia de clamidosporas, la variedad *anthophilum* se la determinó por la forma de macroconidias que son curvadas con 3 a 5 septas, el otro grupo de aislamiento desarrolló micelio blanco en donde se pudo observar macroconidias en algunos fíalides alargadas correspondiendo de esta forma a *Fusarium solani* (Cuadro 10).

CUADRO 10. Caracterización de 5 cepas de *Fusarium* spp., aisladas de plantas que presentaron problemas radiculares en flores de verano. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	ESPECIE
Cepa 1	<i>F. moniliforme</i> var. <i>anthophilum</i>
Cepa 2	<i>Fusarium oxysporum</i>
Cepa 3	<i>Fusarium moniliforme</i>
Cepa 4	<i>Fusarium</i> sp.
Cepa 5	<i>Fusarium solani</i>

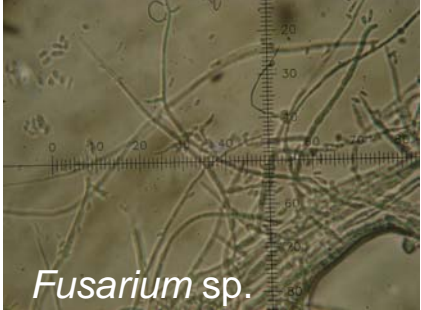

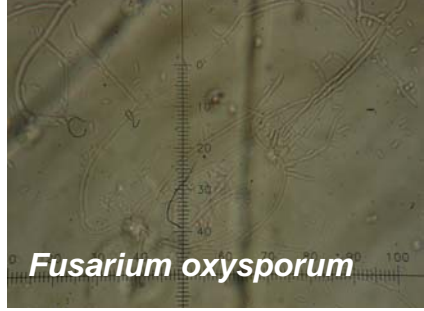



 <p><i>Fusarium</i> sp.</p>	<p>División: Eumycota Subdivisión: Deuteromycotina Clase: Hyphomycetes Orden: Moniliales Familia: Tuberculariaceae Género: <i>Fusarium</i> sp. Especies: <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Fusarium solani</i>, <i>Fusarium moniliforme</i>. (Agrios, G. 1996)</p>
 <p><i>Fusarium moniliforme</i></p>	 <p><i>Fusarium oxysporum</i></p>
 <p><i>F. moniliforme</i> var. <i>anthophilum</i></p>	 <p><i>Fusarium solani</i></p>
 <p><i>Phytophthora</i> sp.</p>	<p>Phylum: Oomycota Clase: Oomycete Subclase: Peronosporomycetidae Orden: Pythiales Familia: Pythiaceae Género: <i>Phytophthora</i> (Jaramillo, 2003 citado por López 2007)</p>

Figura 5. Patógenos encontrados en lesiones radiculares de especies de flores de verano

IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Otra cepa que fue estudiada manifestó las siguientes características al realizar observaciones al microscopio se pudo apreciar estructuras somáticas (talos) compuestas de filamentos, hialinos (hifas) ramificados y cenocíticos (no septados). El diámetro del micelio (5-8 μm) fue variable y depende de la naturaleza física y química del medio y de si el micelio está sobre la superficie aérea, sumergido o dentro de las células hospederas además el micelio raras veces crece simétricamente según los mencionado por Jaramillo, (2003) citado por López, (2007).

De igual forma se puede mencionar que una de las características morfológicas de este hongo es la forma o consistencia algodonosa que presenta cuando es sembrado en medios nutritivos en cajas petri, las características notadas correspondieron a *Phytophthora* sp.

5.4 PRUEBAS DE ANTAGÓNISMO

5.4.1 PRUEBA DE ANTAGÓNISMO DE SIETE CEPAS DE *Trichoderma* spp. vs CINCO CEPAS DE *Fusarium* spp.

Al establecer el análisis de varianza para el crecimiento radial, es decir el crecimiento horizontal que exhibe cada una de las siete cepas de *Trichoderma* spp. en dirección al punto de inoculación del agente patógeno se apreció que los agentes antagonicos aislados de suelo de cultivo de flores de verano frente a cinco cepas de *Fusarium* (Cuadro 10), tuvieron diferencias estadísticas para tratamientos a nivel del 1% en las evaluaciones realizadas en los dos primeros días, para el tercer y cuarto día no hubo diferencias significativas esto se da por la unión que se da entre el patógeno y el

antagonista a medida que pasó el tiempo. Las cepas de *Trichoderma* spp. se diferenciaron a nivel del 1% en los dos primeros días y a partir del tercer día hubo diferencias no significativas, lo mismo ocurrió con las cepas del patógeno *Fusarium* spp. Dentro de cada grupo las cepas patogénicas no tuvieron diferencias significativas hasta el segundo día de evaluación a partir del tercer día presentaron diferencias a nivel del 1% (Cuadro 11).

Los crecimientos radiales de las siete cepas de *Trichoderma* dentro de la caja petri fueron incrementándose de 0,68cm de radio en el primer día hasta alcanzar 3,36cm de radio al cuarto día donde las cepas del antagonista como del patógeno se unieron en un mismo punto; con un CV entre 15,27% a 28,34%, se puede apreciar que a medida que se incrementa el tiempo de evaluación el CV aumenta (Cuadro 11).

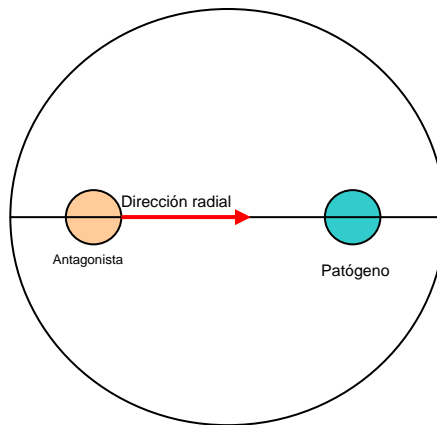


Figura 6. Dirección del crecimiento radial tomada para las evaluaciones. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 11. Análisis de Varianza para el crecimiento de 7 cepas de *Trichoderma* spp. frente a 5 cepas de *Fusarium* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DÍAS DE EVALUACIÓN			
		1	2	3	4
TOTAL	209				
TRATAMIENTO	69	0,08**	0,27**	0,17 ns	0,07 ns
<i>Trichoderma</i> – <i>Fusarium</i>	34	0,08**	0,27**	0,17 ns	0,07 ns
CEPAS TRICHODERMA	6	0,30**	0,83**	0,40 ns	0,07 ns
CEPAS FUSARIUM	4	0,12**	0,59**	0,51 ns	0,44 ns
Cepas <i>Trich.</i> * Cepas <i>Fus.</i>	24	0,02**	0,07**	0,06 ns	0,02 ns
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,48**
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2	1	0,00ns	0,03ns	0,00ns	0,38**
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3	1	0,00ns	0,00ns	0,03ns	2,04**
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4	1	0,01ns	0,02ns	0,01ns	0,20*
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5	1	0,04ns	0,00ns	0,01ns	0,38**
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6	1	0,04ns	0,02ns	0,11ns	0,48**
<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7	1	0,01ns	0,03ns	0,06ns	0,60**
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1	1	0,00ns	0,03ns	0,04ns	1,04**
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2	1	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,04ns
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3	1	0,08*	0,04ns	0,11ns	0,38**
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4	1	0,00ns	0,00ns	0,01ns	0,17*
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5	1	0,00ns	0,00ns	0,08ns	0,54**
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6	1	0,01ns	0,01ns	0,03ns	0,24**
<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7	1	0,01ns	0,00ns	0,06ns	1,82**
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1	1	0,00ns	0,03ns	0,02ns	0,81**
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2	1	0,04ns	0,02ns	0,00ns	0,02ns
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3	1	0,01ns	0,01ns	0,06ns	0,81**
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4	1	0,03ns	0,01ns	0,06ns	0,81**
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5	1	0,01ns	0,01ns	0,03ns	0,03ns
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6	1	0,04ns	0,00ns	0,00ns	0,02ns
<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,14ns
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1	1	0,00ns	0,01ns	0,00ns	0,88**
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2	1	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,48**
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3	1	0,01ns	0,01ns	0,14*	0,67**
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4	1	0,02ns	0,02ns	0,01ns	0,38**
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5	1	0,02ns	0,00**	0,00ns	0,03ns
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6	1	0,08*	9,38ns	0,14*	0,48**
<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,20*
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1	1	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,38**
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2	1	0,01ns	0,01ns	0,08ns	0,00ns
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3	1	0,00ns	0,00ns	0,11ns	0,11ns
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4	1	0,06*	0,04ns	0,14*	0,60**
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5	1	0,01ns	0,03ns	0,00ns	1,93**
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6	1	0,01ns	0,06ns	0,11ns	0,04ns
<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7	1	0,03ns	0,00ns	0,00ns	0,11ns
ERROR	175	0,01	0,01	0,67	0,91
\bar{X} (cm)		0,68	2,01	3,22	3,36
CV (%)		15,27	5,79	25,49	28,34

Las cepas de *Trichoderma* que presentaron un mayor crecimiento en el día uno frente al patógeno *Fusarium* spp. fue la cepa 3 de *Trichoderma* proveniente de los suelos cultivados con *Glyphsophila*, en el día cuarto existen radios comprendidos entre 3,27cm a 3,41cm del antagonista; estos radios no se diferencia entre si, ya que a medida que transcurrieron los días de evaluación las cepas del antagonista vs patógeno se toparon y los radios se estabilizaron para dar paso a otras reacciones de antagonismo como es la lisis de hifas, esporulación y también la población del antagonista *Trichoderma* sobre el patógeno *Fusarium* (Cuadro 12).

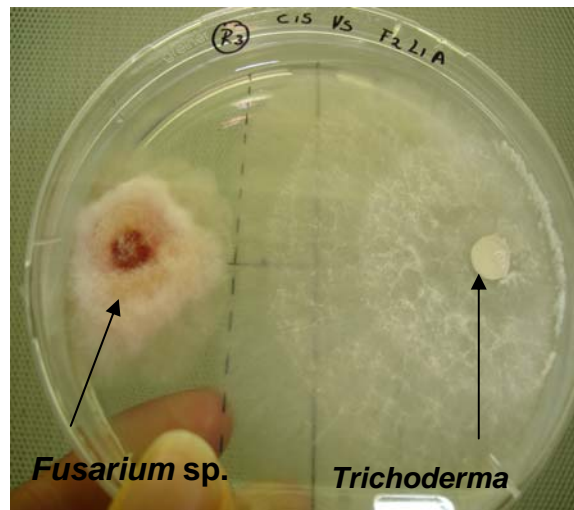


Figura 7. Prueba de antagonismo *Fusarium* sp. vs *Trichoderma* (Cepa F2L1A) IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Fernández y Larrea, (2001) comprobaron que el parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, la producción de haustorios y desorganización del contenido celular. Se observa hiperparasitismo y en muchos casos incremento de la esporulación cuando crece sobre el patógeno lo mismo que

ocurrió a partir del tercer día de evaluación entre *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. se determinó el incremento de esporulación a medida que transcurría el tiempo hasta llegar a los ocho días de evaluación.

En la figura 7 se puede apreciar el desarrollo del hongo antagónico *Trichoderma* spp., frente a *Fusarium* sp., observando que *Trichoderma* se desarrolló de forma más agresiva en la caja petri, y el hongo patógeno se mantuvo con un desarrollo muy lento frente a la presencia de *Trichoderma*, también se puede apreciar la formación en la mitad de cada uno de los hongos de un halo inhibitorio, entre los dos hongos. Cabe mencionar que cada una de las siete cepas de *Trichoderma* actuó de forma diferente frente a las diferentes cepas del patógeno figura 8, este comportamiento diferente se observó por su manera de generar esporas al invadir el patógeno.

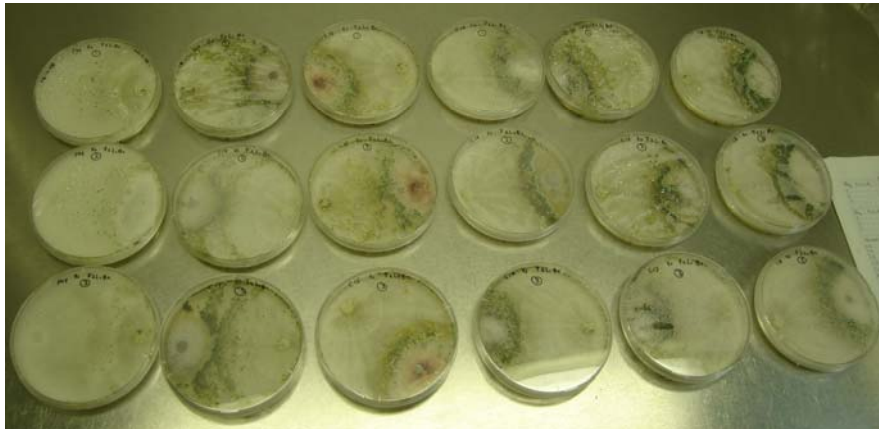


Figura 8. Prueba de antagonismo *Fusarium* spp. vs *Trichoderma* spp., IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 12. Prueba de Duncan al 5% para el crecimiento radial en dirección al patógeno de 7 cepas de *Trichoderma* spp. frente a 5 cepas del patógeno *Fusarium* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	DÍAS DE EVALUACIÓN			
	1	2	3	4
C1F2 L18B1	0,57 e	1,97 b	3,24	3,41
C2F3 B7A	0,65 d	2,05 b	3,34	3,40
C3F2 L1A	0,84 a	2,29 a	3,33	3,38
C4F3 B3B1	0,75 b	2,07 b	3,15	3,37
C5F2 L1B2	0,55 e	1,87 c	3,18	3,33
C6F2 L1A3	0,68 cd	1,77 d	3,01	3,27
C7F2 L18B3	0,72 bc	2,04 b	3,27	3,36

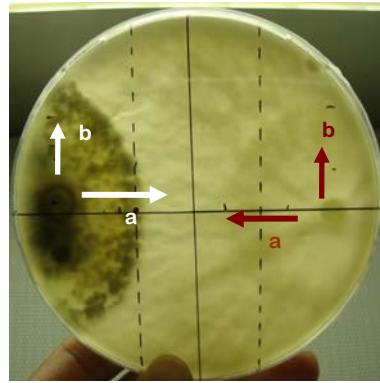


Figura 9. Direcciones de toma de datos para *Trichoderma* spp. y *Fusarium* sp.

Se puede notar que los dos primeros días no existe una diferenciación entre las dos direcciones (a) y (b) del antagonista *Trichoderma* a (figura 9), las diferencias entre estas dos direcciones están dadas los días 3 y 4, esto se debe a que el antagonista rodeo al patógeno mostrando mayor dimensión la dirección (b) que estuvo en dirección al patógeno (Cuadro 13).

CUADRO 13. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento radial de *Trichoderma* spp. en dos direcciones, dirección al patógeno (a) y su perpendicular (b). IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS		DÍAS DE EVALUACIÓN			
		1	2	3	4
T1	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,57	1,93	3,67 a	4,13 a
T2	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,47	1,77	2,50 b	2,50 b
T3	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,53	1,93	3,77 a	4,33 a
T4	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,53	1,87	2,50 b	2,50 b
T5	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,63	2,07	4,23 a	4,30 a
T6	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,53	1,93	2,50 b	2,50 b
T7	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,70	2,17	4,03 a	4,23 a
T8	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,57	2,17	2,50 b	2,50 b
T9	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,60	2,00	4,17 a	4,57 a
T10	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,60	1,90	2,50 b	2,50 b
T11	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,63	2,00	3,93 a	4,03 a
T12	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,60	1,93	2,50 b	2,50 b
T13	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,57	1,93	4,23 a	4,43 a
T14	Fus1 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,60	1,87	2,50 b	2,50 b
T15	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,60	2,07	4,03 a	4,00 a
T16	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,63	2,13	2,50 b	2,50 b
T17	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,70	2,17	4,23 a	4,43 a
T18	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,73	2,17	2,50 b	2,50 b
T19	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,67	2,17	4,47 a	4,63 a
T20	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,73	2,10	2,50 b	2,50 b
T21	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,80	2,13	3,90 a	4,03 a
T22	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,83	2,07	2,50 b	2,50 b
T23	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,90	2,37	4,43 a	4,47 a
T24	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,60	2,30	2,50 b	2,50 b
T25	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,77	2,00	3,63 a	3,87 a
T26	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,80	2,03	2,50 b	2,50 b
T27	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,97	2,50	4,37 a	4,33 a
T28	Fus2 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,93	2,43	2,50 b	2,50 b
T29	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,93	2,50	2,50 b	2,50 b
T30	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,87	2,57	4,50 a	4,57 a
T31	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,70	1,87	3,17 a	3,73 a
T32	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,67	1,77	2,50 b	2,83 b
T33	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,70	2,17	3,97 a	4,20 a
T34	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,67	2,07	2,50 b	2,50 b
T35	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,80	2,17	3,97 a	4,20 a
T36	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,77	2,07	2,50 b	2,50 b
T37	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,73	2,10	3,77 a	4,23 a
T38	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,77	2,07	2,50 b	2,50 b
T39	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,83	2,20	4,17 a	4,50 a
T40	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,87	2,23	2,50 b	2,50 b
T41	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,50	1,77	3,67 a	3,93 a
T42	Fus3 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,53	1,83	2,50 b	2,50 b
T43	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,47	1,77	3,80 a	4,33 a
T44	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,50	1,70	2,50 b	2,50 b
T45	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,47	1,80	3,73 a	4,03 a
T46	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,53	1,90	2,50 b	2,50 b
T47	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,57	1,93	4,00 a	4,17 a
T48	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,60	1,83	2,50 b	2,50 b
T49	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,63	2,07	4,07 a	4,37 a
T50	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,73	2,07	2,50 b	2,50 b
T51	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,57	1,77	3,30 a	3,70 a
T52	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,57	1,70	2,50 b	2,50 b
T53	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,60	1,40	3,53 a	4,07 a
T54	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,73	1,40	2,50 b	2,50 b
T55	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,60	1,80	3,33 a	3,87 a
T56	Fus4 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,63	1,77	2,50 b	2,50 b
T57	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,73	1,90	3,77 a	4,17 a
T58	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,77	1,93	2,50 b	2,50 b
T59	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,80	1,93	3,67 a	4,40 a
T60	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,83	1,93	2,50 b	2,50 b
T61	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,67	1,87	3,57 a	4,03 a
T62	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,73	1,80	2,50 b	2,50 b
T63	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,73	1,93	3,93 a	4,20 a
T64	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,70	2,00	2,50 b	2,50 b
T65	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,80	2,17	4,27 a	4,17 a
T66	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,80	2,07	2,50 b	2,50 b
T67	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,73	2,13	4,10 a	4,17 a
T68	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,83	2,13	2,50 b	2,50 b
T69	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,60	2,13	4,37 a	4,53 a
T70	Fus5 vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,63	2,13	2,50 b	2,50 b

5.4.1.1 COMPORTAMIENTO DE *Fusarium* spp. FRENTE A *Trichoderma* spp. EN LA EVOLUCIÓN DE SIETE CEPAS DE *Trichoderma* spp. vs CINCO CEPAS DE *Fusarium* spp.

Al establecer el análisis de varianza para el crecimiento de 5 cepas del patógeno *Fusarium* sp., bajo el efecto de 7 cepas de *Trichoderma* spp., en tratamientos se detectaron diferencias a nivel del 1% los días 1, 3 y 4; cabe destacar que el día 2 no se identificaron diferencias significativas. Dentro de las cepas de *Trichoderma* spp., no hubo diferencias significativas los días 1,2 y 4, presentando diferencias al nivel del 1% el día 3, mientras que para las cepas de *Fusarium* spp., se encontraron diferencias significativas a nivel del 5% en todos los días de evaluación; en la interacción Cepas de *Trichoderma* con *Fusarium*, se identificó al primer día de evaluación diferencias al nivel del 5% pero en los días subsiguientes no se identificaron diferencias significativas (Cuadro 14).

Se puede apreciar que en la prueba de antagonismo de *Fusarium moniliforme* var. *anthophilum* vs *Trichoderma* spp., del primero al tercer día no se encontró diferencias significativas, las diferencias significativas se presentaron en el cuarto día a nivel del 1% para las cepas 1, 2, 3, 5, 6 y 7 de *Trichoderma* sp. y una diferencia a nivel del 5% para la cepa 4 de *Trichoderma*; para el segundo grupo de C2 de *Fusarium oxysporum* vs *Trichoderma* spp., se puede notar una diferencia del 5% para la cepa 3 de *Trichoderma* en el primer día de evaluación en comparación a las otras cepas que no presentaron diferencias significativas, en el día dos y tres todas las cepas de *Trichoderma* no presentaron diferencias al cuarto día de evaluación existió

diferencias marcadas, así las cepas de *Trichoderma* 1, 3, 5, 6 y 7 tuvieron diferencias significativas a nivel del 1% y la cepa 4 de *Trichoderma* tuvo una diferenciación del 5%. En las evaluaciones de *Trichoderma* con la cepa 3 de *Fusarium* del primer al tercer día de evaluación no hubo diferencias significativas y al cuarto día ya se presentaron diferencias entre cada cepa de *Trichoderma* frente a *Fusarium* de la cepa 3, así las cepas 1,3 y 4 presentaron diferencias a nivel del 1%, mientras que las cepas de *Trichoderma* 2,5,6 y 7 no tuvieron diferencias significativas. El grupo que más variaciones entre las comparaciones fueron la de cepa 4 de *Fusarium* con las siete cepas de *Trichoderma* estas diferencias se encontraron en los cuatro días de evaluación (Cuadro 14).

Las cepas de *Fusarium* spp., mostraron variaciones de 0,60cm a 1,78cm del radio en dirección al antagonista con un coeficiente de variación (CV) de 55,11% a 11,41% (Cuadro 14).

CUADRO 14. Análisis de varianza para la capacidad de crecimiento del patógeno *Fusarium* sp. frente a 7 cepas de *Trichoderma* sp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DIAS DE EVALUACIÓN			
		1	2	3	4
TOTAL	209				
TRATAMIENTO	70	0,08**	0,53**	0,29**	0,42**
<i>Trichoderma-Fusarium</i>	34	0,08**	0,53**	0,29**	0,42**
CEPAS TRICHODERMA	6	0,02ns	0,09ns	0,07ns	0,12ns
CEPAS FUSARIUM	4	0,46**	0,81**	2,04**	2,95**
Cepas Trich.* Cepas Fus.	24	0,05**	0,44ns	0,05ns	0,07ns
<i>Fus1 vs Trichoderma sp1</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,48**
<i>Fus1 vs Trichoderma sp2</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,38**
<i>Fus1 vs Trichoderma sp3</i>	1	0,00ns	0,03ns	0,03ns	2,04**
<i>Fus1 vs Trichoderma sp4</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,01ns	0,20*
<i>Fus1 vs Trichoderma sp5</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,01ns	0,38**
<i>Fus1 vs Trichoderma sp6</i>	1	0,02ns	0,02ns	0,11ns	0,48**

<i>Fus1 vs Trichoderma sp7</i>	1	0,01ns	0,03ns	0,06ns	0,60**
<i>Fus2 vs Trichoderma sp1</i>	1	0,00ns	0,03ns	0,04ns	1,04**
<i>Fus2 vs Trichoderma sp2</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,04ns
<i>Fus2 vs Trichoderma sp3</i>	1	0,01ns	0,04ns	0,11ns	0,38**
<i>Fus2 vs Trichoderma sp4</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,01ns	0,17*
<i>Fus2 vs Trichoderma sp5</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,08ns	0,54**
<i>Fus2 vs Trichoderma sp6</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,03ns	0,24**
<i>Fus2 vs Trichoderma sp7</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,06ns	1,82**
<i>Fus3 vs Trichoderma sp1</i>	1	0,00ns	0,02ns	0,02ns	0,81**
<i>Fus3 vs Trichoderma sp2</i>	1	0,02ns	0,02ns	0,02ns	0,02ns
<i>Fus3 vs Trichoderma sp3</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,06ns	0,81**
<i>Fus3 vs Trichoderma sp4</i>	1	0,03ns	0,03ns	0,06ns	0,81**
<i>Fus3 vs Trichoderma sp5</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,03ns	0,03ns
<i>Fus3 vs Trichoderma sp6</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,02ns
<i>Fus3 vs Trichoderma sp7</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,14ns
<i>Fus4 vs Trichoderma sp1</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,88**
<i>Fus4 vs Trichoderma sp2</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,48**
<i>Fus4 vs Trichoderma sp3</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,14*	0,67**
<i>Fus4 vs Trichoderma sp4</i>	1	0,02ns	0,02ns	0,02ns	0,38**
<i>Fus4 vs Trichoderma sp5</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,03ns
<i>Fus4 vs Trichoderma sp6</i>	1	0,08*	0,08*	0,14*	0,48**
<i>Fus4 vs Trichoderma sp7</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,20*
<i>Fus5 vs Trichoderma sp1</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,38**
<i>Fus5 vs Trichoderma sp2</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,08ns	0,00ns
<i>Fus5 vs Trichoderma sp3</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,11ns	0,11ns
<i>Fus5 vs Trichoderma sp4</i>	1	0,04ns	0,04ns	0,14*	0,60**
<i>Fus5 vs Trichoderma sp5</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,01ns	1,93**
<i>Fus5 vs Trichoderma sp6</i>	1	0,01ns	0,01ns	0,01ns	0,04ns
<i>Fus5 vs Trichoderma sp7</i>	1	0,00ns	0,00ns	0,00ns	0,11ns
ERROR	175	0,01	0,32	0,03	0,13
\bar{X} (cm)		0,60	1,04	1,53	1,78
CV (%)		20,44	55,11	11,35	11,41

El patógeno *Fusarium moniliforme* var. *anthophilum* presenta mayor crecimiento promedio en los cuatro días de evaluación, esta cepa de *Fusarium* muestra un mayor crecimiento radial en dirección al antagonista que las otras cuatro cepas del patógeno, *Fusarium moniliforme* le sigue en segundo lugar con el mayor crecimiento radial, mientras que las tres cepas restantes presentaron radios en dirección al antagonista inferiores a 1,96cm (Cuadro 15).

CUADRO 15. Medidas del crecimiento radial de 5 cepas de *Fusarium* spp. frente a 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	DIAS DE EVALUACIÓN			
	1	2	3	4
C1 <i>F.moniliforme</i> var. <i>anthophilum</i>	0,73 a	1,18 a	1,78 a	2,05 a
C2 <i>Fusarium oxysporum</i>	0,60 b	1,20 a	1,53 b	1,76 b
C3 <i>Fusarium moniliforme</i>	0,65 b	1,09 ab	1,70 a	1,96 a
C4 <i>Fusarium</i> sp.	0,54 c	0,84 b	1,39 c	1,76 b
C5 <i>Fusarium solani</i>	0,46 d	0,90 b	1,25 d	1,36 c

En la figura 10 se puede identificar claramente el proceso de crecimiento de cada una de las cepas del patógeno *Fusarium* en la prueba de antagonismo, viendo claramente que *Fusarium moniliforme* var. *anthophilum* presentó un mayor crecimiento, *F. moniliforme* manifestó mayor habilidad de crecimiento que *F. oxysporum* frente a *Trichoderma*.

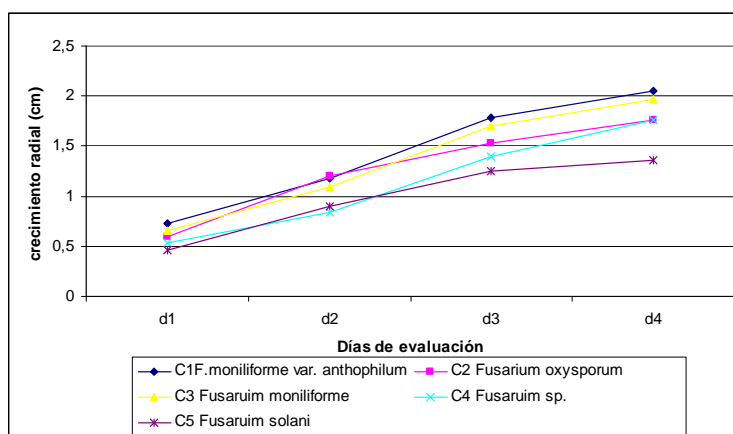


Figura 10. Crecimiento de 5 cepas del patógeno *Fusarium* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

El mayor crecimiento radial manifestó la cepa número 3 de *Trichoderma* alcanzando una dimensión de 0,64cm al primer día, cabe recalcar que las otras cepas se encuentran en un rango de entre 0,60cm a 0,57cm, el segundo día se pudo observar un crecimiento significativo de la cepa 6 de *Trichoderma* que alcanzó un crecimiento

de 1,30 cm y un crecimiento escaso desarrollado por la cepa 4 de *Trichoderma*, al finalizar la evaluación se observa que los mayores crecimientos radiales de las 7 cepas de *Trichoderma* spp., frente a *Fusarium* spp., lo tienen las cepas 3, 5, y 6 del hongo antagonista (Cuadro 16).

CUADRO 16. Prueba de Duncan al 5% para el crecimiento radial en dirección al patógeno de 7 cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	DIAS DE EVALUACIÓN			
	1	2	3	4
C1F2 L18B1	0,60	1,09 ab	1,53	1,74
C2F3 B7A	0,59	0,97 ab	1,52	1,72
C3F2 L1A	0,64	1,02 ab	1,61	1,84
C4F3 B3B1	0,58	0,94 b	1,50	1,74
C5F2 L1B2	0,59	1,01 ab	1,53	1,85
C6F2 L1A3	0,60	1,30 a	1,57	1,85
C7F2 L18B3	0,57	0,95 b	1,45	1,73

En base a lo analizado anteriormente se puede determinar que el crecimiento radial aumenta a medida que pasa el tiempo, así Ezziyyani *et al* (2004) demostraron que la zona de inhibición producida por *Trichoderma* spp. frente al patógeno, aumenta a medida que transcurre el tiempo. Este aumento que va acompañado de la destrucción del micelio fúngico y producción de esporas, esto se lo puede identificar como un control del crecimiento del patógeno.

Otros estudios realizados por Ochoa (2002) citado por López (2007) demostraron que las especies de *Trichoderma* spp. atacan a las hifas del hospedero por enrollamiento, enganchando o aprisionando las estructuras y penetrando en la pared celular del

hospedero, por secreción de enzimas líticas como proteinasas básicas, β -1,3-glucanasas y quitinasas. La actividad antifúngica de las enzimas quitinolíticas tiene un papel importante en la lisis de la pared celular de los hongos fitopatógenos.

En esta prueba se observó que el mayor crecimiento diametral tuvieron las siete cepas del antagonista *Trichoderma*, retardando el crecimiento de *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* var. *anthophilum*, *F. solani* y *Fusarium* sp., observando así el proceso de control del antagonista para el desarrollo del patógeno; con el transcurso del tiempo se observó un ataque total del antagonista al patógeno invadiéndolo por completo, estos efectos sobre las estructuras de los patógenos, pueden estar relacionados con la producción de enzimas tales como quitinasa, α -glucanasa, celulasa y proteasa por parte de las cepas de *Trichoderma*, y que son un componente importante en el proceso del micoparasitismo (De la Cruz *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1994; Harman, 2006). También hubo formación de una franja de alta producción de conidias de *Trichoderma* frente a la colonia del fitopatógenos (figura 11), el mismo que probablemente fue el resultado de un proceso de inhibición de naturaleza bioquímica entre el patógeno y el antagonista.

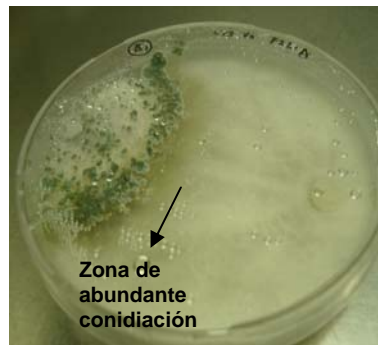


Figura 11. Proceso de esporulación de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 17. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento radial de *Fusarium* spp. en dos direcciones, dirección al antagonista (a) y su perpendicular (b). IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS		DÍAS DE EVALUACIÓN			
		1	2	3	4
T1	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,73	1,17	1,77	1,83b
T2	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,73	1,20	1,77	2,40a
T3	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,57	0,87	1,57	1,47b
T4	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,57	1,00	1,60	1,97a
T5	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,63	1,03	1,57	1,33b
T6	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,67	1,03	1,70	2,50a
T7	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,57	0,83	1,40	1,47
T8	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,63	0,93	1,47	1,83
T9	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,37	1,43	1,20	1,07b
T10	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,53	1,43	1,30	1,57a
T11	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,67	1,13	1,70b	1,70b
T12	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,83	1,23	1,97a	2,27a
T13	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,47	0,87	1,40	1,37b
T14	<i>Fus1</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,53	1,00	1,60	2,00a
T15	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,70	1,10	1,67	1,53b
T16	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,73	1,23	1,83	2,37a
T17	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,47	0,77	1,23	1,60
T18	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,50	0,77	1,33	1,77
T19	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,37b	0,73b	1,10b	1,03b
T20	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,60a	0,90a	1,37a	1,53a
T21	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,73	1,20	1,73	1,80
T22	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,73	1,20	1,80	2,13
T23	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,57	0,97	1,37b	1,40b
T24	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,57	0,97	1,60a	2,00a
T25	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,87	1,30	1,93	2,04
T26	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,80	1,23	2,00	2,43
T27	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,53	0,90	1,37	1,40b
T28	<i>Fus2</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,60	0,90	1,57	2,50a
T29	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,50	0,70	1,27	1,00b
T30	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,53	0,83	1,37	1,73a
T31	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,83	1,23	1,83	2,03
T32	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,67	1,13	1,83	2,13
T33	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,70	0,93	1,47	1,43b
T34	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,77	1,00	1,67	2,17a
T35	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,43	0,93	1,47	1,43b
T36	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,57	1,00	1,67	2,17a
T37	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,53	0,80	1,30	1,53
T38	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,47	0,73	1,17	1,67
T39	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,33	0,80	1,27	1,37
T40	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,50	0,80	1,30	1,47
T41	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,77	1,17	1,80	2,00
T42	<i>Fus3</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,73	1,13	1,77	2,30
T43	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,57	1,00	1,47	1,40b
T44	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,60	1,07	1,47	2,17a
T45	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,57	1,07	1,67	1,70
T46	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,60	1,10	1,77	2,27
T47	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,63	1,00	1,67	1,67b
T48	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,57	0,93	1,37	2,33a
T49	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,40b	0,77	1,13	1,10b
T50	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,50a	0,87	1,20	1,60a
T51	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,83	1,20	1,87	2,07
T52	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,73	1,20	1,83	2,20
T53	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,53b	0,97b	1,40	1,53b
T54	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,77a	1,17a	1,70	2,10a
T55	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,60	1,03	1,67	1,73
T56	<i>Fus4</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,60	1,07	1,67	2,10
T57	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (a)	0,57	0,93	1,47	1,63
T58	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp1 (b)	0,60	0,90	1,57	2,13
T59	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (a)	0,37	0,87	1,13	1,50
T60	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp2 (b)	0,43	0,97	1,37	1,47
T61	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (a)	0,63	1,13	1,50	1,80b
T62	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp3 (b)	0,63	1,17	1,77	2,07a
T63	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (a)	0,53	1,03	1,40	1,53b
T64	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp4 (b)	0,73	1,20	1,70	2,17a
T65	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (a)	0,70	1,13	1,57	1,37b
T66	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp5 (b)	0,63	1,00	1,60	2,50a
T67	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (a)	0,47	0,77	1,40	1,50
T68	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp6 (b)	0,40	0,57	1,13	1,67
T69	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (a)	0,43b	0,73	1,20	1,20b
T70	<i>Fus5</i> vs <i>Trichoderma</i> sp7 (b)	0,57a	0,73	1,23	1,47a

Las direcciones tomadas en dirección al antagonista (a) y su perpendicular (b) del patógeno *Fusarium* spp., no presenta diferencias entre estas en su mayoría, se distinguen que hay un número mínimo de tratamientos que muestran estos niveles de significación (Cuadro 17).

5.4.2 PRUEBA DE ANTAGONISMO DE SIETE CEPAS DE *Trichoderma* spp.

FRENTE A *Phytophthora* sp.

Al establecer el Análisis de varianza para el crecimiento diametral de siete cepas de *Trichoderma* aisladas de suelo de cultivo de flores de verano frente al patógeno *Phytophthora* sp, se encontró diferencias estadísticas para tratamientos a nivel del 1% en las evaluaciones realizadas el primero y segundo día de evaluación; entre cepas se diferenciaron a nivel del 1% en el primer día, pero se identificó una diferencia no significativa en el segundo día. Dentro de cada una de las cepas el crecimiento radial del antagonista en dirección al patógeno en el primer día no es significativo y el segundo día dentro de cada una de las cepas se encuentran diferencias significativas a nivel del 1% de acuerdo al cuadro 18.

Se apreció que los crecimientos radiales de las siete cepas de *Trichoderma* dentro de la caja petri frente al patógeno *Phytophthora* fueron incrementándose de 0,82cm en el primer día de evaluación a 1,79cm; desde el punto de vista de crecimiento se puede identificar un desarrollo muy lento, por esto en el segundo día no se observó mayor incremento debido a la agresividad con la que creció el patógeno alcanzando un área

mayor en toda la caja petri dejando un espacio pequeño para el desarrollo del hongo antagonista, también se aprecia un CV entre 12,88% a 5,56% (Cuadro18).

CUADRO 18. Análisis de varianza para el crecimiento radial en dirección al patógeno, de 7 cepas de *Trichoderma* spp. frente *Phytophthora* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DÍAS DE EVALUACIÓN	
		1	2
TOTAL	41		
TRATAMIENTO	(13)	0,06 **	1,63 **
CEPAS TRICHODERMA	6	0,11 ns	0,04 **
C1 F2L18B1 <i>Phytophthora</i>	1	0,01 ns	3,48 **
C2 F3B7A <i>Phytophthora</i>	1	0,03 ns	2,94 **
C3 F2L1A <i>Phytophthora</i>	1	0,03 ns	3,08 **
C4 F3B3B1 <i>Phytophthora</i>	1	0,00 ns	3,38 **
C5 F2L1B2 <i>Phytophthora</i>	1	0,00 ns	3,23 **
C6 F2L1A3 <i>Phytophthora</i>	1	0,04 ns	2,67 **
C7 F2L18B3 <i>Phytophthora</i>	1	0,00 ns	1,82 **
ERROR	28	0,01	0,01
\bar{X} (cm)		0,82	1,79
CV (%)		12,88	5,56

La cepa 3 de *Trichoderma* F2L1A logró alcanzar en el primer día su mayor crecimiento radial, sin embargo, la cepa 7 mostró un crecimiento significativo en la evaluación el primer día y segundo día de 0,88cm a 1,95cm; el menor desarrollo presentó la cepa 1 de *Trichoderma* los días 1 y 2 (Cuadro19).

CUADRO 19. Crecimiento radial de 7 cepas de *Trichoderma* spp. en dirección a *Phytophthora* spp. Duncan 5%. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	DÍAS DE EVALUACIÓN	
	1	2
C1F2L18B1	0,57 c	1,70
C2F3B7A	0,80 b	1,80
C3F2L1A	1,00 a	1,78
C4F3B3B1	0,87 ab	1,75
C5F2L1B2	0,78 b	1,77
C6F2L1A3	0,85 b	1,83
C7F2L18B3	0,88 ab	1,95

Dentro de cada una de las cepas de *Trichoderma* en estudio, el menor crecimiento al controlar el patógeno *Phytophthora* lo presentó la cepa 1 proveniente del suelo de cultivo de *Delphinium*, dentro de la evaluación el menor desarrollo radial presentó el antagonista debido a un acelerado crecimiento mostrado por el patógeno (Cuadro19).

Ezziyyani *et al* (2004) demostraron que *Trichoderma* spp. tiene un efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* en cultivos duales *in vitro*, sobre todo en medio PDA enriquecido con laminarina-glucosa, donde aumentó su actividad antifúngica mediante la secreción de la enzima hidrolítico (β -1,3-glucanasa), Mencionan que la intensidad de inhibición *in vitro* varió según medio de cultivo, temperatura y pH.

CUADRO 20. Tratamientos para el crecimiento radial de 7 cepas de *Trichoderma* spp. en dos direcciones, dirección al patógeno (a) y su perpendicular (b). IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS	CEPAS	DIAS DE EVALUACIÓN	
		1	2
T1	C1 F2L18B1 (a)	0,60	0,90 b
T2	C1 F2L18B1 (b)	0,53	2,50 a
T3	C2 F3B7A (a)	0,87	1,10 b
T4	C2 F3B7A (b)	0,73	2,50 a
T5	C3 F2L1A (a)	0,93	1,07 b
T6	C3 F2L1A (b)	1,07	2,50 a
T7	C4 F3B3B1 (a)	0,87	1,00 b
T8	C4 F3B3B1 (b)	0,87	2,50 a
T9	C5 F2L1B2 (a)	0,80	1,03 b
T10	C5 F2L1B2 (b)	0,77	2,50 a
T11	C6 F2L1A3 (a)	0,77	1,17 b
T12	C6 F2L1A3 (b)	0,93	2,50 a
T13	C7 F2L18B3 (a)	0,87	1,40 b
T14	C7 F2L18B3 (b)	0,90	2,50 a

El primer día se observó un desarrollo muy agresivo del patógeno *Phytophthora* sp., frente a *Trichoderma* sp., poco a poco se formó una franja con gran cantidad de conidias y se observó un crecimiento muy lento del antagonista en comparación al patógeno, también se apreció la invasión del antagonista al patógeno terminando en una invasión total del antagonista sobre el patógeno, así se observó una esporulación alta a medida que se daba este proceso, de igual forma Stefanova *et al* (1999) usando *Trichoderma* spp para controlar hongos fitopatógenos del suelo determinaron que los metabolitos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* provocaron un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia de *Phytophthora nicotianae* y otros hongos fitopatógenos.

5.4.2.1 CRECIMIENTO DEL PATÓGENO *Phytophthora* sp. FRENTE A 7 CEPAS DE *Trichoderma* spp.

Al establecer el análisis de varianza para el crecimiento de *Phytophthora* bajo el efecto de siete cepas de *Trichoderma* sp., con dos medidas una en dirección al antagonista y otra en dirección perpendicular, se detectaron diferencias estadísticas a nivel del 1% en los tratamientos evaluados en dos días, dentro de las cepas no existió diferencias significativas (Cuadro 21).

Se aprecia que los CV fueron 3,47% a 2,60% para la primera y segunda evaluación respectivamente se los puede considerar como valores óptimos en un proceso de investigación de esta naturaleza; además se determinaron promedios de crecimiento radial en dirección al antagonista de entre 3,47cm a 3,62cm (Cuadro 21).

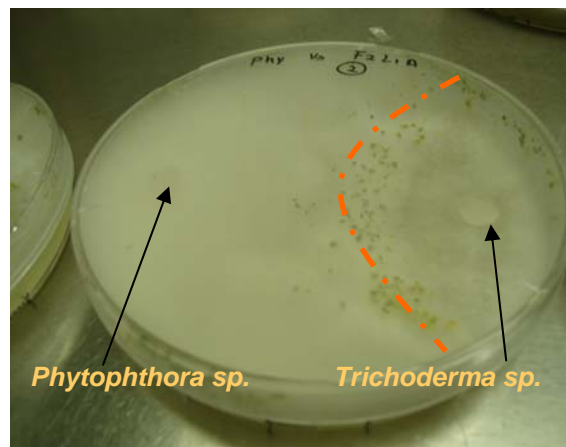


Figura 12. Crecimiento del patógeno *Phytophthora* sp. frente a *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 21. Análisis de varianza para el crecimiento radial del patógeno *Phytophthora* sp. en dirección a siete cepas del antagonista *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DIAS DE EVALUACIÓN	
		1	2
TOTAL	41		
TRATAMIENTO	(13)	3,05**	4,05**
CEPAS TRICHODERMA	6	0,00ns	0,02ns
<i>Phytophthora</i> C1 F2L18B1	1	6,00**	8,88**
<i>Phytophthora</i> C2 F3B7A	1	5,42**	7,04**
<i>Phytophthora</i> C3 F2L1A	1	5,23**	7,48**
<i>Phytophthora</i> C4 F3B3B1	1	5,61**	8,17**
<i>Phytophthora</i> C5 F2L1B2	1	5,61**	6,83**
<i>Phytophthora</i> C6 F2L1A3	1	5,80**	7,04**
<i>Phytophthora</i> C7 F2L18B3	1	6,00**	7,04**
ERROR	28	0,01	0,01
\bar{X} (cm)		3,47	3,62
CV (%)		3,47	2,60

Phytophthora manifestó un crecimiento homogéneo que va de 3,43cm a 3,50cm de radio en dirección horizontal al patógeno inoculado en el primer día y de 3,57cm a 3,72cm en el segundo día; no obstante, se aprecia que el menor desarrollo lo tuvieron las cepas 1 y 3 de *Trichoderma* cada una de estas cepas provienen de un suelo con cultivos de *Delphinium* y *Gypsophila*, respectivamente, esto en lo referente al crecimiento diametral ya que luego hubo un fuerte ataque por parte de *Trichoderma*, una de las causas para que se de la inhibición diametral del patógeno, es la producción de metabolitos volátiles producidos por las cepas de *Trichoderma* provocando así un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia de *Phytophthora* (Cuadro 22).

CUADRO 22. Prueba de Duncan al 5% para el crecimiento radial del patógeno *Phytophthora* sp. en dirección a 7 cepas del antagonista *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS	DIAS DE EVALUACIÓN	
	1	2
<i>Phytophthora</i> _ C1 F2L18B1	3,50	3,72
<i>Phytophthora</i> _ C2 F3B7A	3,45	3,58
<i>Phytophthora</i> _ C3 F2L1A	3,43	3,62
<i>Phytophthora</i> _ C4 F3B3B1	3,47	3,67
<i>Phytophthora</i> _ C5 F2L1B2	3,47	3,57
<i>Phytophthora</i> _ C6 F2L1A3	3,48	3,58
<i>Phytophthora</i> _ C7 F2L18B3	3,50	3,58

El crecimiento del patógeno *Phytophthora* como ya se mencionó tuvo un crecimiento muy agresivo es por eso que se presentan diferencias muy marcadas entre las dos direcciones evaluadas, tanto en el primero como en el segundo día de evaluación la dirección del patógeno en dirección al antagonista es mayor (Cuadro 23).

CUADRO 23. Tratamientos para el crecimiento radial de *Phytophthora* sp. en dos direcciones, dirección al antagonista (a) y su perpendicular (b). IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS	CEPAS	DIAS DE EVALUACIÓN	
		1	2
T1	<i>Phyt</i> _C1 F2L18B1 (a)	4,50 a	4,93 a
T2	<i>Phyt</i> _C1 F2L18B1 (b)	2,50 b	2,50 b
T3	<i>Phyt</i> _C2 F3B7A (a)	4,40 a	4,67 a
T4	<i>Phyt</i> _C2 F3B7A (b)	2,50 b	2,50 b
T5	<i>Phyt</i> _C3 F2L1A (a)	4,37 a	4,73 a
T6	<i>Phyt</i> _C3 F2L1A (b)	2,50 b	2,50 b
T7	<i>Phyt</i> _C4 F3B3B1 (a)	4,43 a	4,83 a
T8	<i>Phyt</i> _C4 F3B3B1 (b)	2,50 b	2,50 b
T9	<i>Phyt</i> _C5 F2L1B2 (a)	4,43 a	4,63 a
T10	<i>Phyt</i> _C5 F2L1B2 (b)	2,50 b	2,50 b
T11	<i>Phyt</i> _C6 F2L1A3 (a)	4,47 a	4,67 a
T12	<i>Phyt</i> _C6 F2L1A3 (b)	2,50 b	2,50 b
T13	<i>Phyt</i> _C7 F2L18B3 (a)	4,50 a	4,67 a
T14	<i>Phyt</i> _C7 F2L18B3 (b)	2,50 b	2,50 b

En forma general se aprecia una competencia del hongo antagonista frente a su patógeno por espacio y nutrientes, de igual manera Dubos (1987) menciona que la actividad de *Trichoderma* se debe a la secreción de sustancias antibióticas o metabolitos que inhiben la acción de parasitismo de cada uno de los patógenos y determina la competencia por nutrientes del sustrato en este caso PDA, explica un efecto antagónico de *Trichoderma*, esto ocurre por que los dos hongos requieren el mismo recurso y esto hace que el recurso sea menor para uno de los dos, la competencia se produce por nutrientes esenciales como carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico.

Phytophthora mostró un crecimiento agresivo, por esta razón se evaluó en dos días donde se toparon el patógeno y el antagonista; sin embargo, a medida que transcurría el tiempo *Trichoderma* cubrió completamente el área del patógeno esporulando sobre este (Figura 13), así en una investigación realizada por Ezziyyani, 2004, observó que la capacidad antagónica de *Trichoderma* se mantuvo creciendo hasta el sexto día lo que demostró que *P. capsici* había dejado de crecer mientras que *Trichoderma harzianum* tenía un buen micoparasitismo, en la fase inicial de dicha investigación *Trichoderma* fue capaz de detener al patógeno a distancia y posteriormente a la detención, inició la secreción de sustancias antifúngicas (enzimas y antibióticos) para competir eficientemente por espacio y nutrientes, continuó creciendo hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno e incluso esporulando sobre este. Los metabolitos causan a nivel celular vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Stefanova *et al*, 1999).

Por esta razón Stefanova *et al.*, (1999), hacen hincapié en que las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades en este sentido como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que atribuyen los cambios estructurales a nivel celular.

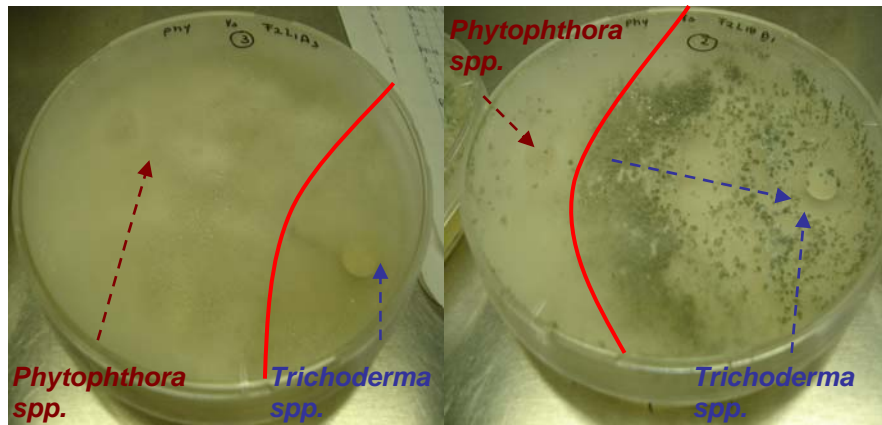


Figura 13. Invasión de *Trichoderma* spp. a *Phytophthora* sp, IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

5.5 EVALUACIÓN DE EFECTO ANTAGÓNICO DE SIETE CEPAS DE *Trichoderma* spp., EN FUNCIÓN DE LA ESCALA DE BELL.

En base a la escala de evaluación para establecer la eficiencia de *Trichoderma* formulada por Bell (1982) *et al* citada por Baker & Cook (1983); y de acuerdo al criterio de evaluación en esta investigación se determinó que las 7 cepas de *Trichoderma* sp., se encuentran entre la escala 1 y 2 que indican gran capacidad antagonica. En base a esto las cepas 1 y 7 provenientes de suelo con de cultivo de *Delphinium*, la cepa 4 proveniente de suelo con cultivo de *Aster* y la cepa 5 aislada de suelo con cultivo de *Gypsophila* se encuentran dentro de la escala 1 que establece que

Trichoderma spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo. Las cepas 2, 3 y 6 aisladas de suelo con cultivos de *Aster*, y *Gypsophila* se encuentran en la escala 2 que establece que *Trichoderma* spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo (Figura 14).

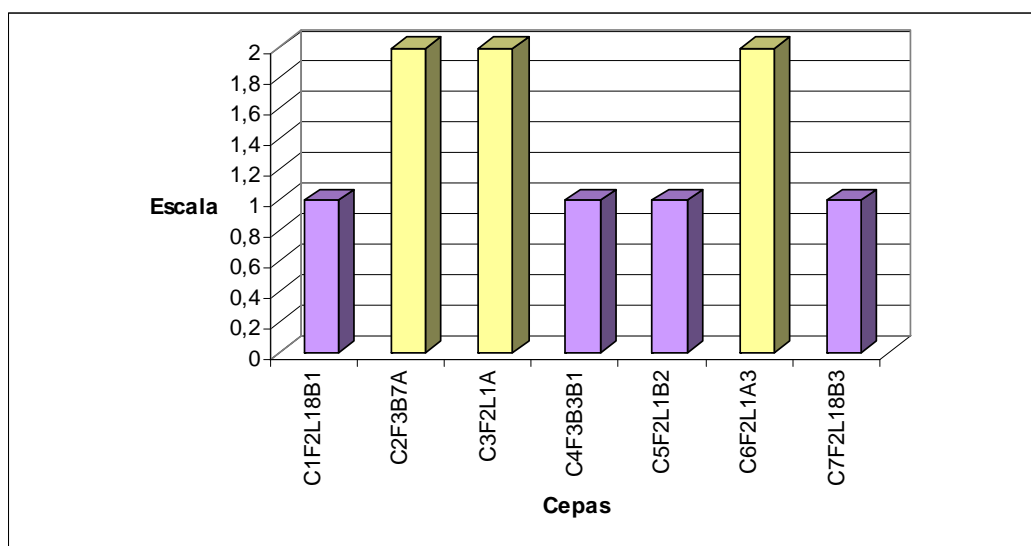


Figura 14. Capacidad antagónica de 7 cepas de *Trichoderma* spp., de acuerdo a la escala establecida por Bell *et al* (1982) citado por Baker & Cook (1983).

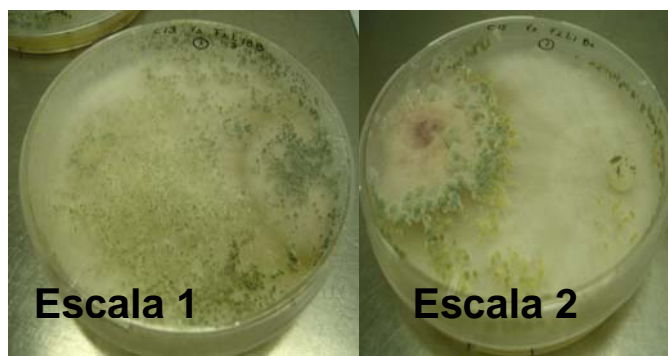


Figura 15. Escala 1 y 2 establecida por Bell *et al* (1982). IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Se evaluó la agresividad de los antagonistas en función de la escala de Bell *et al* (1982) citado por Baker & Cook (1983), así en los diferentes tratamientos las cepas de *Trichoderma*, mostraron grados de antagonismo de 1 y 2, los hongos que se encuentran en este grado se consideran altamente antagonistas figura 15.

5.6 PRUEBAS DE TOLERANCIA DE SIETE CEPAS DE *Trichoderma sp.*, A SEIS PRODUCTOS QUÍMICOS

Las evaluaciones del crecimiento de las cepas del hongo, se las efectuó durante ocho días, cada 24 horas. El análisis de varianza presenta una significación al 1% para los tratamientos, de esta forma se determinó que las cepas de *Trichoderma* se diferenciaron en su desarrollo. También se apreció una significación del 1% a nivel de los productos químicos utilizados como Maneb, Captan 80, Dithane, Score, Daconil y Carbendazim para este ensayo, las interacciones entre cepas x producto, cepas x dosis, dosis x producto y cepas x dosis x producto también presentaron diferencias significativas a nivel del 1% (Cuadro 24).

Los promedios de crecimiento diametral de las diferentes cepas de *Trichoderma spp.*, estuvieron comprendidos entre 0.08cm y 3,21cm de crecimiento diametral durante los ocho días de evaluación días hasta invadir toda la caja petri, los coeficientes de variación estuvieron comprendidos entre el 60,09% y 10,68 % estos valores fueron disminuyendo a medida que fueron transcurriendo los días de evaluación (Cuadro 24).

CUADRO 24. Análisis de Varianza para tolerancia de 7 cepas de *Trichoderma* spp. a 6 productos químicos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACION	GL	DIAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
TOTAL	377								
TRATAMIENTO	125	0,09**	0,82* *	2,74* *	6,61* *	12,12 **	15,40 **	18,70 **	22,00 **
CEP. <i>Trichoderma</i>	6	0,41**	1,37* *	3,92* *	9,97* *	20,03 **	22,30 **	26,93 **	25,09 **
DOSIS	2	0,02**	0,46 **	1,11* *	4,12* *	7,81* *	10,97 **	11,16 **	13,37 **
PRODUCTO	5	0,59**	13,92 **	49,70 **	119,7 4**	218,3 4**	294,8 2**	372,9 8**	454,3 4**
CEPAS * DOSIS	12	0,01**	0,04 ns	0,25* *	0,66* *	1,15* *	1,14* *	0,74* *	0,84* *
CEPAS*PRODUCTO	30	0,11**	0,46 **	1,55* *	3,71* *	6,59* *	6,21* *	6,02* *	5,24* *
DOSIS* PRODUCTO	10	0,07**	0,47 **	0,92* *	1,83* *	3,27* *	5,03* *	6,43* *	9,69* *
C*D*P	60	0,02**	0,07 **	0,16* *	0,37* *	0,73* *	0,76* *	0,58* *	0,62* *
ERROR	252	0,00	0,02	0,06	0,18	0,27	0,27	0,17	0,12
\bar{X} (cm)		0,08	0,51	0,94	1,47	2,00	2,41	2,79	3,21
CV (%)		60,09	28,98	26,40	28,62	26,12	21,48	14,73	10,68

Determinar la tolerancia de las siete cepas de *Trichoderma* a fungicidas es muy importante ya que a partir de esto se puede establecer una planificación de aplicaciones químicas y biológicas para un control eficiente de los patógenos sin perjudicar a hongos benéficos como es *Trichoderma*, así Lewis y Papavizas, (1980) manifiestan que la aplicación de un programa de control integrado que combine las herramientas actualmente empleadas en el control químico con aquellos agentes de biocontrol que se hayan mostrado eficaces en reducir la incidencia de la enfermedad permitiría prolongar el intervalo entre aplicaciones sucesivas.

5.6.1 CRECIMIENTO DIAMETRAL DE 7 CEPAS DE *Trichoderma* EN PRUEBA DE TOLERANCIA A 6 PRODUCTOS QUÍMICOS

En relación al análisis de varianza (cuadro 24), se ve que las cepas de *Trichoderma* mostraron una diferencia significativa a nivel del 1%. Al aplicar la prueba de Duncan al 5 % para las evoluciones realizadas los día 1, 4, 5 y 6 se conformaron cuatro rangos de diferenciación correspondiendo el mayor (a) para la cepa 7, que manifestó un mejor comportamiento, es decir, presentó una mayor tolerancia a los fungicidas seleccionados para esta investigación, de igual forma sucedió en los días 2 y 3 que conformaron tres rangos de diferenciación, mientras en los dos últimos días de evaluación se establecieron 5 rangos de diferenciación (Cuadro 25).

CUADRO 25. Promedios del crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp., analizadas mediante la prueba de Duncan al 5% IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CEPAS	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2L18B1	0,00d	0,54b	0,99b	1,68b	2,28b	2,70b	3,27b	3,79b
C2F3B7A	0,15b	0,59b	0,99b	1,46c	1,96c	2,36c	2,73c	3,26c
C3F2L1A	0,09c	0,39c	0,69c	1,03d	1,37d	1,71d	1,95e	2,35e
C4F3B3B1	0,09c	0,39c	0,74c	1,06d	1,44d	1,84d	2,16d	2,65d
C5F2L1B2	0,01d	0,34c	0,66c	1,09d	1,46d	1,84d	2,20d	2,59d
C6F2L1A3	0,01d	0,53b	1,06b	1,95a	2,77a	3,22a	3,52a	3,77b
C7F2L18B3	0,24a	0,81a	1,43a	2,04a	2,74a	3,18a	3,67a	4,05a

En la figura 16, se aprecia la secuencia de crecimiento de cada una de las cepas frente a la aplicación de seis productos químicos, mostrando de esta manera que la cepa con mayor agresividad para su desarrollo en presencia de estos químicos fue la cepa 7 la

misma que fue aislada de un suelo con cultivo de *Delphinium*, también se destacó la cepa 6 proveniente de un suelo con cultivo de *Gypsophila* al igual que la cepa 1.

Las cepas de *Trichoderma* que mostraron un mayor desarrollo en presencia de fungicidas lo hicieron de una manera armónica con crecimiento gradual conforme fue identificado durante las evaluaciones diarias con respecto a esto Mónaco (2001), determinó que al ser las cepas tolerantes a los fungicidas probados, su supervivencia después de un tratamiento con estos podría complementar el control químico mediante mecanismos de biocontrol, también la tolerancia a los fungicidas ensayados hace suponer que las cepas aisladas de suelo con cultivo de flores de verano pueden ejercer un biocontrol natural sin perder esta cualidad.

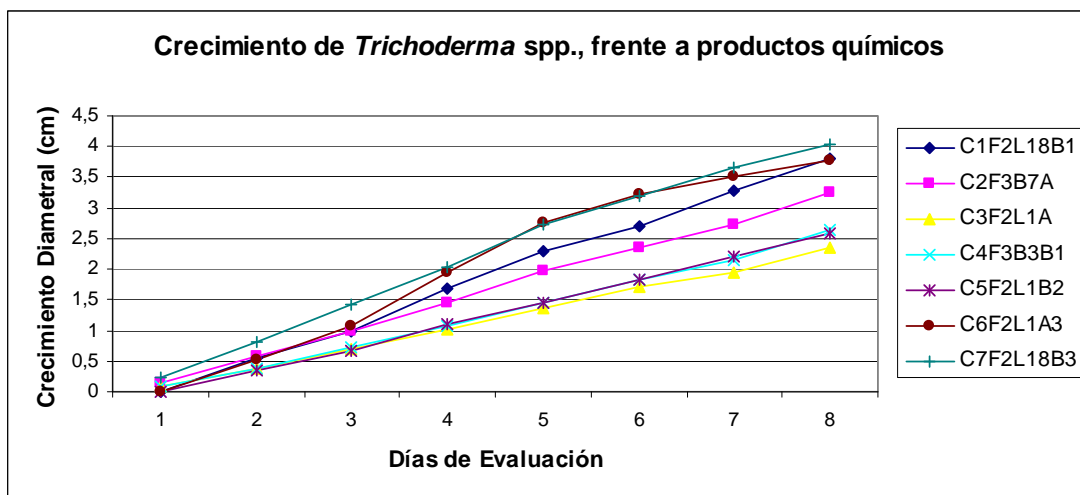


Figura 16. Crecimiento de 7 cepas de *Trichoderma* spp., frente a 6 productos químicos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Se determinó la sensibilidad *in vitro* de siete cepas de *Trichoderma* a Captan 80, Dithane FMB, Carbendazim, Daconil, Score, Maneb, estas cepas fueron aisladas de

suelo con cultivos de flores de verano y manifestaron diferentes reacciones a los tratamientos, no obstante, Score en forma general inhibió el crecimiento diametral de las siete cepas durante los 7 días de evaluación, mientras que los tratamientos en los que se vio el mejor crecimiento de las siete cepas fue en los tratamientos correspondiente a Dithane, se pudo observar que a mas de tener un buen desarrollo también hubo una alta producción de esporas de *Trichoderma* spp., esto se corrobora con lo descrito por Durán *et al*, (2007) y otros autores quienes verificaron distintos grados de incompatibilidad de *Trichoderma* en contacto directo con diferentes fungicidas.

Al establecer el análisis funcional de Duncan al 5% se identificó la presencia de 4 rangos de significación para el primer día de evaluación, y del segundo al séptimo día 6 rangos, destacándose de manera general el producto 2 que fue Dithane FMB, el mismo que presentó el mayor rango (a), este producto permitió un promedio de crecimiento diametral de 0,23cm a 6,77cm en las diferentes cepas de *Trichoderma*; el producto que controló al antagonista fue Score, puesto que en presencia de este producto hubo un crecimiento muy pobre de la cepas, así se identificaron diámetros entre 0,01cm a 0,42cm de diámetro (Cuadro 26).

CUADRO 26. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* sp., en la prueba de tolerancia a 6 productos químicos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

PRODUCTOS		DIAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
P1	Captan 80	0,15b	0,54c	0,88c	1,23c	1,59c	1,88c	2,13c	2,54c
P2	Dithane FMB	0,23a	1,28a	2,35a	3,64a	4,86a	5,48a	6,07a	6,77a
P3	Maneb	0,11c	0,81b	1,63b	2,64b	3,72b	4,72b	5,58b	6,34b
P4	Score	0,01d	0,04f	0,04f	0,16f	0,24f	0,29d	0,33f	0,42e
P5	Daconil	0,00d	0,24d	0,42d	0,69d	0,98d	1,27e	1,60d	1,93d
P6	Carbendazim	0,00d	0,16e	0,26e	0,47e	0,62e	0,80f	1,01e	1,26e

En la figura 17, se aprecia de manera evidente que las cepas de *Trichoderma* tuvieron un mejor desarrollo en los tratamientos que se utilizó el producto químico Dithane FMB en tres dosis; es decir no se dio un control eficaz de *Trichoderma* spp. El producto que presentó el menor desarrollo de las cepas del antagonista *Trichoderma* fue Score, debido a que este producto químico es un fungicida sistémico con acción de contacto, tiene características tanto protectantes como curativas y erradicativas. Se puede mencionar que el fungicida Dithane podría aplicarse en combinación con las cepas de *Trichoderma* probadas o de manera intercalada, lo que no ocurre con Score ya que este podría inhibir el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* reduciéndose la población de este hongo, y en consecuencia su eficiencia como agente de biocontrol.

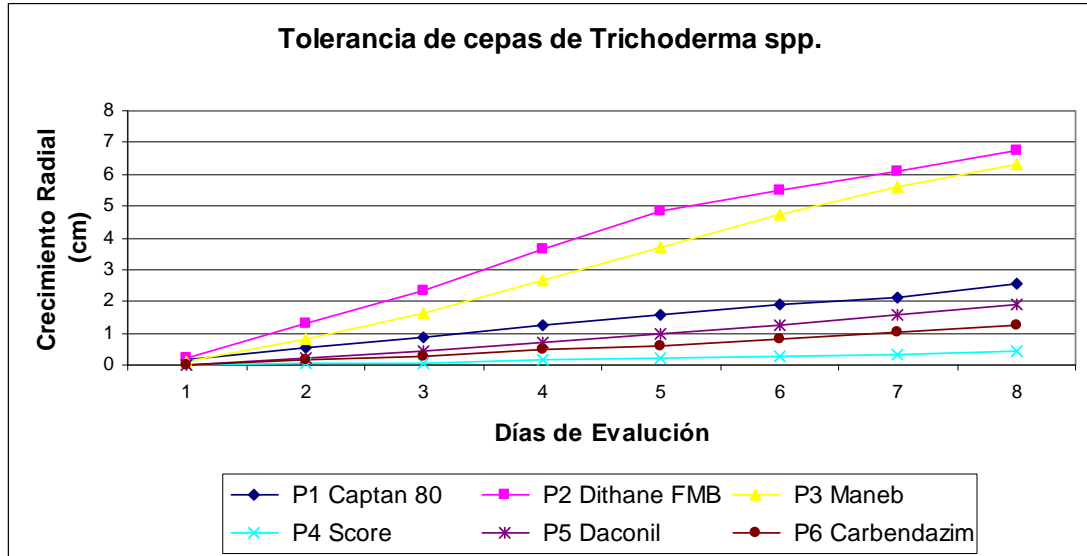


Figura 17. Efecto de 6 productos químicos en el desarrollo diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Se puede apreciar de manera general, un comportamiento lógico de los tratamientos, cuando estos fueron preparados con diferentes dosis; en efecto, las cepas de *Trichoderma* spp., tuvieron un mayor crecimiento diametral que con dosis bajas, mientras que con dosis altas tuvieron un crecimiento menor (Cuadros 27-32).

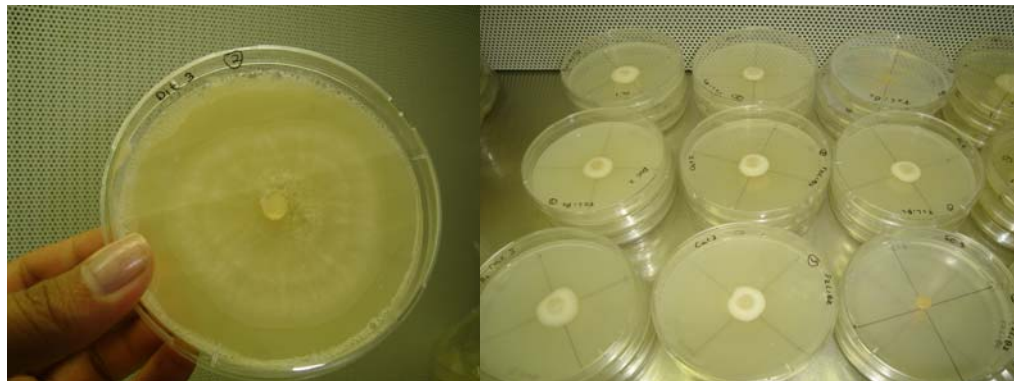


Figura 18. Efecto de 6 productos químicos en el desarrollo diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 27. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de *Trichoderma* spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Captan 80. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Captan 80		DÍAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D1F	2,0 g/l	0,06b	0,24c	0,44c	0,62c	0,80c	0,94c	1,01c	1,20c
D2	1,5 g/l	0,14b	0,52b	0,87b	1,20b	1,49b	1,72b	1,89b	2,21b
D3	1,0 g/l	0,26a	0,84a	1,32a	1,89a	2,47a	2,98a	3,50a	4,21a

En la figura 19 se observan diferencias en el crecimiento diametral con la aplicación de captan a diferentes dosis. La dosis utilizada por la finca (2,0 g/l) produce un menor crecimiento diametral en comparación con las otras dosis; sin embargo, por lo anotado en el cuadro 27 en promedio el crecimiento diametral que alcanzaron las cepas de *Trichoderma* fue de 1,20cm a 4,21cm, para la dosis mayor y menor respectivamente. Yang *et al.*, (2008), determinaron que los tratamientos que contenían dosis de 0,04g/l fueron los que mejor desarrollo presentaron en el crecimiento diametral, los resultados indicaron que las altas concentraciones de captan fueron los responsables de la reducción del insipiente creamiento presentado por *Trichoderma* spp.

Captan es un producto que puede inhibir muchas enzimas oxidativas, carboxilasas y enzimas implicadas en el metabolismo del fósforo y en la síntesis de citratos. De esto puede resultar la inactivación de numerosas enzimas y coenzimas, principalmente de aquellas que contienen grupos sulfhídricos consecuentemente afectar a los procesos metabólicos mencionado por Oleas (2004).

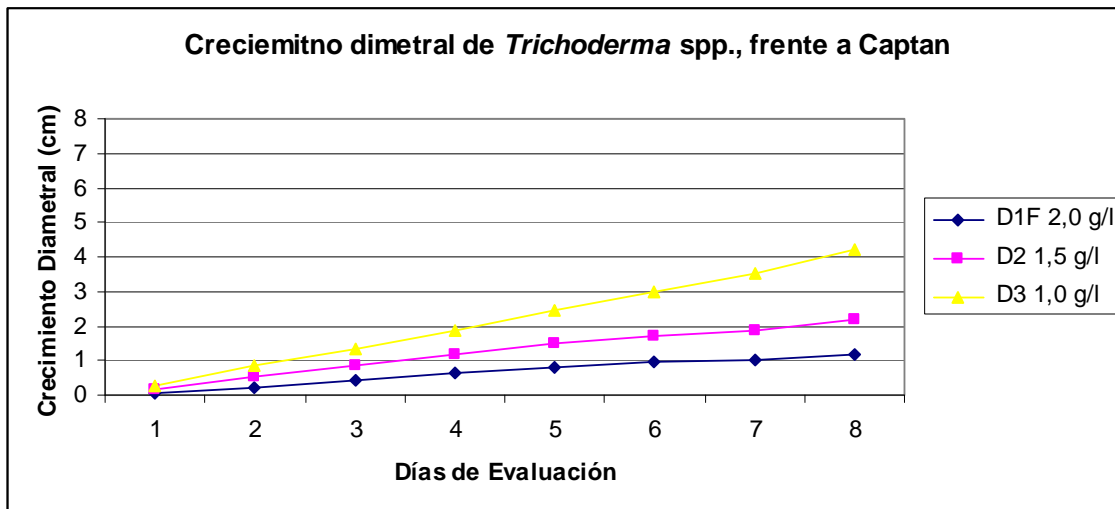


Figura 19. Efecto de la aplicación de Captan en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 28. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de *Trichoderma* spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Dithane FMB. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Dithane FMB		DÍAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D1F	2,0 g/l	0,27	1,28	2,39	3,56	4,59	5,23	5,84	6,59
D2	1,5 g/l	0,27	1,41	2,42	3,62	4,75	5,32	5,96	6,66
D3	1,0 g/l	0,15	1,15	2,24	3,76	5,24	5,88	6,40	7,05

En la figura 20 se aprecia que el crecimiento diametral de *Trichoderma* fue similar en la prueba con las tres dosis de Dithane FMB alcanzando diámetros de 6,59-7,05 cm, también se puede afirmar que *Trichoderma* presentó el mejor crecimiento diametral demostrando de esta manera su alta tolerancia a este producto y a medida que transcurría el tiempo en este medio se observó la esporulación de las cepas en comparación con los otros como Captan 80, Score, Daconil, Carbendazim y Maneb; en relación a lo mencionado Malathi *et al* (2002) cita a Papavizas (1985) que

determinó la aplicación fungicidas en dosis subletales, en las cepas de *Trichoderma* spp. hace posible la proliferación y producción de antibióticos cuando son aplicados al suelo.

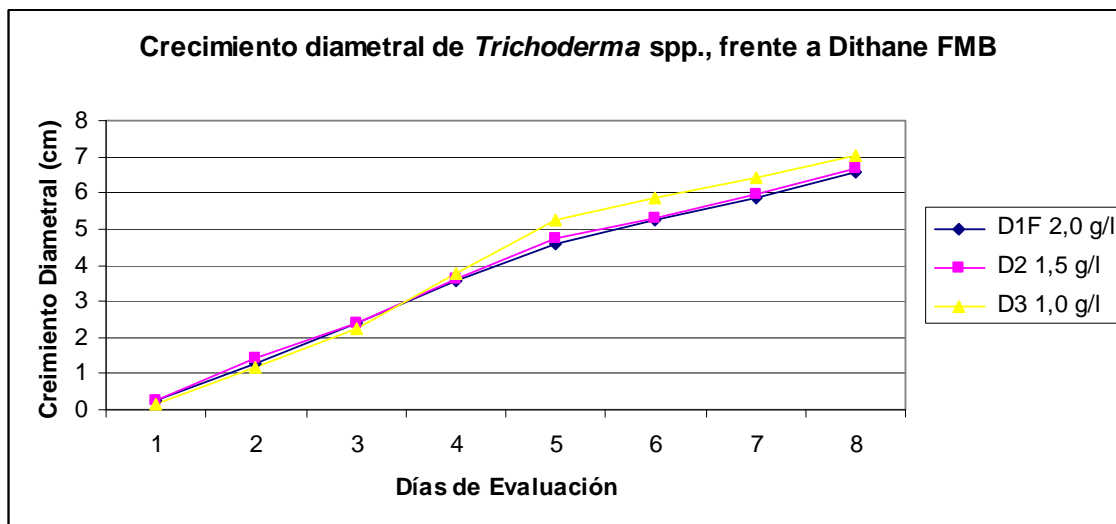


Figura 20. Efecto de la aplicación de Dithane FMB en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 29. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de *Trichoderma* spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Maneb. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Maneb		DIAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D1F	2,0 g/l	0,10	0,75	1,56ab	2,55ab	3,75ab	4,75ab	5,59	6,38
D2	2,5 g/l	0,09	0,72	1,46b	2,30b	3,21b	4,08b	5,13	5,82
D3	1,25 g/l	0,15	0,96	1,88a	3,08a	4,19a	5,33a	6,02	6,81

No existen diferencias marcadas en el crecimiento diametral de *Trichoderma* frente a la aplicación de Maneb en tres dosis, notándose que el mejor crecimiento se presentó en la dosis de 1,25 g/l, es decir, la menor dosis; Maneb es el segundo producto en el

que *Trichoderma* se desarrolló de mejor manera, así los valores descritos en el cuadro 30 varían de 6,38cm a 6,81cm en la figura 21. Cabe señalar, que este fungicida tiene estrecha relación con el Dithane FMB, ya que esta constituido por Maneb y Zineb; consecuentemente las dosis investigadas no afectan de manera total el crecimiento de las siete cepas de *Trichoderma* spp.

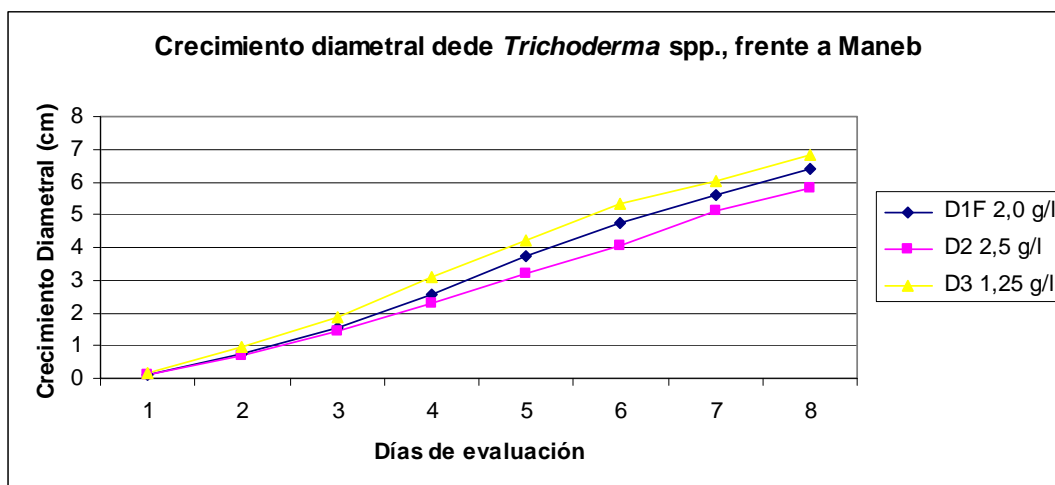


Figura 21. Efecto de la aplicación de Maneb en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 30. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de *Trichoderma* spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Score. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Score	Dosis	DIAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D1F	0,7 ml/l	0,00b	0,01b	0,06b	0,10b	0,15b	0,18b	0,19b	0,25b
D2	0,8 ml/l	0,00b	0,00b	0,03b	0,06b	0,10b	0,11b	0,11b	0,17b
D3	0,6 ml/l	0,03a	0,11a	0,17a	0,32a	0,47a	0,58a	0,69a	0,85a

Según los valores mostrados en el cuadro 30 se observa que el crecimiento de *Trichoderma* varió de 0,25cm a 0,85cm, esto representa un crecimiento insipiente del

antagonismo, estos fueron los menores valores presentados en la evaluación de tolerancia a químicos por las siete cepas de este benéfico, a comparación de Captan 80, Dithane FMB, Carbendazim, Daconil y Maneb. Este criterio se expresa de manera evidente en la figura 22 en relación con el crecimiento diametral frente a las tres dosis; la mejor dosis para el crecimiento fue de 0,6ml/l, pero en confrontación con las otras dosis no se podría recomendar para los controles de patógenos a la par o seguidos por aplicaciones de *Trichoderma* ya que Score disminuye drásticamente su crecimiento, demostrando un efecto de inhibición del antagonista frente al fungicida Lewis y Papavizas (1980) citado por Martínez (2006).

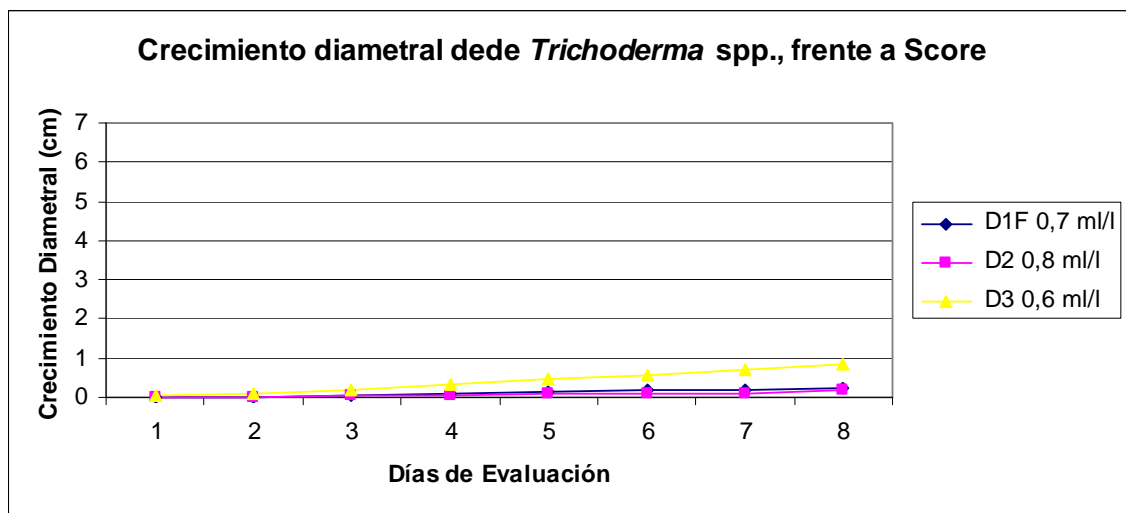


Figura 22. Efecto de la aplicación de Score en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 31. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de *Trichoderma* spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Daconil. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Daconil		DIAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D1F	1,2 ml/l	0,00	0,27a	0,48a	0,74a	1,03a	1,28ab	1,54	1,90
D2	1,8 ml/l	0,00	0,16b	0,29b	0,47b	0,76b	1,04b	1,43	1,70
D3	0,9 ml/l	0,00	0,29a	0,49a	0,85a	1,15a	1,50a	1,81	2,19

En el cuadro 31 se anotan los promedios de crecimiento diametral con valores extremos de 1,70cm a 2,19cm. No se encontraron diferencias en el crecimiento de *Trichoderma* en las tres dosis evaluadas D1F 1,2ml/l; D2 1,8ml/l y D3 0,9ml/l (Figura 23); pero de forma general y comparando con los valores del crecimiento diametral obtenidos con Captan, Dithane y Maneb, este producto produce el menor desarrollo diametral.

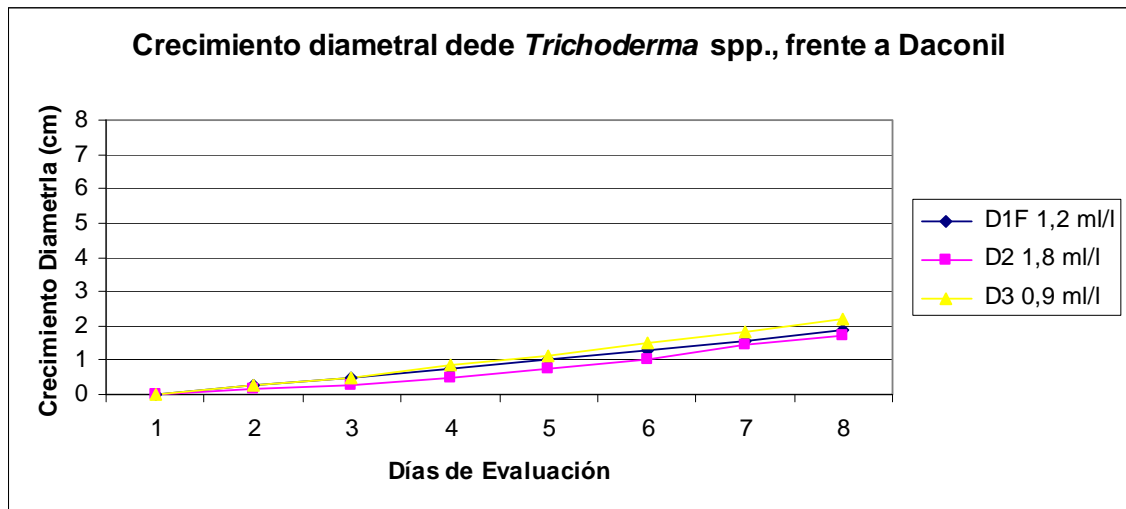


Figura 23. Efecto de la aplicación de Daconil en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

CUADRO 32. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de las cepas de *Trichoderma* spp., en la prueba de tolerancia a tres dosis de Carbendazim IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Carbendazim		DÍAS DE EVALUACIÓN							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D1F	1,0 ml/l	0,00	0,15	0,25	0,39	0,50	0,60	0,76b	0,92b
D2	0,9 ml/l	0,00	0,15	0,24	0,45	0,66	0,87	1,10ab	1,43a
D3	0,6 ml/l	0,00	0,17	0,28	0,55	0,71	0,93	1,17a	1,43a

Carbendazim demostró un control muy significativo en el control del crecimiento del antagonista *Trichoderma*, como se aprecia en la Figura 24 las dosis ensayadas no mostraron una diferencia marcada en el desarrollo de las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelo de cultivo de flores de verano.

Yang *et al.* (2008), en uno de sus estudios determinó que Carbendazim fue el químico más tóxico para el desarrollo de *Trichoderma*, demostrando así que con dosis mayores a 3,20 mg/g se presenta inhibición del crecimiento

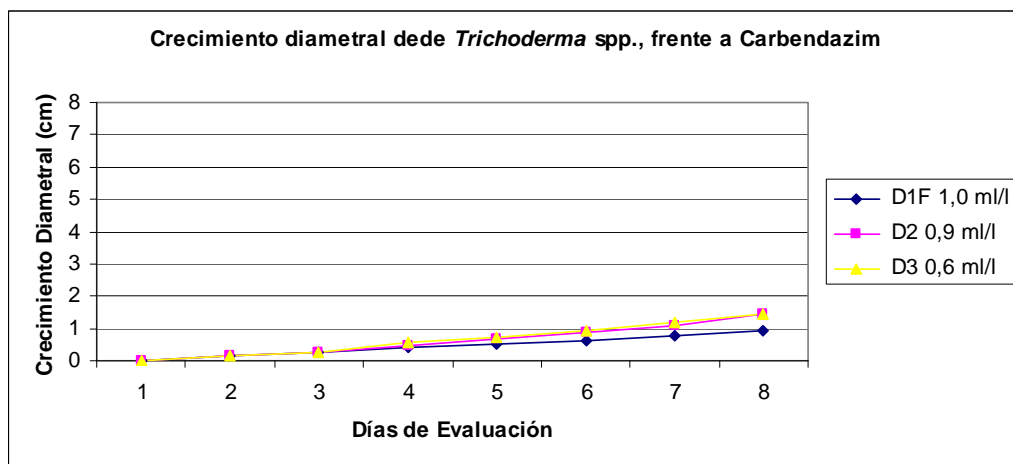


Figura 24. Efecto de la aplicación de Derosal en tres dosis para el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Al establecer el análisis funcional de tolerancia de cada una de las cepas a Captan 80 en tres diferentes dosis, se aprecia un desarrollo estadísticamente similar para las cepas 1 aislada de cultivos de *Delphinium*, las cepas 2 y 4 aisladas de suelo de cultivo de *Aster*, y las cepas 5,6 aisladas de suelo de cultivo de *Gypsophila*; pero el mejor desarrollo diametral lo tuvo la cepa 7 aislada de suelo con cultivo de *Delphinium* con 3,34cm y el crecimiento más pobre la cepa 3 del lote de *Gypsophila* con 1,68cm (Cuadro 33).

CUADRO 33. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral de siete cepas de *Trichoderma* sp., en la prueba de tolerancia a Captan. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2 L18B1	0,00e	0,49b	0,84b	1,29ab	1,69ab	2,02ab	2,28ab	2,77ab
C2F3 B7A	0,22bc	0,57ab	0,90b	1,22ab	1,51ab	1,77ab	1,99ab	2,34ab
C3F2L1A	0,13cd	0,42b	0,70b	0,91b	1,19b	1,36b	1,39b	1,68b
C4F3 B3B1	0,26b	0,61ab	0,99ab	1,32ab	1,77ab	2,20ab	2,52ab	3,08ab
C5F2 L1B2	0,07de	0,39b	0,74b	1,11ab	1,40ab	1,67ab	1,88ab	2,19ab
C6F2 L1A3	0,00e	0,44b	0,67b	1,08b	1,44ab	1,73ab	1,99ab	2,39ab
C7F2 L18B3	0,40a	0,83a	1,30a	0,70a	2,10a	2,43a	2,89a	3,34a

En el cuadro 34 en la evaluación realizada durante ocho días en el comportamiento de siete cepas de *Trichoderma* frente a Dithane, este tratamiento permitió el mejor desarrollo diametral de éstas de 4,81cm a 8cm, destacándose las cepas 1 y 7 aisladas de suelo de cultivo de *Delphinium*, cepa 2 de *Aster* y la cepa 6 de *Gypsophila*. Notándose que en la primera evaluación las cepas muestran un crecimiento muy retardado, el mismo que se va incrementando gradualmente con el paso de los días.

CUADRO 34. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de *Trichoderma* sp., en prueba de tolerancia a Dithane. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2L18B1	0,00d	1,30b	2,44b	3,97c	5,31c	6,01b	6,91b	8,00a
C2F3B7A	0,47b	1,70a	2,79b	4,21bc	5,63bc	6,43b	7,14b	8,00a
C3F2L1A	0,28c	0,87c	1,43c	2,16d	2,86d	3,61c	4,09c	4,81c
C4F3B3B1	0,26c	0,83c	1,53c	2,20d	2,94d	3,77c	4,53c	5,32b
C5F2L1B2	0,00d	0,64c	1,28c	2,08d	2,84d	3,61c	4,53c	5,31b
C6F2L1A3	0,00d	1,66a	3,58 ^a	5,88a	7,89a	8,00a	8,00a	8,00a
C7F2L18B3	0,61a	1,97a	3,40a	5,02ab	6,54b	6,91b	7,27b	7,91a

Las cepas de *Trichoderma* mostraron el segundo mejor desarrollo diametral comprendido entre los valores de 4,38cm el menor y el mayor 8,00cm, los mismos que pertenecieron a las cepas de *Trichoderma* 3 y 6 aisladas de *Gypsophila*. (Cuadro 35). Estos resultados son bastante interesantes con relación a lo anotado en el cuadro 34, pues el comportamiento de las siete cepas en el creamiento diametral fue similar.

CUADRO 35. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de *Trichoderma* sp., en la prueba de tolerancia a Maneb. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2L18B1	0,00c	0,90b	1,84b	3,11bc	4,38b	5,22b	6,86b	7,57a
C2F3B7A	0,22b	0,98b	1,70b	2,53cd	3,40c	4,37bc	5,32c	6,83b
C3F2L1A	0,13b	0,62c	1,16d	1,76e	2,43d	3,10d	3,62e	4,38d
C4F3B3B1	0,00c	0,50c	1,13d	1,73e	2,34d	3,18d	3,74de	4,68d
C5F2L1B2	0,00c	0,66c	1,27cd	2,20de	2,98cd	3,84cd	4,52d	5,34c
C6F2L1A3	0,00c	0,57c	1,62bc	3,24b	5,14ab	6,77a	7,71a	8,00a
C7F2L18B3	0,41a	1,44a	2,71a	3,93a	5,33a	6,56a	7,28ab	7,56a

El desarrollo de las colonias de las siete cepas de *Trichoderma*, evaluadas mediante su diámetro, y analizadas por la prueba de Duncan al 5%, no determinó la presencia de rangos de significación, debido a que su hábito de crecimiento, numéricamente entre estas cepas se presentaron valores similares, en base a esto se aprecia un crecimiento diametral muy lento para todas las cepas. A pesar de que el crecimiento de las cepas con los productos químicos anotados antes alcanzó diámetros de hasta 8cm, en contraste con Score el diámetro mayor fue de 0,80cm que corresponde a la cepa 6 aislada de suelo de cultivo de *Gypsophila* y el menor crecimiento diametral se observó con la cepa 1 aislada de suelo con cultivo de *Delphinium* con 0,22cm (Cuadro 36).

Los datos permiten establecer que Score es un producto que limita el desarrollo de *Trichoderma*, del grupo de las siete cepas ninguna presentó tolerancia; no obstante la cepa 6 tuvo un mejor comportamiento pero a un nivel muy bajo.

CUADRO 36. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de *Trichoderma* sp., en la prueba de tolerancia a Score. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepa	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2L18B1	0,00b	0,00b	0,00b	0,07	0,12	0,16	0,17	0,22
C2F3B7A	0,00b	0,07ab	0,10ab	0,20	0,29	0,36	0,42	0,50
C3F2L1A	0,00b	0,00b	0,07ab	0,09	0,13	0,18	0,18	0,33
C4F3B3B1	0,00b	0,09a	0,17a	0,22	0,36	0,40	0,46	0,58
C5F2L1B2	0,00b	0,04ab	0,08ab	0,11	0,14	0,18	0,19	0,23
C6F2L1A3	0,07a	0,08ab	0,08ab	0,27	0,42	0,52	0,66	0,80
C7F2L18B3	0,00b	0,00b	0,11ab	0,16	0,21	0,24	0,24	0,30

Las cepas de *Trichoderma* sometidas a la acción fungicida del producto químico Daconil, presentaron hasta el último día de evaluación dimensiones diametrales intermedias entre 3cm a 1,27cm, dichas dimensiones la presentan las cepas 7 y 2 respectivamente. Como se nota el crecimiento relacionado con el cuadro 31 muestran mayor desarrollo de las cepas (Cuadro 37).

Como se mencionó antes para este caso, las cepas 1, 6 y 7 con rangos de significación muy similares, manifiestan un comportamiento interesante, en el sentido que acusan grados de tolerancia a la presencia del clorotalonil, cualidad que permitirán integrarlos en un plan de manejo.

CUADRO 37. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de *Trichoderma* sp., en la prueba de tolerancia a Daconil. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2L18B1	0,00	0,31a	0,59a	1,07a	1,42a	1,83a	2,23b	2,77a
C2F3B7A	0,00	0,13b	0,30b	0,38d	0,60c	0,80c	0,98d	1,27c
C3F2L1A	0,00	0,19b	0,38b	0,61bcd	0,81c	1,06c	1,29d	1,57c
C4F3B3B1	0,00	0,7b	0,41b	0,57cd	0,77c	0,94c	1,09d	1,36c
C5F2L1B2	0,00	0,20b	0,33b	0,56cd	0,77c	1,02c	1,20d	1,47c
C6F2L1A3	0,00	0,31a	0,31b	0,79bc	1,09b	1,41b	1,73c	2,10b
C7F2L18B3	0,00	0,37a	0,61 ^a	0,86ab	1,41a	1,84a	2,64a	3,00a

Al establecer el análisis funcional mediante la prueba de Duncan al 5%, para establecer la formación de significación según el comportamiento de siete cepas de *Trichoderma* se aprecia que en la primera evaluación las cepas no mostraron crecimiento diametral, a partir del segundo día de incubación presentaron 3 rangos de diferenciación hasta el octavo día donde concluye la evaluación, el mayor rango

(a) fue 2,19cm para la cepa 7 y el menor rango (c) lo obtuvo la cepa 2 con un diámetro de 0,62cm (Cuadro 38).

CUADRO 38. Prueba de Duncan al 5 %, para el incremento diametral por cepa de *Trichoderma* sp., en la prueba de tolerancia a Carbendazim. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Carbendazim	DÍAS DE EVALUACIÓN							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C1F2L18B1	0,00	0,22ab	0,22bc	0,57a	0,74ab	0,97ab	1,20b	1,44b
C2F3B7A	0,00	0,07c	0,12c	0,22c	0,32c	0,43c	0,54d	0,62c
C3F2L1A	0,00	0,24a	0,42a	0,66a	0,80 ^a	0,97ab	1,12bc	1,36b
C4F3B3B1	0,00	0,11bc	0,20bc	0,30bc	0,43bc	0,54bc	0,63bc	0,88bc
C5F2L1B2	0,00	0,11bc	0,28b	0,49ab	0,61abc	0,71abc	0,87abc	1,02bc
C6F2L1A3	0,00	0,11bc	0,11c	0,44abc	0,63abc	0,89ab	1,02abc	1,31b
C7F2L18B3	0,00	0,27ab	0,43a	0,58a	0,82 ^a	1,09a	1,69a	2,19a

De forma general se observa en la figura 25 que el efecto que causaron los 6 productos utilizados en el ensayo par determinar la tolerancia de siete cepas de *Trichoderma* a su acción fúngica de los productos formulados en polvo mojables permitieron un mejor desarrollo del antagonista *Trichoderma*, en contraste los productos en presentaciones líquidas inhibieron el desarrollo del *Trichoderma* desbancándose de este grupo Score y Daconil y en menor nivel el Carbendazim.

Cabe señalar un comportamiento lógico que exhibieron las cepas de *Trichoderma* frente a la presencia de fungicidas. Estas manifestaron un mayor desarrollo, cuando la dosis utilizada fue menor. También se nota que el comportamiento de las cepas fue muy variable de acuerdo al principio activo del fungicida, en términos generales se puede afirmar que las cepas 1, 2, 6 y 7 se manifestaron como tolerantes a la acción de

los fungicidas. Cabe recalcar que ninguno de los fungicidas a las dosis investigadas inhibieron totalmente el crecimiento de las cepas; no obstante, la capacidad inhibitoria fue variable, desde muy severa (Score) a leve (Dithane).

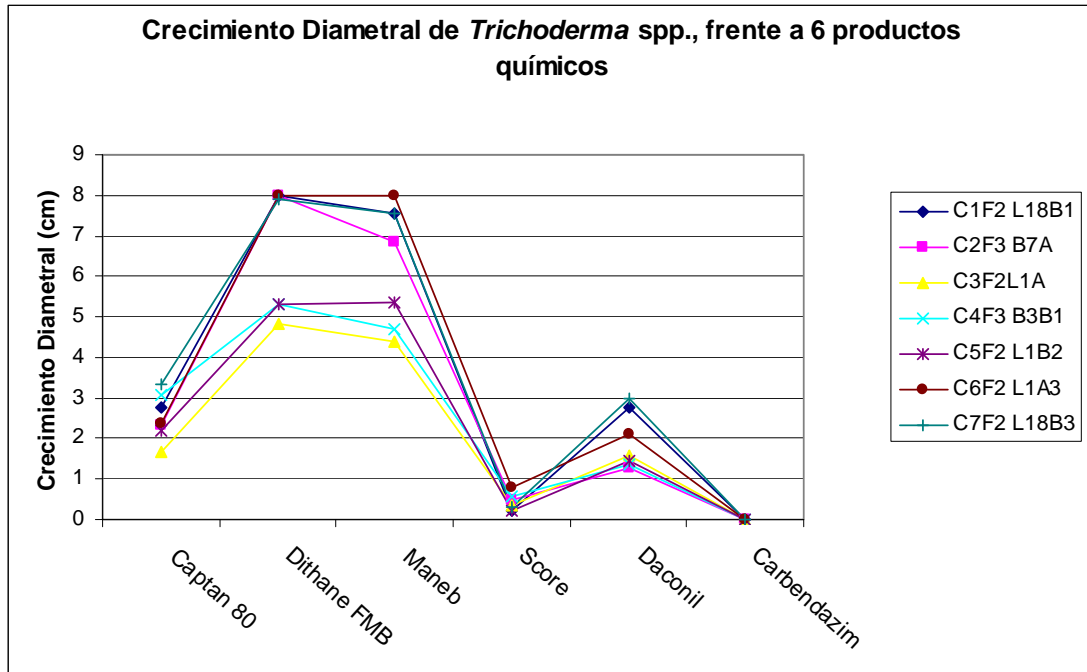


Figura 25. Efecto de la aplicación de 6 productos químicos en el crecimiento diametral de 7 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

En base a lo mencionado anteriormente Plant Health de México corrobora que al aplicar productos biológicos en base a *Trichoderma* no se recomienda el uso de fungicidas ni antes ni después de 15 días de inoculado el hongo antagonista, sin embargo mencionan que *Trichoderma* muestra tolerancia a productos como: Thiram (Tersan), Zineb, Manzate (Dithane M-22, Maneb), Chlorothalonil (Bravo, Daconil-2787), Captan (Orthocide), Mancozeb (Dithane M-45) y Crupocide pero los que definitivamente no se recomienda su aplicación cuando se trabaja con productos de

biocontrol a base de *Trichoderma* son los fungicidas que pertenecen al grupo de las Carboxinas y al grupo de los Benzamidazoles: Benlate, Tersán, Cercovin, Cloroneb, PCNB, Derosal, Ridomil Gold, Alliete, Rizolex y Banrot.

5.7 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE DOS CEPAS DE *Trichoderma* spp.

5.7.1 Caracterización de los aislamientos

De los diferentes aislamientos realizados se identificaron siete cepas del género *Trichoderma* las mismas que se determinaron por sus características morfológicas, por lo que se puede identificar la gran diversidad de este hongo antagonista en los suelos agrícolas.

De los hongos identificados como *Trichoderma* se caracterizaron morfológicamente a dos cepas, estas fueron las cepas que mostraron mayor capacidad de antagonismo y tolerancia a productos químicos, la cepa F2L1A3 fue identificada como *Trichoderma koningii*, ya que esta mostró una diversidad de características pertenecientes a la sección *Trichoderma* las mismas que sirvieron para determinar la especie, una de la característica básica para llegar a esta determinación fue el ritmo rápido de crecimiento que alcanzó 7-9cm en 7 días, color de colonia verdes, forma y disposición de fialides, los conidióforos son similares a *T. harzianum* aunque sus ramificaciones laterales son cortas, en cambio los conidios son de forma elipsoidales y oblongas, a menudo espigados con las dimensiones de 3,0 a 4,8 x 1 ,9 a 2.8 μ

(Kubicek, *et al*,1998). A la cepa F3B7 se la determinó como *Trichoderma atroviride*, para esto se tomo en cuenta las características morfológicas de las colonias con un color verdoso oscuro, al observar al microscopio los fialides presentaron conglomeraciones en forma de paquetes, aseverando lo mencionado por Kubicek, *et al*, 1998 que esta especie tiene fialides con 2-4 verticilios, mas o menos alargados, a menudo estos suelen ser curvados de 6-12 x 2.4-3.0 μm y conidias subglobosas de 2,6-3,8 x 2,2-3,4 μm .

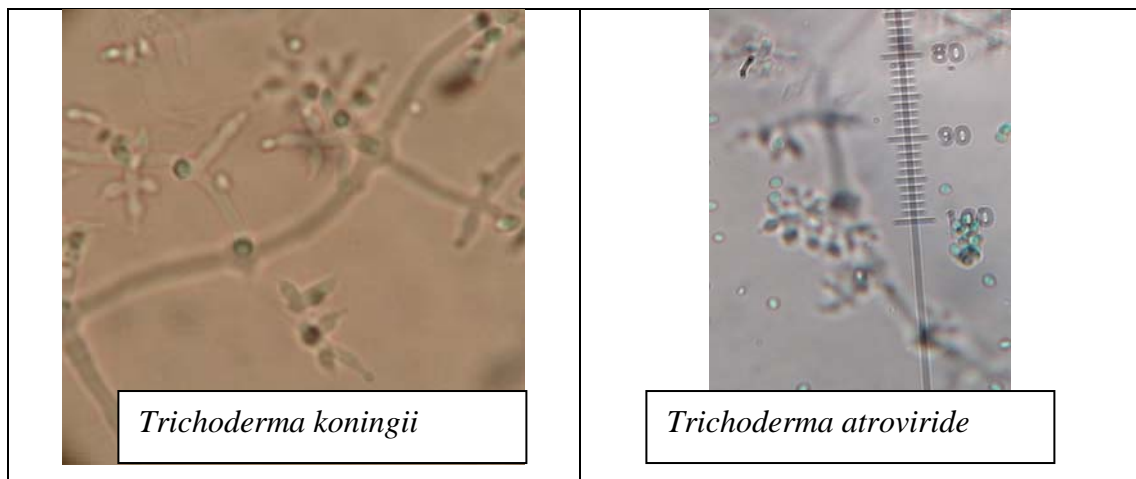


Figura 26. Identificación de cepas de *Trichoderma* spp., promisorias. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

5.8 MULTIPLICACIÓN MASIVA DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. EN OCHO SUSTRATOS SÓLIDOS.

5.8.1 EVALUACIÓN POR EL MÉTODO DE NEUBAUER

En las evaluaciones quincenales realizadas durante tres meses al establecer el análisis de varianza para la multiplicación masiva de cepas de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos mediante el método de evaluación de Neubauer se identificaron diferencias estadísticas para tratamientos a nivel del 1%, lo mismo se identificó para cepas, sustratos y en la interacción cepas con sustratos (Cuadro 39).

En la multiplicación masiva de las especies *T. atroviride* y *T. koningii* que fueron seleccionadas como las mejores cepas por su eficiente comportamiento de biocontrol, y *Trichoderma pseudokoningii* que pertenece al centro de investigaciones del IASA I; se identificó una media real de unidades formadoras de colonias de entre $4,6 \times 10^8$ ufc/g mostrada en la primera evaluación al día cero, y $4,1 \times 10^8$ ufc/g en la última evaluación mostrada en el día 90, es decir, a los tres meses de evaluación. También se identificó que el coeficiente de variabilidad va de 4,76% a 24,86%, observando que este aumenta a medida que transcurre el tiempo de evaluación (Cuadro 39).

Cuadro 39. Análisis de Varianza para la multiplicación masiva de tres especies de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DIAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)						
		0	15	30	45	60	75	90
TOTAL	71							
TRATAMIENTO	23	1,36**	1,32**	1,47**	1,72**	9,54**	21,76**	13,70**
CEP. <i>Trichoderma</i>	2	10,37**	10,22**	10,54**	13,09**	31,80**	70,09**	50,06**
SUSTRATOS	7	0,66**	1,04**	1,04**	0,90**	10,90**	32,20**	17,85**
Cepas*Sustratos	14	0,42**	0,38**	0,38**	0,50**	6,01**	9,31**	6,43**
ERROR	52	0,15	0,14	0,07	0,09	1,80	2,06	3,23
\bar{X} (logx) Transformada		8,12	8,19	8,13	7,94	7,38	6,86	7,23
\bar{X} (ufc/g) Real		$4,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
CV (%)		4,76	4,51	3,33	3,69	16,17	20,92	24,86

Los procesos de multiplicación masiva en sustratos sólidos permiten que el hongo crezca en condiciones muy semejantes a las que el mismo se encuentra en la naturaleza, produciendo conidios aéreos que son más resistentes, duraderos y con mejores rendimientos de esporas puras y homogéneas Siannah *et al*, (2001). *Trichoderma pseudokoningii* presentó un mayor crecimiento en el día 0 en los ochos sustratos utilizados como medio para crecimiento conidial de cepas de *Trichoderma* la población alcanzada fue de $1,1 \times 10^9$ ufc/g, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride* presentaron una similar concentración de ufc/g entre ellas así la una presentó $1,2 \times 10^8$ ufc/g y la otra $1,0 \times 10^8$ ufc/g, en la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5% se establecieron dos rangos en las siete evaluaciones quincenales realizadas durante tres meses, el rango (a) que pertenece a la cepa que generó una mayor población de conidias (*Trichoderma pseudokoningii*) y (b) a la cepa que desarrollo una menor cantidad de conidias (*Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride*), distinguiendo de esta manera la poca variabilidad de ufc por sustrato. Cabe resaltar que los rangos de significación de acuerdo a la prueba de Duncan al 5% en todas las evaluaciones tuvieron un comportamiento similar (Cuadro 40).

CUADRO 40. Prueba de Duncan al 5% para la multiplicación masiva de tres especies de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas	DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)						
	UFC/g						
	0	15	30	45	60	75	90
<i>T.pseudokoningii</i>	$1,1 \times 10^9$ ^a	$1,0 \times 10^9$ ^a	$1,1 \times 10^9$ ^a	$8, \times 10^8$ ^a	$8,2 \times 10^8$ ^a	$9,7 \times 10^8$ ^a	$1,1 \times 10^9$ ^a
<i>T. koningii</i>	$1,2 \times 10^8$ ^b	$1,7 \times 10^8$ ^b	$9,7 \times 10^7$ ^b	$7,1 \times 10^7$ ^b	$5,5 \times 10^7$ ^b	$4,1 \times 10^7$ ^b	$5,5 \times 10^8$ ^b
<i>T. atroviride</i>	$1,0 \times 10^8$ ^b	$1,1 \times 10^8$ ^b	$1,1 \times 10^8$ ^b	$5,7 \times 10^7$ ^b	$6,1 \times 10^7$ ^b	$5,7 \times 10^7$ ^b	$6,6 \times 10^8$ ^b

En la figura 28 se aprecia como se presentó la dinámica poblacional de cada una de las especies de *Trichoderma* evaluadas durante los tres meses y como fue el comportamiento de cada una de estas, en el tiempo, se puede observar un crecimiento que se diferencia muy notoriamente de *Trichoderma pseudokoningii* con respecto a las otras dos especies *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride*, notándose que estas dos últimas tuvieron un crecimiento similar en el tiempo de evaluación y sus ufc/g mostraron un crecimiento invariable manteniendo una tendencia constante desde los 45 a los 90 días, cabe recalcar que el mayor crecimiento estas dos cepas lo muestran a los 15 días y los mayores crecimientos de forma general en los treinta primeros días.

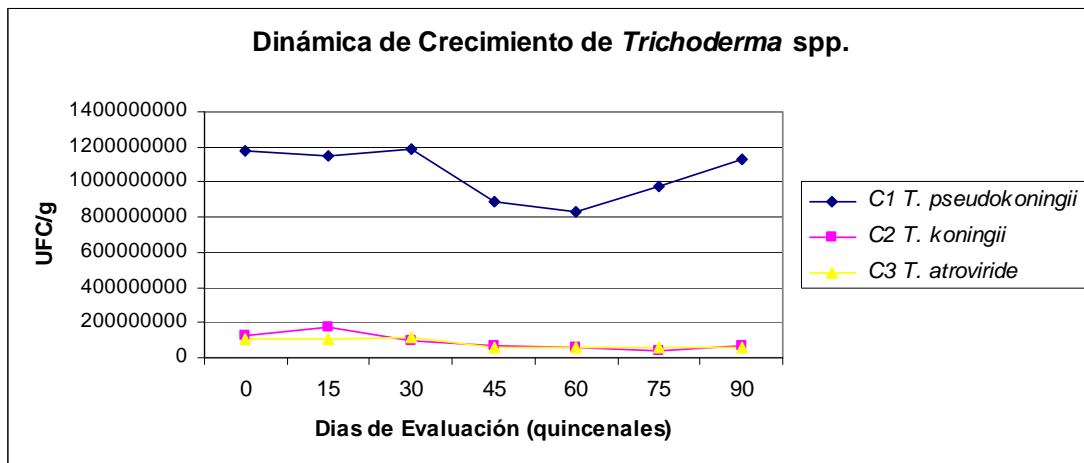


Figura 27. Dinámica de crecimiento de *Trichoderma* spp. en ufc/g por el método de Neubauer IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Al establecer la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5% se identificó claramente que el mejor sustrato para la multiplicación masiva de las especies *Trichoderma*

pseudokoningii, *koningii* y *atroviride* fue la avena destacándose de los otros sustratos, por presentar el mayor rango de diferenciación (a), se identificó una concentración de $1,1 \times 10^9$ ufc/g en el día 0 y $8,2 \times 10^8$ ufc/g en el día 90, a pesar de que hubo una disminución de concentración conidial a los tres meses se puede apreciar que este sustrato mostró el mejor medio para el desarrollo de *Trichoderma*, así Miranda *et al.*, (1996) señala que las cepas óptimas al tener una mayor capacidad reproductiva, en un medio adecuado, potencian su capacidad como un controlador biológico; mientras que los sustratos que más bajo desarrollo conidial presentaron fueron soya $9,0 \times 10^7$ ufc/g a los 60 días y fibra de coco $5,1 \times 10^7$ ufc/g a los 75 días (Cuadro 41).

CUADRO 41. Evaluación de 8 sustratos para la multiplicación masiva 2 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Sustratos		DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)						
		UFC/g						
		0	15	30	45	60	75	90
1	Acículas de Pino	$3,6 \times 10^8$ b	$5,0 \times 10^8$ ab	$4,5 \times 10^8$ ab	$3,2 \times 10^8$ ab	$2,5 \times 10^8$ ab	$3,2 \times 10^8$ ab	$3,5 \times 10^8$ ab
2	Soya	$1,2 \times 10^8$ b	$1,7 \times 10^8$ b	$2,2 \times 10^8$ b	$1,3 \times 10^8$ b	$9,0 \times 10^7$ b	$1,5 \times 10^8$ ab	$1,4 \times 10^8$ ab
3	Kikuyo	$4,0 \times 10^8$ ab	$4,0 \times 10^8$ ab	$4,7 \times 10^8$ ab	$4,4 \times 10^8$ ab	$3,0 \times 10^8$ ab	$2,9 \times 10^8$ ab	$4,5 \times 10^8$ ab
4	Avena	$1,1 \times 10^9$ a	$1,1 \times 10^9$ a	$1,1 \times 10^9$ a	$8,0 \times 10^8$ a	$7,7 \times 10^8$ a	$8,0 \times 10^8$ a	$8,2 \times 10^8$ a
5	Arrocillo	$4,0 \times 10^8$ ab	$3,7 \times 10^8$ b	$2,5 \times 10^8$ b	$2,4 \times 10^8$ ab	$2,3 \times 10^8$ ab	$3,0 \times 10^8$ ab	$3,2 \times 10^8$ ab
6	Maíz	$2,8 \times 10^8$ b	$3,5 \times 10^8$ b	$2,6 \times 10^8$ b	$1,5 \times 10^8$ b	$2,2 \times 10^8$ ab	$3,5 \times 10^8$ ab	$5,1 \times 10^8$ ab
7	Fibra de coco	$1,3 \times 10^8$ b	$1,2 \times 10^8$ b	$1,0 \times 10^8$ b	$7,1 \times 10^7$ b	$9,4 \times 10^7$ b	$5,1 \times 10^7$ b	$7,6 \times 10^7$ b
8	Trigo	$8,2 \times 10^8$ ab	$7,9 \times 10^8$ ab	$5,7 \times 10^8$ ab	$5,4 \times 10^8$ ab	$5,2 \times 10^8$ ab	$5,7 \times 10^8$ ab	$6,4 \times 10^8$ ab

Moore (1996) citado por Díaz & Cruz (2007) determinan que *Trichoderma* tiene la capacidad de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina, celulosa entre otros y emplearlos para su crecimiento gracias a su gran complejo enzimático

que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasa, quitinasas entre otras) así mismo menciona que, este hongo asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfito de amonio. Cada una de las especies de *Trichoderma* degrado en cierto porcentaje el sustrato sólido en el que se hizo la multiplicación masiva por las enzimas presentes en estos hongos ya que se apreció una disminución en el volumen del sustrato a medida que pasaba el tiempo.

En la figura 28 se aprecia claramente de forma general que la avena proporcionó las mejores condiciones para el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* mientras que los sustratos que muestran menos desarrollo de ufc/g en relación al tiempo son la soya y la fibra de coco. La soya fue un producto que se molió para formar partículas con una dimensión comprendida entre 3mm a 5mm para que pueda ser usado como sustrato, pero en el momento que fue sometida a este proceso se observó la presencia de aceite, esto hizo que el sustrato no tenga una textura con las características necesarias y a la vez presentó un porcentaje de humedad muy alto, la fibra de coco por su lado mostró un menor desarrollo de ufc/g debido a que es un material estéril sin ninguna clase de nutrientes haciéndolo poco apetecible para el hongo, a pesar de que este sustrato al igual que los otros fue enriquecido con melaza al 5% y té de papa como fuentes de energía y nutrientes.

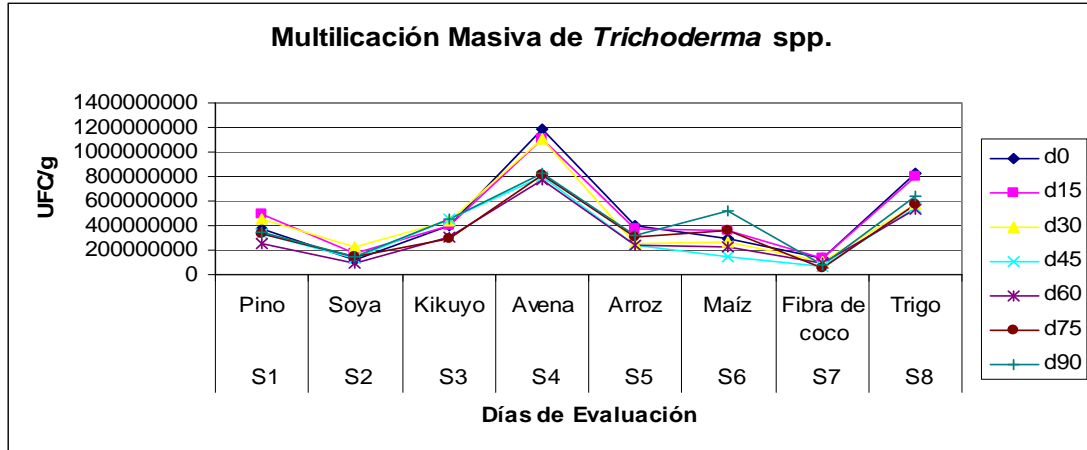


Figura 28. Multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos sólidos evaluados por el método de Neubauer IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Durante los tres meses de evaluación los ocho sustratos presentaron diferentes formas de interacción en el crecimiento de *Trichoderma pseudokoningii*, *koningii* y *atroviride*, en la figura 29 se puede apreciar que los mejores sustratos son avena y trigo los sustratos restantes como acículas pino, kikuyo, soya, fibra de coco, maíz y arrozillo tuvieron un menor desarrollo de ufc/g de *Trichoderma*. La avena es un medio donde *Trichoderma* se desarrolló de forma más óptima, de la misma manera Martínez *et al* (2006) lo demostró en la formulación de un medio sólido que sirvió como vehículo para el transporte de *Trichoderma* alcanzando una concentración de $1,0 \times 10^6$ conidios/g con la utilización de dicho sustrato.

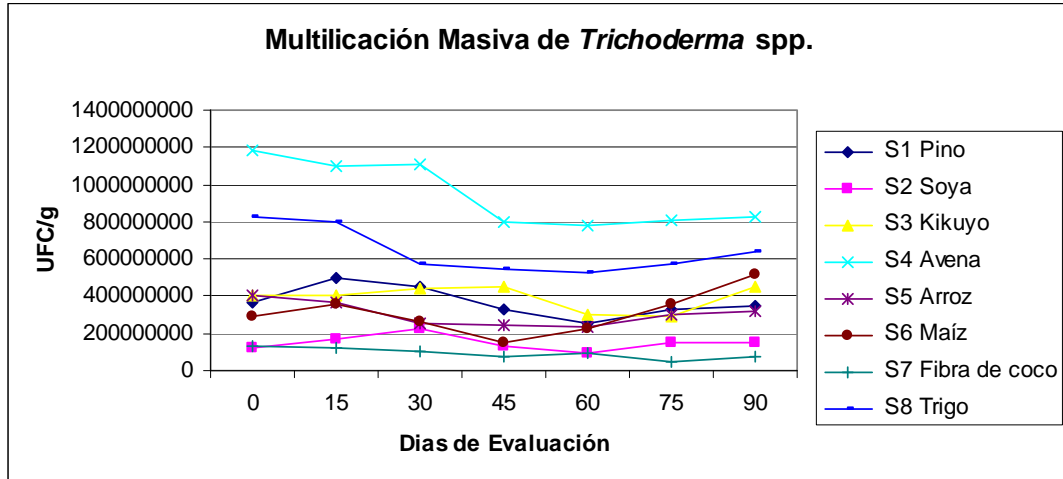


Figura 29. Multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. en función del tiempo, evaluadas por el método de Neubauer IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Los tratamientos que tuvieron el mejor desarrollo durante el tiempo de evaluación fueron aquellos cuyo sustrato fue la avena, destacándose el T10 en el que *Trichoderma pseudokoningii* mostró una gran capacidad de desarrollo conidial, debido a las características de textura presentada por la avena, se dio una colonización homogénea en todo el sustrato por parte del antagonista; lo contrario mostraron los tratamientos T4, T5 y T6 que tienen como sustrato soya, ya que estos mostraron el menor desarrollo por el inconveniente presentado con la soltura, esto evito que el hongo pueda invadir de forma más efectiva el sustrato, sin embargo, se debe tomar en cuenta que por su alto contenido de N, fue el sustrato que mayor desarrollo de micelio tuvo en los 5 primeros días de inoculación del antagonista en el sustrato (Cuadro 42).

CUADRO 42. Efecto del crecimiento de 3 especies de *Trichoderma* en ocho sustratos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRAT.	DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)						
	UFC/g						
	0	15	30	45	60	75	90
T1S1C1	5,9x10 ⁸ cde	8,7x10 ⁸ c de	7,4x10 ⁸ c	5,3x10 ⁸ d e	2,1x10 ⁸ d	5,2x10 ⁸ d e	6,1x10 ⁸ de
T2S1C2	3,0x10 ⁸ ef	3,2x10 ⁸ e f	1,2x10 ⁸ d e	2,3x10 ⁸ e fg	2,7x10 ⁸ d	1,3x10 ⁸ e fg	1,2x10 ⁸ f
T3S1C3	2,0x10 ⁸ f	2,9x10 ⁸ e f	5,0x10 ⁸ c de	2,1x10 ⁸ e fg	2,8x10 ⁸ d	3,2x10 ⁸ e fg	3,1x10 ⁸ ef
T4S2C1	2,9x10 ⁸ ef	4,1x10 ⁸ e f	6,2x10 ⁸ c de	3,6x10 ⁸ d g	2,3x10 ⁸ d	4,5x10 ⁸ d ef	4,3x10 ⁸ ef
T5S2C2	5,9x10 ⁷ f	8,0x10 ⁷ f	3,0x10 ⁷ e	3,8x10 ⁷ g	3,5x10 ⁷ d	3,3x10 ⁶ g	1,1x10 ⁷ f
T6S2C3	2,1x10 ⁹ f	1,5x10 ⁹ f	2,0x10 ⁹ e	3,6x10 ⁶ g	1,6x10 ⁶ d	0,0x10 ⁰ g	1,6x10 ⁶ f
T7S3C1	1,0x10 ⁹ c	1,0x10 ⁹ c	1,9x10 ⁹ b	1,1x10 ⁹ c	8,5x10 ⁸ c	8,2x10 ⁸ c d	1,2x10 ⁹ c
T8S3C2	9,5x10 ⁹ f	8,1x10 ⁷ f	1,0x10 ⁸ d e	6,3x10 ⁷ g	2,1x10 ⁷ d	1,6x10 ⁷ g	2,0x10 ⁷ f
T9S3C3	9,0x10 ⁹ f	9,1x10 ⁷ f	1,6x10 ⁸ c de	8,3x10 ⁷ g	3,1x10 ⁷ d	3,8x10 ⁷ f g	6,5x10 ⁷ f
T10S4C1	3,1x10 ⁹ a	2,9x10 ⁹ a	2,9x10 ⁹ a	2,3x10 ⁹ a	2,2x10 ⁹ a	2,3x10 ⁹ a	2,3x10 ⁹ a
T11S4C2	3,5x10 ⁷ f	5,5x10 ⁷ f	2,9x10 ⁸ c de	2,5x10 ⁷ g	1,8x10 ⁷ d	1,6x10 ⁷ g	2,6x10 ⁷ f
T12S4C3	3,4x10 ⁸ ef	3,3x10 ⁸ e f	5,0x10 ⁷ e	6,6x10 ⁷ g	6,3x10 ⁷ d	2,5x10 ⁷ g	4,8x10 ⁷ f
T13S5C1	9,5x10 ⁸ c	8,6x10 ⁸ c de	7,0x10 ⁸ c d	6,5x10 ⁸ d	6,7x10 ⁸ c	8,1x10 ⁸ c d	8,4x10 ⁸ d
T14S5C2	2,2x10 ⁸ f	2,2x10 ⁸ f	2,8x10 ⁷ e	5,1x10 ⁷ g	1,8x10 ⁷ d	6,8x10 ⁷ f g	8,8x10 ⁷ f
T15S5C3	2,6x10 ⁷ f	1,8x10 ⁷ f	4,3x10 ⁷ c	2,3x10 ⁷ g	2,8x10 ⁷ d	3,0x10 ⁷ g	3,3x10 ⁷ f
T16S6C1	8,0x10 ⁸ cd	9,9x10 ⁸ c d	7,5x10 ⁸ c d	4,2x10 ⁸ d ef	6,5x10 ⁸ c	1,0x10 ⁹ c	1,5x10 ⁹ bc
T17S6C2	4,7x10 ⁷ f	5,3x10 ⁷ f	2,1x10 ⁷ e	1,8x10 ⁷ g	1,6x10 ⁶ d	3,3x10 ⁶ g	5,0x10 ⁶ f
T18S6C3	1,2x10 ⁷ f	2,3x10 ⁷ f	1,5x10 ⁷ e	1,0x10 ⁷ g	3,3x10 ⁶ d	0,0x10 ⁰ g	1,6x10 ⁶ f
T19S7C1	1,9x10 ⁸ f	2,0x10 ⁸ f	1,4x10 ⁸ d e	9,8x10 ⁷ f g	1,8x10 ⁸ d	9,3x10 ⁷ f g	1,0x10 ⁸ f
T20S7C2	1,5x10 ⁸ f	1,2x10 ⁸ f	1,2x10 ⁸ d e	6,8x10 ⁷ g	4,5x10 ⁷ d	4,0x10 ⁷ f g	8,0x10 ⁷ f
T21S7C3	5,0x10 ⁷ f	5,0x10 ⁷ f	5,8x10 ⁷ e	4,8x10 ⁷ g	5,8x10 ⁷ d	2,0x10 ⁷ g	4,1x10 ⁷ f
T22S8C1	2,3x10 ⁹ bf	1,8x10 ⁹ b	1,5x10 ⁹ b	1,5x10 ⁹ b	1,5x10 ⁹ b	1,6x10 ⁹ b	1,8x10 ⁹ b
T23S8C2	6,3x10 ⁷ f	4,5x10 ⁸ d ef	6,1x10 ⁷ e	6,6x10 ⁷ g	2,8x10 ⁷ d	5,0x10 ⁷ f g	8,3x10 ⁷ f
T24S8C3	6,4x10 ⁷ f	5,8x10 ⁷ f	6,8x10 ⁷ e	1,6x10 ⁷ g	2,3x10 ⁷ d	2,1x10 ⁷ g	2,8x10 ⁷ f

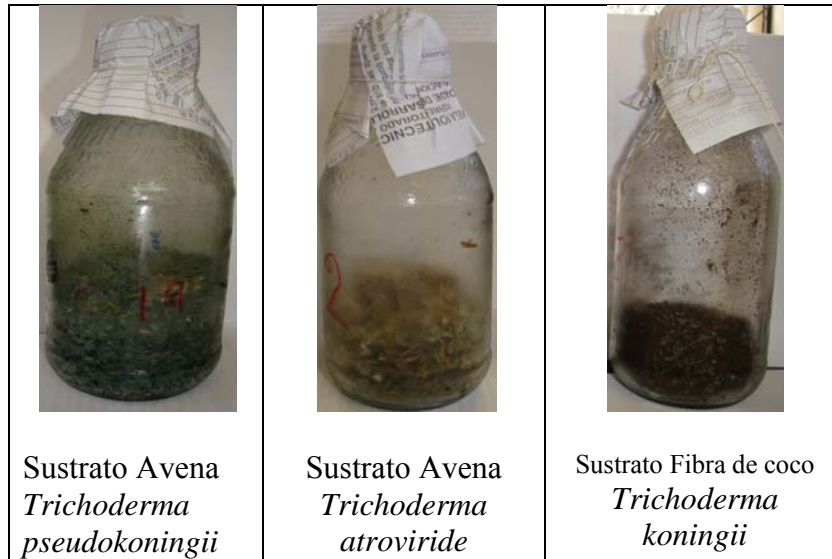


Figura 30. Multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. en los sustratos de avena y fibra de coco IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

La humedad es muy importante para el desarrollo de los hongos en soportes sólidos, para proporcionar de humedad a los sustratos utilizados se utilizó una solución de melaza al 5%, la misma que a la vez de proporcionar humedad al sustrato, a la vez una fuente de Carbono, ya que la melaza es rica en azúcares, pero a medida que transcurrían los días de evaluación se notó una pérdida de humedad en los sustratos debido a la temperatura generada por el calor metabólico liberado por el microorganismo durante su crecimiento Díaz & Cruz (2007) citan a Gervais & Molin (2003) estos autores mencionan que el contenido de humedad necesario para el crecimiento de algunas especies de *Trichoderma* se encuentra cercano al 55%, ya que en este valor de humedad la producción de ciertas enzimas se incrementan, en la misma investigación Díaz & Cruz (2007) cita a Peña (2002) el mismo que reporta la necesidad de humedad en el sustrato empleado para fermentación sólida, esta humedad debe estar comprendida entre 40% y 70% para lograr el crecimiento y la esporulación del hongo *Trichoderma koningii* en medio sólido.

5.8.2 EVALUACIÓN POR EL MÉTODO DE PLAQUEO

Al establecer el análisis de varianza para la multiplicación masiva de cepas de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos por el método de evaluación de plaqueo, los tratamientos se diferenciaron a nivel del 1% en tres evaluaciones realizadas durante tres meses, de la misma manera se identificó diferencias a nivel del 1% para cepas, sustratos y en la interacción cepas con sustratos en cada uno de los días de evaluación de las dos mejores cepas de *Trichoderma* escogidas entre las siete cepas de *Trichoderma* aisladas de los diferentes lotes con cultivo de flores de verano y *Trichoderma pseudokoningii* perteneciente al centro de investigaciones del IASA I. Para establecer dicho análisis se hizo una transformación logarítmica para tener una mejor uniformidad de datos, por esta razón se presentan los datos reales y los datos transformados (Cuadro 43).

La multiplicación masiva de las especies *Trichoderma koningii*, *atroviride* y *Trichoderma pseudokoningii* en ocho sustratos utilizados para propiciar el crecimiento conidial de estas especies, se identificó una media real de $8,4 \times 10^8$ ufc/g mostrada en la primera evaluación al día 0, en la evaluación intermedia en el día 45 fue de $2,3 \times 10^8$ ufc/g y en la última evaluación mostrada en el día 90 fue de $2,1 \times 10^8$ ufc/g, también podemos identificar una variación del CV que va de 14,32% a 54,26% observando que este aumenta a medida que transcurre el tiempo de evaluación (Cuadro 43).

CUADRO 43. Análisis de Varianza para la multiplicación masiva de tres especies de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)		
		0	45	90
TOTAL	95			
TRATAMIENTO	(23)	19,52**	54,16**	43,88**
CEPAS <i>Trichoderma</i>	2	23,68**	205,46**	53,22**
SUSTRATOS	7	17,55**	77,33**	88,53**
Cepas*Sustrato	14	19,91**	20,97**	20,21**
ERROR	72	1,35	5,46	7,49
\bar{X} (ufc/g) Transformada		8,13	4,34	5,04
\bar{X} (ufc/g) Real		$8,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
CV (%)		14,32	53,84	54,26

Al establecer la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%, se obtuvieron como resultados que *Trichoderma pseudokoningii* mostró mayores ufc/g en los tres meses de evaluación, seguida por *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma koningii*. Si se mantienen en un soporte adecuado su almacenamiento se puede prolongar de 3 a 4 meses a temperatura ambiente menciona Elosegui (2006). Se pudo apreciar que la avena y el trigo son soportes y vehículos eficientes para *Trichoderma* donde puede permanecer viable por más de 60 días.

El en el día 0 se vio diferencias muy marcadas entre las tres especies, mientras que a los días 45 y 90 esta diferenciación disminuyó, *Trichoderma pseudokoningii* tuvo el mejor desarrollo mientras que *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma koningii* mostraron ufc/g muy similares entre si, en estas dos evaluaciones (Cuadro 44).

CUADRO 44. Prueba de Duncan al 5% para la multiplicación masiva de tres especies de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos sólidos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Cepas		DIAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)		
		UFC/g		
		0	45	90
C1	<i>T. pseudokoningii</i>	1,4x10 ⁹ a	4,5x10 ⁸ a	3,5x10 ⁸ a
C2	<i>T. koningii</i>	4,1x10 ⁸ c	1,7x10 ⁸ b	1,6x10 ⁸ b
C3	<i>T. atroviride</i>	6,9x10 ⁸ b	7,1x10 ⁷ b	1,0x10 ⁸ b

En la figura 31 se observa como fue el desarrollo de las tres especies de *Trichoderma* evaluadas, el primer día de evaluación mostraron los mejores desarrollos, estableciendo así que la viabilidad de las cepas estaba óptima, ya que las evaluaciones por el método de plaqueo nos permite identificar de forma más real las conidias que están viables al momento de una inoculación de 10µl de solución en medio PDA, a medida que trascurría el tiempo esta viabilidad fue disminuyendo y de cierta manera se estabilizó ya que las ufc/g evaluadas en el día 45 en el intermedio de la evaluación fueron similares a las evaluadas al final es decir a los 90 días.

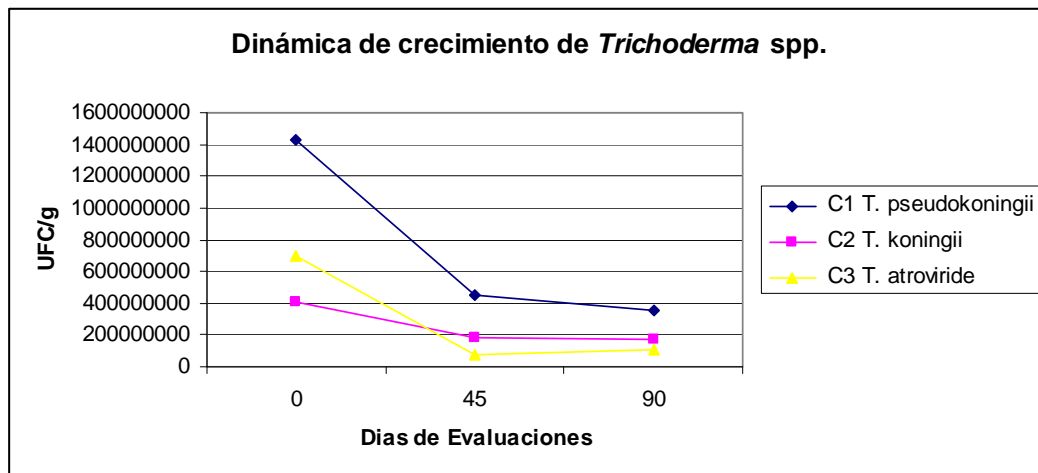


Figura 31. Dinámica de crecimiento de *Trichoderma* spp. en ufc/g por el método de plaqueo IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

En forma general según este método de evaluación por plaqueo, se observó que el mejor sustrato fue la avena pero solo en el día 0, mientras que en el día 45 y 90 fue el sustrato de fibra de coco, mientras en Neubauer siempre fue la avena se puede manifestar que esto ocurre por la presencia de almidones al evaluar en la cámara de Neubauer, ya que en el método de plaqueo no solo se hace un conteo sino también que se siembra en un medio específico para realizar el conteo de colonias es decir a partir de las esporas sembradas cuantas son viables, además este método de evaluación permite verificar la pureza en la que se encuentra cada uno de los sustratos en sus envases, a partir de los 45 días de evaluación se presentó presencia de bacterias en el medio PDA que fue inoculado 10 µl de suspensión preparada a partir de cada uno de los sustratos, esta contaminación se presentó en sustratos de avena, kikuyo y fibra de coco. (Cuadro 45).

CUADRO 45. Evaluación de 8 sustratos para la multiplicación masiva 2 cepas de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

Sustratos		DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)		
		UFC/g		
		0	45	90
S1	Acículas de Pino	5,8x10 ⁸ cd	2,4x10 ⁸ bc	3,0x10 ⁸ ab
S2	Soya	6,2x10 ⁸ cd	8,3x10 ⁶ c	1,6x10 ⁷ c
S3	Kikuyo	9,0x10 ⁸ abc	3,3x10 ⁸ b	1,4x10 ⁸ bc
S4	Avena	1,3x10 ⁹ a	1,9x10 ⁸ bc	3,3x10 ⁸ ab
S5	Arroz	7,0x10 ⁸ bcd	2,5x10 ⁸ bc	6,6x10 ⁷ c
S6	Maíz	1,0x10 ⁹ abc	5,0x10 ⁷ c	3,3x10 ⁷ c
S7	Fibra de coco	3,3x10 ⁸ d	6,6x10 ⁸ a	4,8x10 ⁸ a
S8	Trigo	1,2x10 ⁹ ab	1,1x10 ⁸ bc	3,0x10 ⁸ ab

Se observa de mejor manera en la figura 32 como fue la fluctuación de la población valorada en ufc/g en los ocho sustratos utilizados. En lo que se refiere a la fibra de coco se puede identificar un crecimiento con tendencia al incremento hasta el día 45 después de esto se aprecia un desaseleramiento en su crecimiento a medida que pasa el tiempo notándose así que para el día 90 este disminuyó, pero comparado con los otros sustratos fue el mejor.

A la vez que en las evaluaciones por el método de Neubauer, la soya mostró el peor desarrollo de ufc/g, mientras que la fibra de coco mostró $6,6 \times 10^8$ y $4,8 \times 10^8$ ufc/g la soya tuvo un desarrollo de $8,3 \times 10^6$ ufc/g y $1,6 \times 10^7$ ufc/g concentraciones no aptas para una buena multiplicación masiva de *Trichoderma*.

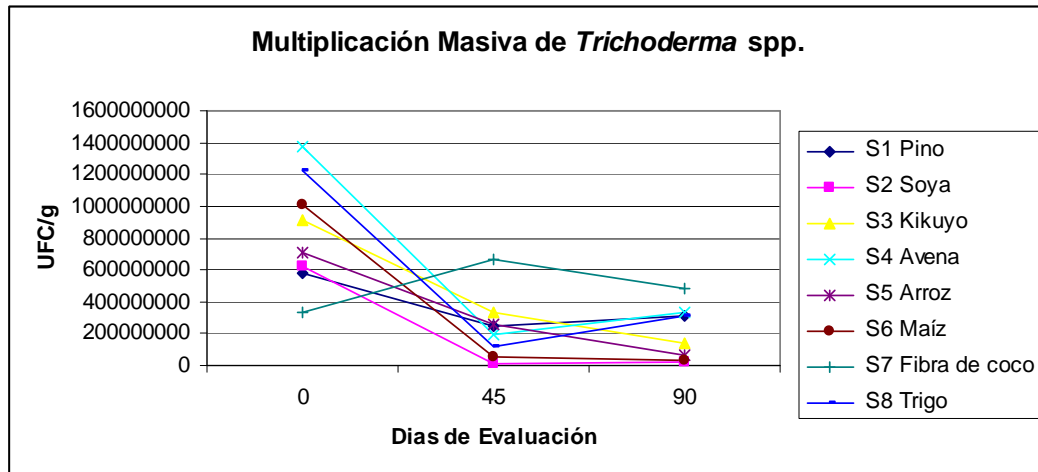


Figura 32. Multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos sólidos evaluados por el método de plaqueo. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

En la figura 33 se observa que el día 0 tuvo mayores ufc/g conforme se nota también en el cuadro 49, seguido por los días 45 y 90 en estas dos evaluaciones se da un

desarrollo similar en el día 45 y 90, la fibra de coco fue el sustrato de menor concentraciones de ufc/g en el día 0 y los mejores la avena y el trigo pero esto cambia a los días 45 y 90 ya que ahí se manifiesta como mejor la fibra de coco y los peores la soya y el maíz.

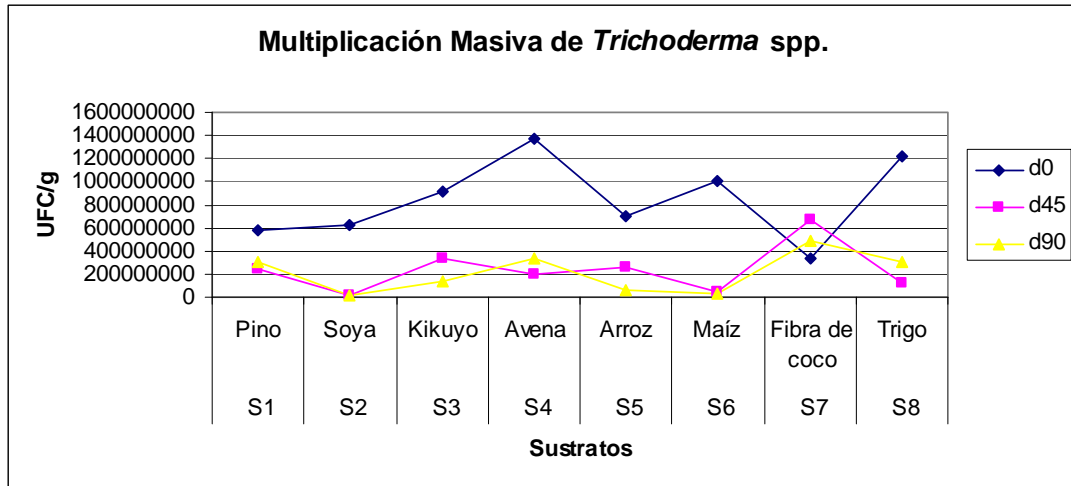


Figura 33. Multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. en función del tiempo, evaluadas por el método de plaqueo. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

El mejor tratamiento fue T22 que corresponde al sustrato de trigo con $2,3 \times 10^9$ ufc/g *Trichoderma pseudokoningii* para el día 0, en el día 45 en cambio muestra el mejor desarrollo conidial el T7 que tiene como sustrato el kikuyo con $9,2 \times 10^8$ ufc/g a pesar de que el número de ufc/g sean menores que las del T22 y para el día 90 el T19 fue el que se destacó con una concentración de $9,5 \times 10^8$ ufc/g el sustrato utilizado en este tratamiento fue la fibra de coco, el T6 que tiene como sustrato soya y donde se inoculó *Trichoderma atroviride* no presentó presencia de conidias por este método, ya que no hubo presencia de colonias en las cajas inoculadas con 10 μ l de solución

que se obtuvo a partir de los envases que contenían los preparados sólidos de *Trichoderma* (Cuadro 46).

CUADRO 46. Efecto del crecimiento de 3 especies de *Trichoderma* en ochos sustratos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTOS	DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES)		
	UFC/g		
	0	45	90
T1S1C1	1,0x10 ⁹ d_g	2,7x10 ⁸ fgh	5,5x10 ⁸ b
T2S1C2	4,5x10 ⁸ h_k	3,7x10 ⁸ ef	3,7x10 ⁸ bc
T3S1C3	2,5x10 ⁸ i_k	7,5x10 ⁷ gh	0,0x10 ⁰ e
T4S2C1	1,4x10 ⁹ bcd	0,0x10 ⁰ h	5,0x10 ⁷ de
T5S2C2	4,0x10 ⁸ h_k	2,5x10 ⁷ h	0,0x10 ⁰ e
T6S2C3	0,0x10 ⁰ k	0,0x10 ⁰ h	0,0x10 ⁰ e
T7S3C1	1,6x10 ⁹ bc	9,2x10 ⁸ a	1,7x10 ⁸ cde
T8S3C2	3,5x10 ⁸ h_k	7,5x10 ⁷ gh	1,0x10 ⁸ cde
T9S3C3	7,2x10 ⁸ f_i	0,0x10 ⁰ h	1,5x10 ⁸ cde
T10S4C1	1,9x10 ⁹ ab	5,7x10 ⁸ cde	8,2x10 ⁸ a
T11S4C2	8,0x10 ⁸ e_h	0,0x10 ⁰ h	1,2x10 ⁸ cde
T12S4C3	1,4x10 ⁹ bcd	0,0x10 ⁰ h	5,0x10 ⁷ de
T13S5C1	1,3x10 ⁹ cde	6,5x10 ⁸ bcd	0,0x10 ⁰ e
T14S5C2	1,7x10 ⁸ jk	7,5x10 ⁷ gh	1,7x10 ⁸ cde
T15S5C3	6,5x10 ⁸ g_i	5,0x10 ⁷ gh	2,5x10 ⁷ de
T16S6C1	1,1x10 ⁹ c_f	1,5x10 ⁸ fgh	2,5x10 ⁷ de
T17S6C2	8,2x10 ⁸ e_h	0,0x10 ⁰ h	2,5x10 ⁷ de
T18S6C3	1,0x10 ⁹ d_g	0,0x10 ⁰ h	5,0x10 ⁷ de
T19S7C1	5,7x10 ⁸ g_i	7,0x10 ⁸ abc	9,5x10 ⁸ a
T20S7C2	2,5x10 ⁷ k	8,7x10 ⁸ ab	2,5x10 ⁸ cde
T21S7C3	4,0x10 ⁸ h_k	4,2x10 ⁸ def	2,5x10 ⁸ cde
T22S8C1	2,3x10 ⁹ a	3,2x10 ⁸ efg	2,7x10 ⁸ cde
T23S8C2	2,7x10 ⁸ i_k	0,0x10 ⁰ h	3,0x10 ⁸ bcd
T24S8C3	1,0x10 ⁹ d_g	2,5x10 ⁷ h	3,5x10 ⁸ bc

5.9 COMPARACIÓN ENTRE DOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE MULTIPLICACIÓN MASIVA DE *Trichoderma* spp.

Se realizó una comparación de los dos métodos con los que se evaluó el número de ufc/g, en base a la variación de los datos tomados en cada método de los diferentes tratamientos, a la vez se apreció la variación general de cada uno de los métodos en las variables evaluadas (Cuadro 47).

CUADRO 47. Comparación de dos métodos de evaluación de ufc/g de *Trichoderma* spp. en ocho sustratos. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

MÉTODOS DE EVALUACIÓN	DÍAS DE EVALUACIÓN (QUINCENALES) UFC/g					
	0		45		90	
	Ufc/Trans.	Ufc/real	Ufc/Trans.	Ufc/real	Ufc/Trans.	Ufc/real
M1 Neubauer	8,22	4,1x10 ⁸	5,63	2,3x10 ⁸ b	6,86	2,1x10 ⁸
M2 Plaqueo	8,45	8,4x10 ⁸	8,00	3,4x10 ⁸ a	7,95	4,1x10 ⁸

En la figura 34 se aprecia la fluctuación de datos en tres evaluaciones con diferentes los dos métodos (plaqueo y Neubauer), se observa que el método de plaqueo muestra una mayor estabilidad en la toma de datos, en comparación con el método de Neubauer en el cual se observan evaluaciones más inestables, cabe mencionar que el método de plaqueo nos muestra datos más reales de lo que esta ocurriendo directamente en cada uno de los envases utilizados para la multiplicación masiva de *Trichoderma*, como la identificación de contaminantes que es muy importante en la producción masiva de *Trichoderma*, Neubauer que solo se limita a dar valores de conidias y no identifica contaminación.

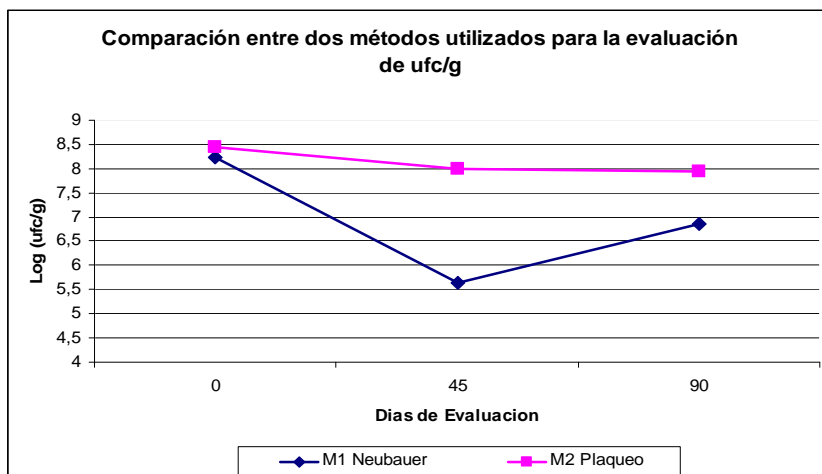


Figura 34. Comparación de dos métodos de evaluación de ufc/g del antagonista *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

5.10 Análisis de costos

En el análisis de costos se tomó en cuenta el precio por kg de cada uno de los productos utilizados como sustratos, a los sustratos que encontramos de forma natural se les dio un costo que se refiere al proceso de preparación del producto para que pueda ser usado como sustrato.

CUADRO 48. Análisis de costos para sustratos utilizados en multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

TRATAMIENTO	COSTO UNITARIO	Costo unitario/kg
ARROZ	0,35	0,80
ESPICULAS DE PINO	0,10	0,10
TRIGO	0,40	0,80
AVENA	0,40	0,80
SOYA	0,60	1,20
KIKUYO	0,20	0,15
MAIZ	0,50	1,00
FIBRA DE COCO	0,60	1,20

Los sustratos de menor costo para la producción masiva de especies de *Trichoderma* fueron las acículas de pino y el kikuyo, sin embargo se debe resaltar la poca producción de ufc/g frente al sustrato de avena que a pesar de tener un costo mayor este propicia el mejor medio para el desarrollo de ufc/g de las especies de *Trichoderma* evaluadas (Cuadro 48).

CUADRO 49. Análisis de costos para multiplicación masiva de *Trichoderma* spp. en avena IASA-Rumiñahui, Pichincha. 2009

	Costo unitario	Cantidad	Unidad	Costo Total
Multiplicación masiva				
Sustratos	0,8	1	kg	0,8
Melaza	0,01	5	ml	0,05
Te de papa	0,25	1	l	0,25
Medio	0,36	3	g	1,08
Envases	0,05	10	fundas	0,5
TOTAL MULTIPLICACION MASIVA/kg				2,68

Tomando en cuenta los valores del cuadro 47 se realizó un análisis de costos para la producción masiva de *Trichoderma* en avena, el sustrato de interés, dando un costo a cada uno de los productos utilizados para la preparación del sustrato como soporte para la multiplicación masiva del antagonista, así se determinó un costo de \$2,68 por kg de sustrato.

VI. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron siete cepas del género *Trichoderma* spp., aisladas de suelos pertenecientes a cultivos de flores de verano de la finca FLORAGRO.
- De las siete cepas de *Trichoderma* se seleccionaron 2 cepas que fueron identificadas como *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride*; las mismas que mostraron una alta capacidad antagónica *in vitro* frente a patógenos como *Fusarium* spp. y *Phytophthora* sp., causantes de enfermedades radicales en flores de verano.
- Los fungicidas Dithane FMB y Maneb en sus tres dosis no inhibieron el desarrollo de *Trichoderma*, al contrario permitieron un buen crecimiento diametral mientras que Score en sus tres dosis provocó una marcada inhibición del crecimiento de *Trichoderma*.
- Las dosis altas de los fungicidas determinaron una mayor capacidad inhibitoria del hongo; en contraste, las dosis bajas permitieron un mayor desarrollo.
- Los sustratos de avena y trigo fueron los mejores para la producción masiva de cepas de *Trichoderma* por el rápido crecimiento y abundante conidias ($9,2 \times 10^8$ ufc/g y $6,4 \times 10^8$ ufc/g respectivamente).

- Los sustratos de avena y trigo utilizados para la producción masiva de cepas de *Trichoderma*, no son los de menor costo; sin embargo, permiten un mejor desarrollo del hongo antagonista. El costo de un Kg. de sustrato para avena y trigo fue de \$0,80.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la utilización de las especies de *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride* que mostraron gran capacidad antagónica y de multiplicación *in vitro*, para multiplicación masiva de este antagonista en la finca FLORAGRO.
- Determinar la frecuencia de aplicación de *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride*.
- Estudiar nuevos métodos para mejorar la capacidad de esporulación de *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride*.
- Se podría probar productos similares a Maneb y Dithane que permitieron un mejor desarrollo del hongo para incluir en un manejo integrado ya que estos fungicidas pueden causar daño al ambiente y salud de los trabajadores.
- Se recomienda multiplicar masivamente *Trichoderma koningii* y *Trichoderma atroviride* en sustratos de avena y trigo que generan un mejor desarrollo conidial; pero, se puede disminuir los costos de estos sustratos agregando cascarilla de arroz para que este propicie mayor volumen de sustrato y en el caso del trigo le de mayor soltura.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agamez E., *et al*; 2008 (en línea). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Colombia. Consultado el 12 de febrero del 2009. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co>
- Agrios G., 1996. Fitopatología, Noriega editores, traducido por Guzmán M., México, p.271, 281.
- Baker K.F. & Cook R.J. 1982, Biological Control of plant pathogens, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 28-43.
- Baker K.F. & Cook R.J. 1983, The nature and practice of biological control of plant pathogens, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 375.
- Benítez S. González L. 2003. Aceleración de procesos de compostaje utilizando *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Trichoderma harzianum*. Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología Clínica y Aplicada. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito. pp. 23.
- Booth, C. 1977. *Fusarium* Laboratory Guide to the Identification of the Major Species; Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey-England. pgs 5,6,12,14,16,19.
- Claro, O. 2006 (en línea). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) Ciudad de La Habana - Cuba. Consultado el 12 de agosto del 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>

- Díaz A. y Cruz L. 2007 (en línea). Estandarización del producción del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Consultado el 12 de Diciembre del 2008. Disponible en: <http://www.corpoica.org.co>
- Espinosa A., 2004. “Determinación de la población de bacterias y hongos fitopatógenos presentes en el suelo y búsqueda de agentes antagonistas, en flores de verano”. Tesis de Ingeniería Agropecuaria, IASA- ESPE. Sangolquí – Ecuador.
- Ezziyyani M., Pérez C., Sid A., Requena M., Candela M., 2004 (en línea). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Consultado el 23 de septiembre del 2008. Disponible en: <http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>
- Falconí C., 1998, “Fitopatología Práctica”, EDIESPE, Sangolquí – Ecuador, p. 119.
- Falconí, C. *et al*; 2007. Publicación Científico Técnica, Validación de biopesticidas para el control de la moliniasis y manejo sustentable del caco fino y de aroma en el Ecuador; Proyecto de Investigación PIC-051; Sangolquí – Ecuador; p 37.
- Fernández O., Larrea V., 2001 (en línea). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Costa rica. Consultado el 08 de abril del 2009. Disponible en: web.catie.ac.cr/información/rmip/rev62/96-100.pdf
- Gams & Bissett, 1998. Morphology and identification of Trichoderma in: *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1 pp. 3-31
- Herrera C., 2005. “Alternativas orgánicas en reemplazo al control químico para desinfección de suelos en Larkspur (*Delphinium consolida*)” Tesis de Ingeniería Agropecuaria, IASA- ESPE. Sangolquí – Ecuador.

- Hermann B., 1996. Métodos de planteamiento y valoración de ensayos de campo con pesticidas. División de fitosanitarios. Republica Federal de Alemania.

- Kubicek c. and Harman G., 1998. “*Trichoderma* and *Gliocladium*” Volume 2, Basic biology, taxonomy and genetics”. Press “Taylor and Francis”, London, p. 150-300.

- Kubicek C. and Harman G., 1998. “*Trichoderma* and *Gliocladium*” Volume 1, Basic biology, taxonomy and genetics”. Press “Taylor and Francis”, London, pp.3-31.

- López A., 2007 “Pruebas de eficiencia *in vitro* y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. para control de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum* para establecer un banco de microorganismos”. Tesis de Ingeniería Agropecuaria, IASA- ESPE. Sangolquí – Ecuador.

- Malathi P, *et al.* 2002 (en línea) Compatibility of Biocontrol Agents with Fungicides against Red Rot Disease of sugarcane. Plant Pathology Section, Sugarcane Breeding Institute, Tamil Nadu, India Vol. 4 pp.131 – 136 Consultado el 23 de agosto del 2008. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/512474530866tq6v/fulltext.pdf>

- Manual de agricultura Orgánica Volvamos al campo. 2004, Grupo Latino LTDA. Colombia. pp. 27-28.

- Martínez *et al* . 2006 (en línea). Formulación de *Trichoderma harzianum* en la producción ecológica de plántulas de melón en semillero para el control de fusariosis vascular. España-Murcia. Consultado el 08 de abril del 2009. Disponible en: <http://www.investigaciones/artict/3100/cisc.es.pdf>

- Martínez M., 2001 Libro de agricultura orgánica. Bogotá pp. 20, 186, 191, 192.

- Miranda, D. *et al*; 1996 (en línea). Aplicación de la metodología de superficie respuesta en la optimización de crecimiento y esporulación de *Trichoderma* sp. Dptos de informática y matemática aplicada y Fitopatología, Centro nacional de sanidad agropecuaria; La Habana Cuba. Consultado el 1 de marzo del 2008. Disponible en: <http://www.cenicafe.org/modules.php?name=cenicafeAcademico&file=viewpdf>
- Mónaco C., *et al*, 2001, (en línea) Efecto «in vitro» de dos fungicidas sobre la micoflora antagonista al tizón temprano del tomate La Plata, Buenos Aires. Argentina Consultado el 11 de marzo del 2009.
- Montalvo D., 2004. “Evaluación de productos químicos y sus combinaciones con microorganismos antagonistas en el cultivo de *Hypericum* (*Hypericum inodorum*) como alternativa al bromuro de metilo en la desinfección del suelo”. Tesis de Ingeniería Agropecuaria, IASA- ESPE. Sangolquí – Ecuador.
- Moreno D., 2005. “Vaporización como alternativa al uso de bromuro de metilo en la desinfección de suelos en el cultivo de *Liatris* (*Liatris spicata*) ”. Tesis de Ingeniería Agropecuaria, IASA- ESPE. Sangolquí – Ecuador.
- Oleas A., 2004. Guía de Fungicidas. Centro de investigaciones. Sangolquí-Ecuador pp. 26-38
- Rodríguez V., 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del damping off en plantas de tomate. Unidad de Postgrados. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Unidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
- Páez O., 2006 (en línea). Uso Agrícola del *Trichoderma*. Consultado el 1 de marzo del 2008. Disponible en: <http://www.soilfertility.com/trichoderma/espagnol/index.html>

- Rial, C. *et al*; (2005) Variaciones en la susceptibilidad a *phytophthora cinnamomi* de diferentes clones de castaño: comparación de dos métodos de inoculación. Consultado el 23 de julio del 2008. Disponible en: [www.efadip.org/comun/publicaciones/Comunicaciones/2007\(SECF_palencia\).pdf](http://www.efadip.org/comun/publicaciones/Comunicaciones/2007(SECF_palencia).pdf)
- Stefanova M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado M., 1999 (en línea). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Consultado el 1 de marzo del 2008. Disponible en: http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_5/v165z006.html
- Siannah M. *et al.* 2001 (en línea). Desarrollo de un bioplaguicida de *Trichoderma* sp., sobre soporte sólido con la aplicación de campos electromagnéticos. Centro nacional de electromagnetismo aplicado, Vol. XXI Consultado el 18 de mayo del 2008. Disponible en: <http://www.uo.edu.cu/ojs/index.php/tq/article/view>
- Tovar, J. 2008 (en línea). Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* spp., frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Bogotá. Consultado el 21 de mayo del 2008. Disponible en: www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf
- Vademecum Agrícola, 2006. Novena edición, EDIFARM. Quito-Ecuador
- Yang Hetong *et al*; 2008 (en línea). Toxicity of Fungicides and Selective Medium Development for Isolation and Enumeration of *Trichoderma* spp. in Agricultural soils, China. Consultado el 15 de abril del 2009. Disponible en: http://www.isth.info/methods/method.php?method_id=8
- Yáñez V. 2003. Agentes de biocontrol. En: Producción y formulación de biopesticidas a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sp. para el control biológico de la moniliasis de cacao. Boletín técnico No. 2, EdiEspe. pp. 7-8.

T37P1D1C3	0,00	0,20	0,40	0,50	0,77	0,93	0,93	1,10
T38P1D2C3	0,20	0,40	0,63	0,83	1,10	1,17	1,20	1,53
T39P1D3C3	0,20	0,67	1,07	1,40	1,70	1,97	2,03	2,40
T40P2D1C3	0,23	0,80	1,37	2,10	2,67	3,70	4,07	4,53
T41P2D2C3	0,33	0,93	1,43	2,10	2,83	3,37	3,83	4,67
T42P2D3C3	0,27	0,87	1,50	2,27	3,07	3,77	4,37	5,23
T43P3D1C3	0,00	0,53	1,00	1,63	2,23	2,93	3,47	4,17
T44P3D2C3	0,20	0,67	1,13	1,63	2,27	2,87	3,43	4,03
T45P3D3C3	0,20	0,67	1,33	2,00	2,80	3,50	3,97	4,93
T46P4D1C3	0,00	0,00	0,13	0,17	0,23	0,30	0,30	0,43
T47P4D2C3	0,00	0,00	0,00	0,03	0,07	0,07	0,07	0,13
T48P4D3C3	0,00	0,00	0,07	0,07	0,10	0,17	0,17	0,43
T49P5D1C3	0,00	0,20	0,47	0,73	0,93	1,13	1,30	1,63
T50P5D2C3	0,00	0,17	0,20	0,43	0,67	0,87	1,20	1,37
T51P5D3C3	0,00	0,20	0,47	0,67	0,83	1,17	1,37	1,70
T52P6D1C3	0,00	0,20	0,37	0,57	0,77	0,93	1,07	1,37
T53P6D2C3	0,00	0,13	0,27	0,47	0,53	0,67	0,80	0,93
T54P6D3C3	0,00	0,40	0,63	0,93	1,10	1,30	1,50	1,77
T55P1D1C4	0,20	0,33	0,57	0,73	0,97	1,17	1,33	1,60
T56P1D2C4	0,20	0,70	1,03	1,33	1,77	2,20	2,40	2,97
T57P1D3C4	0,37	0,80	1,37	1,90	2,57	3,23	3,83	4,67
T58P2D1C4	0,20	0,77	1,33	2,00	2,63	3,37	4,03	4,70
T59P2D2C4	0,30	0,87	1,60	2,27	2,93	3,80	4,47	5,20
T60P2D3C4	0,27	0,87	1,67	2,33	3,27	4,13	5,10	6,00
T61P3D1C4	0,00	0,53	1,07	1,67	2,37	3,07	3,73	4,43
T62P3D2C4	0,00	0,47	1,17	1,77	2,40	3,20	3,90	4,53
T63P3D3C4	0,00	0,50	1,17	1,77	2,27	3,27	3,60	5,07
T64P4D1C4	0,00	0,00	0,00	0,03	0,07	0,07	0,07	0,13
T65P4D2C4	0,00	0,20	0,37	0,50	0,70	0,83	0,97	1,17
T66P4D3C4	0,00	0,07	0,13	0,13	0,30	0,30	0,33	0,43
T67P5D1C4	0,00	0,23	0,50	0,80	1,00	1,23	1,50	1,77
T68P5D2C4	0,00	0,13	0,40	0,40	0,60	0,70	0,70	1,00
T69P5D3C4	0,00	0,13	0,33	0,50	0,70	0,90	1,07	1,30
T70P6D1C4	0,00	0,17	0,20	0,37	0,53	0,67	0,67	1,03
T71P6D2C4	0,00	0,17	0,33	0,47	0,63	0,83	1,03	1,27
T72P6D3C4	0,00	0,00	0,07	0,07	0,13	0,13	0,20	0,33
T73P1D1C5	0,00	0,20	0,37	0,60	0,77	0,97	1,00	1,27
T74P1D2C5	0,00	0,37	0,73	1,07	1,37	1,57	1,77	2,03
T75P1D3C5	0,20	0,60	1,13	1,67	2,07	2,47	2,87	3,27
T76P2D1C5	0,00	0,53	1,17	1,90	2,63	3,33	4,13	4,80
T77P2D2C5	0,00	0,63	1,23	2,03	2,67	3,43	4,47	4,93
T78P2D3C5	0,00	0,77	1,43	2,30	3,23	4,07	5,00	6,13
T79P3D1C5	0,00	0,53	1,07	1,83	2,43	3,23	4,07	4,87
T80P3D2C5	0,00	0,60	1,20	1,87	2,47	3,23	3,77	4,77
T81P3D3C5	0,00	0,83	1,53	2,90	4,03	5,07	5,73	6,40
T82P4D1C5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T83P4D2C5	0,00	0,13	0,23	0,30	0,40	0,50	0,53	0,67
T84P4D3C5	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
T85P5D1C5	0,00	0,20	0,40	0,60	0,83	1,03	1,23	1,57
T86P5D2C5	0,00	0,20	0,20	0,40	0,60	0,80	0,97	1,10
T87P5D3C5	0,00	0,20	0,40	0,67	0,87	1,23	1,40	1,73
T88P6D1C5	0,00	0,00	0,17	0,40	0,50	0,60	0,77	0,93
T89P6D2C5	0,00	0,20	0,37	0,60	0,70	0,80	1,00	1,17
T90P6D3C5	0,00	0,13	0,30	0,47	0,63	0,73	0,83	0,97
T91P1D1C6	0,00	0,20	0,20	0,40	0,53	0,53	0,53	0,60
T92P1D2C6	0,00	0,40	0,73	1,10	1,47	1,70	1,70	1,83
T93P1D3C6	0,00	0,73	1,07	1,73	2,33	2,97	3,73	4,73
T94P2D1C6	0,00	1,83	3,73	5,97	7,83	8,00	8,00	8,00
T95P2D2C6	0,00	1,83	3,77	6,07	8,00	8,00	8,00	8,00

T96P2D3C6	0,00	1,30	3,23	5,60	7,83	8,00	8,00	8,00
T97P3D1C6	0,00	0,50	1,17	2,60	4,63	6,37	7,70	8,00
T98P3D2C6	0,00	0,50	1,63	3,17	4,90	6,27	7,43	8,00
T99P3D3C6	0,00	0,70	2,07	3,97	5,90	7,67	8,00	8,00
T100P4D1C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T101P4D2C6	0,20	0,23	0,23	0,80	1,27	1,57	1,97	2,40
T102P4D3C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T103P5D1C6	0,00	0,30	0,30	0,83	1,07	1,33	1,53	2,03
T104P5D2C6	0,00	0,20	0,20	0,63	1,00	1,33	1,73	2,07
T105P5D3C6	0,00	0,43	0,43	0,90	1,20	1,57	1,93	2,20
T106P6D1C6	0,00	0,20	0,20	0,60	0,97	1,37	1,57	2,03
T107P6D2C6	0,00	0,13	0,13	0,73	0,93	1,30	1,50	1,90
T108P6D3C6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T109P1D1C7	0,20	0,37	0,73	0,87	1,03	1,17	1,33	1,53
T110P1D2C7	0,40	0,80	1,23	1,60	1,90	2,10	2,43	2,77
T111P1D3C7	0,60	1,33	1,93	2,63	3,37	4,03	4,90	5,73
T112P2D1C7	0,93	2,20	4,37	6,13	7,77	8,00	8,00	8,00
T113P2D2C7	0,57	2,43	3,33	5,00	6,47	6,70	7,17	7,73
T114P2D3C7	0,33	1,27	2,50	3,93	5,40	6,03	6,63	8,00
T115P3D1C7	0,47	1,27	3,00	4,47	6,07		7,73	8,00
T116P3D2C7	0,20	1,17	2,07	2,90	3,90	4,97	6,10	6,67
T117P3D3C7	0,57	1,90	3,07	4,43	6,03	7,50	8,00	8,00
T118P4D1C7	0,00	0,00	0,10	0,13	0,17	0,17	0,17	0,27
T119P4D2C7	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,10	0,10	0,07
T120P4D3C7	0,00	0,00	0,20	0,30	0,43	0,47	0,47	0,57
T121P5D1C7	0,00	0,43	0,67	0,90	1,33	1,60	2,03	2,47
T122P5D2C7	0,00	0,20	0,40	0,47	1,13	1,63	2,87	3,03
T123P5D3C7	0,00	0,47	0,77	1,20	1,77	2,30	3,03	3,50
T124P6D1C7	0,00	0,20	0,40	0,50	0,70	1,00	1,80	2,43
T125P6D2C7	0,00	0,20	0,40	0,60	0,90	1,20	1,60	2,07
T126P6D3C7	0,00	0,27	0,50	0,63	0,87	1,07	1,67	2,07

Anexo 3. Liofilización de *Trichoderma koningii* y *Trichoderma pseudokoningii*.



HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

LUISA PAULINA CHOLANGO MARTÍNEZ

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Ing. Patricia Falconí Salas

DELEGADO UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO

Abg. Carlos Orozco

Lugar y fecha: Sangolquí 19 de Mayo del 2009