

**ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO**

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

**EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. EN EL  
CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE ROSAS**

**Previa a la obtención del Título de:  
Ingeniero Agropecuario**

**ELABORADO POR:**

**ROSA MIKAELA YUMBAY YALLICA**

**Sangolquí, Julio del 2011**

**EXTRACTO**

El objetivo de esta investigación fue determinar la eficiencia de varias cepas de *Trichoderma* spp. nativas (Florícola San Alfonso) y una cepa exótica (cepa C<sub>19</sub> de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA – ESPE) en el control del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Se aislaron 21 cepas nativas de la florícola San Alfonso, las cuales, junto con la cepa C<sub>19</sub> fueron sometidas a pruebas de crecimiento radial y pruebas de antagonismo *in vitro* en el laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA – ESPE. Posteriormente se seleccionaron dos cepas nativas (8<sub>a</sub> y 7<sub>b</sub>) que presentaron los mejores resultados en las variables que se evaluaron y la cepa exótica (cepa C<sub>19</sub>) para elaborar el bioformulado y aplicarlo en campo.

A nivel de campo se realizó la aplicación de los bioformulados en tres variedades de rosas (Freedom, Amelia y Dekora; los cuales fueron evaluados durante todo un ciclo productivo luego de la ejecución de un pinch a todos los tallos). Los tratamientos estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales y al mismo manejo. Para la aplicación de los tratamientos se utilizaron cortinas móviles para evitar el efecto de borde durante el empleo de fungicidas sistémicos, sólo recibían productos protectantes durante todo el tiempo de evaluación. Las variables que se midieron fueron: severidad en cámara húmeda, incidencia y severidad en el campo y en el florero luego de realizar un viaje simulado.

### III

Los resultados indicaron que existen diferencias significativas entre variedades de rosas, pero dentro de ellas no existe diferencias significativas para las variables de incidencia y severidad en cámara húmeda, en campo y vida en florero.

En el análisis del comportamiento de las cepas de *Trichoderma* spp., la cepa que mostró una menor incidencia en casi todas las variedades fue la cepa C<sub>19</sub> seguida por la cepa 8<sub>a</sub>. El tratamiento T<sub>9</sub> (Cepa 7<sub>b</sub>+Variedad Amelia) presentó la incidencia más alta en el florero. En contraste, el tratamiento que mostró una menor incidencia el tratamiento que mostró una menor incidencia dentro de la variedad Amelia fue T<sub>7</sub> (C<sub>19</sub>), inclusive menor que su testigo (Test<sub>3</sub>).

Las mejores alternativas económicas fueron todos los tratamientos en comparación con sus respectivos testigos.

**Palabras clave:** Cepas nativas, cepa exótica, pruebas de crecimiento radial, pruebas de antagonismo, incidencia y severidad.

**CERTIFICACIÓN**

Ing. Elizabeth Urbano

Ing. Abraham Oleas

**Certifican:**

Que el trabajo titulado “**EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE ROSAS**”, realizado por **ROSA MIKAELA YUMBAY YALLICA**, 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.

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 Rosa Mikaela Yumbay Yallica que lo entregue al Ing. Eduardo Urrutia, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

-----  
Ing. Máster Elizabeth Urbano-----  
Ing. Msc. Abraham Oleas.**DIRECTOR****CODIRECTOR**

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

ROSA MIKAELA YUMBAY YALLICA

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado **“EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE ROSAS”**, 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, Julio del 2011

-----

Rosa Mikaela Yumbay Yallica

## AUTORIZACIÓN

Yo, Rosa Mikaela Yumbay Yallica

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE ROSAS**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Julio del 2011

-----

Rosa Mikaela Yumbay Yallica

**DEDICATORIA**

A mis queridos padres Zoila y Alberto, quienes me han brindado su apoyo incondicional y han sido un pilar fundamental de mi vida.

A mi hermana Mariana y mi cuñado Raúl, quienes han sido mi ejemplo a seguir y mi apoyo durante toda mi vida.

**Con cariño Mikaela Yumbay**

**AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios, quien siempre me guía y nunca me deja sola en el camino.

A mis padres, quienes me han acompañado y me han impulsado a seguir adelante tras mis sueños.

A mi hermanas, quienes con sus consejos me han dado ánimos para continuar.

A mis amigos, por ser los verdaderos hermanos que uno encuentra durante el caminar.

A la universidad, por hacer posible la realización de este trabajo de investigación.

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

A mi Director, Codirector y Biometrista por su tiempo invertido en el desarrollo de esta investigación, sus enseñanzas y su respeto.

Al Ing. Abraham Oleas y Licenciado Marco Taco, por su absoluta colaboración.

**Mikaela Yumbay**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	4
2.1. GENERAL .....	4
2.2. ESPECÍFICOS .....	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. CONTROL BIOLÓGICO .....	5
3.1.1. Generalidades .....	5
3.1.2. Mecanismos del Control Biológico .....	6
3.1.2.1. Competición .....	6
3.1.2.2. Endólisis y Exólisis .....	6
3.1.2.3. Micoparasitismo .....	7
3.1.2.4. Fungistasis .....	8
3.1.3. Selección de Microorganismos con capacidades antagónicas.....	8
3.2. <i>Trichoderma</i> .....	9
3.2.1. Generalidades .....	9
3.2.2. Clasificación taxonómica .....	9
3.2.3. Características Morfológicas .....	10
3.2.4. Ecología de <i>Trichoderma</i> sp.....	11
3.2.5. Mecanismos de Acción de <i>Trichoderma</i> sp. ....	12
3.2.6. Estrategias de Biocontrol.....	12
3.3. <i>Botrytis</i> o Moho Gris .....	14
3.3.1. Clasificación Taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i> .....	15

3.3.2. Morfología.....	15
3.3.3. Ciclo Biológico y Aspectos Epidemiológicos.....	16
3.3.4. Condiciones Óptimas para el Desarrollo de <i>B. cinerea</i> .....	18
3.3.4.1. Humedad Relativa.....	18
3.3.4.2. Temperatura.....	19
3.3.4.3. pH.....	19
3.3.5. Factores que predisponen a las plantas al ataque de <i>Botrytis cinerea</i> .....	19
3.3.8. Síntomas.....	20
3.3.9. Métodos de Control.....	21
3.3.9.1. En el campo.....	23
3.3.9.2. En postcosecha.....	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA EN ESTUDIO.....	24
4.2. MATERIALES.....	24
4.2.1. Fase de laboratorio.....	24
4.2.2. Fase de campo.....	25
4.3. MÉTODOS.....	25
4.3.1. Toma de muestras de suelo.....	25
4.3.2. Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp. ....	26
4.3.3. Aislamiento y purificación de <i>Botrytis cinerea</i> .....	26
4.3.4. Conservación de las cepas.....	27
4.3.4.1. Conservación de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Botrytis</i> en silica gel.....	27
4.3.4.2. Conservación de <i>Trichoderma</i> sp. en suelo estéril.....	28
4.3.5. Caracterización de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. nativas de la finca.....	29

4.3.6. Distribución de los tratamientos en la fase de laboratorio.....	30
4.3.6. Preparación de los bioformulados .....	35
4.3.7. Determinación de la concentración de esporas.....	36
4.3.8. Aplicación de los bioformulados.....	38
4.3.9. Distribución de los tratamientos en la fase de campo .....	39
4.4.0. ANÁLISIS ECONÓMICO.....	44
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
5.1. FASE DE LABORATORIO .....	45
5.1.1. Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	45
5.1.2. Caracterización de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	46
5.1.3. Crecimiento diametral de <i>Trichoderma</i> spp. y pruebas de antagonismo .....	47
5.1.4. Actividad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp. según la escala de Bell <i>et al.</i> ,(1982)....	51
5.1.5. Capacidad de conidiación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	52
5.1.6. Pruebas de susceptibilidad de <i>Trichoderma</i> spp. frente a productos químicos .....	53
5.2. FASE DE CAMPO.....	56
5.2.1. Severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en cámara húmeda .....	56
5.2.2. Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en campo.....	61
5.2.3. Severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en tres variedades de rosa evaluadas en el campo.....	63
5.3. VIDA EN FLORERO.....	66
5.3.1. Severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en variedades de rosa en la prueba de florero.....	66
5.3.2. Incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en variedades de rosas en la prueba de florero .....	70
5.4. Análisis Económico.....	72

VI. CONCLUSIONES .....	75
VII. RECOMENDACIONES.....	76
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	77
IX. ANEXOS.....	81

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 4.3.:</b> Distribución de los tratamientos en la fase de laboratorio .....	30
<b>Cuadro 4.4.:</b> Escala de Bell <i>et al.</i> , (1982) para la evaluación de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp. ....	34
<b>Cuadro 4.5.:</b> Distribución de los tratamientos en la fase de campo .....	39
<b>Cuadro 4.6.:</b> Grados de severidad de la enfermedad causada por el hongo <i>Botrytis cinerea</i> , en rosas. ....	43
<b>Cuadro 5.1:</b> Cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas de la florícola San Alfonso.....	45
<b>Cuadro 5.2:</b> Crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. durante las pruebas diametrales (crecimiento diametral de <i>Trichoderma</i> (D1 y D2) y crecimiento de <i>Trichoderma</i> en las pruebas de antagonismo (T1 y T2)). ....	49
<b>Cuadro 5.3:</b> Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en las pruebas de antagonismo (Crecimiento de <i>Botrytis</i> (B1 y B2)).....	51
<b>Cuadro 5.4.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la actividad antagónica según la escala de Bell <i>et al.</i> , (1982).....	52
<b>Cuadro 5.5.:</b> Capacidad de conidiación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	53
<b>Cuadro 5.6.:</b> Pruebas de susceptibilidad de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a productos químicos ( Sanystar (St), Switch (Sw), Collis (C) y Teldor (T)) y su efecto en el crecimiento longitudinal (D1) y transversal (D2) (cm).. ....	55
<b>Cuadro 5.7.:</b> Probabilidades ajustadas a cada fuente de variación de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> de los tratamientos evaluados en cámara húmeda. ....	58
<b>Cuadro 5.8.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> de los tratamientos evaluados en cámara húmeda. ....	59

<b>Cuadro 5.9.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en cámara húmeda ante la aplicación de la cepas de <i>Trichoderma</i> spp., evaluadas durante 7 semanas.....	60
<b>Cuadro 5.10.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> de las variedad de rosas evaluadas en cámara húmeda.....	60
<b>Cuadro 5.11.:</b> Promedios $\pm$ error estándar del porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en los tratamientos evaluados en el campo.....	62
<b>Cuadro 5.12.:</b> Promedios $\pm$ error estándar del porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> por acción de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. evaluadas en el campo.....	62
<b>Cuadro 5.13.:</b> Promedios $\pm$ error estándar del porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en las variedades evaluadas en el campo.....	63
<b>Cuadro 5.14.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> de los tratamientos evaluados en el campo.....	64
<b>Cuadro 5.15.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> por aplicación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. evaluadas en el campo.....	65
<b>Cuadro 5.16.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> en las variedades de rosas evaluadas en campo.....	66
<b>Cuadro 5.17.:</b> Probabilidades ajustadas a cada fuente de variación de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> de los tratamientos evaluados en el florero.....	67
<b>Cuadro 5.18.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> de los tratamientos evaluados en el florero.....	68
<b>Cuadro 5.19.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad de infección de <i>Botrytis cinerea</i> por la aplicación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. evaluadas en florero.....	69

<b>Cuadro 5.20.:</b> Promedios $\pm$ error estándar de la severidad del ataque de <i>Botrytis cinerea</i> en las variedades de rosas evaluadas en la prueba de florero. ....	70
<b>Cuadro 5.21.:</b> Porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> de los tratamientos evaluados en el florero. ....	71
<b>Cuadro 5.22.:</b> Promedios $\pm$ error estándar del porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> por acción de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. evaluadas en la prueba de florero. ....	71
<b>Cuadro 5.23.:</b> Promedios $\pm$ error estándar del porcentaje de incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> en las variedades de rosas evaluadas en la prueba de florero. ....	72
<b>Cuadro 5.24.:</b> Beneficio bruto, beneficio neto y costos variables de cada uno de los tratamientos. ....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.3.:</b> Diagrama de <i>Botrytis cinerea</i> ; a) Conidióforo de <i>Botrytis cinerea</i> produciendo agrupaciones de esporas; b) Esporulación en la punta del conidióforo; c) Conidias maduras. Fuente: Dibujos realizados por L. Gray (Sandón, 2005).....	14
<b>Figura 3.4.:</b> Ciclo de vida de <i>Botrytis cinérea</i> (Martínez & Moreno, 2008).....	18
<b>Figura 4.3.:</b> Variables medidas durante la evaluación del crecimiento radial D1 (crecimiento longitudinal) y D2 (crecimiento transversal) de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
<b>Figura 4.4.:</b> Variables evaluadas durante las pruebas de antagonismo (crecimiento del antagonista <i>Trichoderma</i> (T1 y T2) y crecimiento del patógeno <i>Botrytis</i> (B1 y B2).....	33
<b>Figura 4.5.:</b> Bioformulado de <i>Trichoderma</i> spp. de la cepa 8a. ....	36
<b>Figura 4.6.:</b> Aplicación del bioformulado en campo a) Pantallas fijas para evitar el efecto de los testigos y tratamientos, b) Fumigador aplicando el bioformulado con una bomba de mochila.....	38
<b>Figura 4.7.:</b> Tallos etiquetados luego de haber realizar un pinch.....	39
<b>Figura 4.8.:</b> Distribución de los tratamientos en el campo (Villacís, 2011).....	41
<b>Figura 4.9.:</b> Identificación de los tratamientos en el campo. ....	41
<b>Figura 4.10.:</b> Preparación de los botones para la realización del viaje simulado.....	42
<b>Figura 4.11.:</b> Botones florales durante la evaluación en el florero .....	43
<b>Figura 5.1:</b> Cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> spp. de la Florícola San Alfonso S.A. ....	46
<b>Figura 5.2.:</b> Colonización <i>Trichoderma</i> spp. (T) sobre micelio de <i>Botrytis cinerea</i> (B)....	47
<b>Figura 5.3.:</b> Dendrograma de clasificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en base a su crecimiento diametral .....	48



**Figura 5.4.:** Dendrograma de clasificación de las cepas de *Trichoderma* spp. en base a su capacidad antagonica ..... 50

**Figura 5.5.:** Dendrograma de clasificación de las cepas de *Trichoderma* spp. en base a su capacidad de crecimiento frente a fungicidas ..... 54

**Figura 5.6.:** Vida en florero de las variedades evaluadas, a) Variedad Amelia b) Variedad Dekora c) Variedad Freedom..... 66

**Figura 5.7.:** Costos variables vs. Beneficio neto de los tratamientos evaluados..... 73

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Medio selectivo para el aislamiento de *Trichoderma* spp. .... 81

**Anexo 2.** Concentración de componentes para preparación de caldo criogénico A ..... 82

**Anexo 3.** Cuadro para la caracterización de aislados de *Trichoderma* spp..... 83

**NOMENCLATURA**

°C	Centígrados
msnm	metros sobre el nivel del mar
mm/año	milímetros por año
μl	microlitros
ml	mililitro
cm	centímetro
TSMC	Medio selectivo para el aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.
PDA	Agar Papa Dextrosa
g	gramos
rpm	revoluciones por minuto
min	minuto
AA	Agar agua
Kg	Kilogramo
m	metros
μm	micrómetro
mm	milímetro

## I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la actividad florícola de exportación es uno de los rubros más importantes, ya que representa aproximadamente el 3% del total de ventas. Se la ubica en el cuarto producto de exportación. Además, el Ecuador es considerado el tercer país exportador de flores del mundo, sólo superado por Holanda y Colombia (Luzuriaga citado por Diario Hoy, 2009).

El cultivo de rosas en el Ecuador ha tenido un profundo impacto, debido a la excelente calidad de su flor en el mercado internacional, lo que ha provocado la expansión del sector florícola favorecido por las condiciones requeridas para su cultivo (Borja citado por Mozo & Calvache, 2004). Estas condiciones también son apropiadas para el desarrollo de microorganismos patógenos que son una limitante para la exportación de flores (Sandón, 2005).

Uno de los microorganismos patógenos más importantes en el cultivo de rosas lo constituye el hongo *Botrytis cinerea*. Se estima que este hongo es capaz de generar pérdidas que van desde el 5% al 10%. *Botrytis cinerea* es un hongo que tiene una amplia distribución en el mundo y está presente en casi todos los invernaderos destinados a la exportación de flor cortada, permanece latente a bajas temperaturas hasta encontrar condiciones ideales para su desarrollo. Los controles más efectivos se los ha logrado con el empleo de fungicidas químicos (Buestán, 1998).

Por esta razón se buscan nuevas alternativas que se fundamenten en un modelo de desarrollo agrícola, para satisfacer las necesidades de la sociedad sin comprometer el medio ambiente y los recursos naturales. Apoyándose en factores para que sea económicamente viable, ecológicamente equilibrada y socialmente factible (Estrada, 2010).

Estos nuevos métodos de control son el resultado del progresivo interés del mercado mundial por limitar el uso de agroquímicos perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente; por ello, numerosos floricultores se hallan empeñados en la búsqueda de tecnologías amigables con el medio ambiente, que lleven a instaurar una estrategia válida para propiciar la producción florícola de alta calidad y rentabilidad. Esta estrategia en gran medida se refiere a la utilización de biodepredadores eficaces para el control de enfermedades; dentro de este grupo se encuentra el género *Trichoderma* (Asero, 2007).

Hongos del género *Trichoderma* spp. han demostrado ser eficientes controladores de enfermedades fungosas, habiéndose comprobado su eficiencia con una amplia gama de hongos fitopatógenos tales como *Armillaria mellea*, *Fusarium* sp. *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp., *Aspergillus niger*, entre otros (Cook y Baker citado por Cornejo, 2005).

En muchas fincas se está utilizando este hongo que ha mostrado buenos resultados en el biocontrol, pero no se ha realizado una evaluación de su eficiencia. Varios estudios han

determinado que el control biológico es más efectivo con cepas locales y adaptadas, pero en otras condiciones resulta efectivo el uso de cepas de otras localidades, por esta razón es necesario determinar que cepa es efectiva (Benzing, 2001). Esta fue la razón por la cual se propone realizar la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. nativas y de otra localidad a nivel de laboratorio y de campo, con el propósito de brindar una nueva estrategia que logre controlar eficazmente a *Botrytis cinerea*.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. GENERAL

- Evaluar la eficiencia de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. en el control de *Botrytis cinerea* en Rosas.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Aislar, purificar y conservar cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la finca San Alfonso S.A., para su empleo como una alternativa de control de *Botrytis* en rosa.
- Caracterizar las cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la finca San Alfonso S.A.
- Realizar pruebas de antagonismo a nivel de laboratorio con las cepas obtenidas de la finca San Alfonso S.A. y la cepa C19 del IASA.
- Evaluar bioformulados a base de *Trichoderma* en el campo.
- Evaluar el viaje simulado y la vida en florero de las rosas.
- Analizar la relación costo beneficio de los tratamientos evaluados.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CONTROL BIOLÓGICO

##### 3.1.1. Generalidades

El control biológico es una opción de control por métodos de cultivo que comprende principalmente prácticas que alteran la condición biótica-abiótica a partir de una condición que favorece a la enfermedad a otra que reduce la acumulación de propágulos y reduce la actividad nociva de los patógenos, ya sean hongos, bacterias, nematodos o virus. Estos medios de control por métodos de cultivo dependen del conocimiento del ciclo de vida del patógeno involucrado y de los factores que influyen en su existencia, supervivencia y proceder patogénico en una situación ecológica particular (Aragones, 1989).

El control biológico, comparado con el control químico convencional ofrece ciertas ventajas que vale la pena nombrar. En primer lugar, es un mecanismo natural que no deja residuos xenobióticos, es decir, residuos cuya estructura química es poco frecuente o inexistente por ser compuestos sintetizados. En segundo lugar, controla y evita plagas y enfermedades propias de los diferentes cultivos manteniendo el ecosistema natural del suelo. Ahora, este punto es bastante importante; pues no basta con aplicar indiscriminadamente un gran número de organismos al suelo, sin antes comprender la dinámica propia del suelo. Conocer y mejorar los factores limitantes del crecimiento o de supervivencia de los agentes biológicos es necesario para un buen control biológico (Siddiqui citado por Gómez, 2008).



### **3.1.2. Mecanismos del Control Biológico**

Existen muchas estrategias por medio de las cuales un organismo puede operar: la rápida colonización en relación con el avance del patógeno, la subsecuente competición o por medio del combate directo, que incita a la exclusión del nicho ecológico del patógeno especialmente por medio de antibióticos, micoparasitismo o lisis del patógeno, o la combinación de estos. En adición algunos microorganismos pueden actuar simplemente procurando un crecimiento óptimo de la planta, de forma tal que la enfermedad no es remediada, o sus síntomas son parcialmente enmascarados (Elad *et al.*, citado por Falconí, 1997).

#### **3.1.2.1. Competición**

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Vero y Mondino, 1999).

#### **3.1.2.2. Endólisis y Exólisis**

La lisis es la destrucción completa o parcial de una célula por medio de enzimas. Se distinguen principalmente dos tipos de lisis: la endólisis y la exólisis. La endólisis (denominada igualmente autólisis) considerada como la ruptura del citoplasma, causada por la acción de enzimas de la misma célula, seguido de la muerte. La endólisis usualmente no

está relacionada con la destrucción de la pared celular. En cambio, la exólisis (denominada heterólisis) es la destrucción de una célula por medio de enzimas de otro organismo (Falconí, 1997).

### **3.1.2.3. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es esencialmente una interacción hospedero-parásito. La interacción comienza con el reconocimiento del hospedero o de moléculas liberadas por este, por acción enzimática del micoparásito. Tales señales pueden ser generadas durante el contacto o el acercamiento del hospedero (Mukherjee *et al.*, 2004 citado por Chavez, 2006).

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 citado por Cholango, 2009). El paso siguiente consiste en 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.*, citado por Cholango, 2009).

En la degradación de la pared celular de los fitopatógenos intervienen las enzimas hidrolíticas producidas por los microorganismos antagonistas como factores biocontroladores (Rey *et al.*, citado por Chavez, 2000).

#### **3.1.2.4. Fungistasis**

La fungistasis, es la imposición de dormancia especialmente de esporas fungales por medio de la limitación de nutrientes. La más común de esta, es la relacionada con la disponibilidad de elementos nutritivos, el más estudiado hasta el momento el carbono. Es conocido que algunos patógenos producen estructuras de latencia de varios tipos, los mismos que permanecen dormantes en el suelo hasta que existan nutrientes disponibles. La flora saprofitica, puede reducir los niveles de carbono y establecer la fungistasis en el patógeno, previniendo su germinación y la subsecuente infección (Falconí, 1997).

#### **3.1.3. Selección de Microorganismos con capacidades antagónicas**

Los microorganismos antagónicos son omnipresentes en diferentes ecosistemas, y el control biológico de patógenos es un proceso que se produce en todo lugar y a toda hora. Es relativamente fácil aislar organismos de este tipo. Romo (1993) y Cali (1993) encontraron propágulos de varias especies de hongos del género *Trichoderma* en 40% y 62%, respectivamente, de muestras de suelos de zonas hortícolas (Benzing, 2001).

La selección de microorganismos antagonistas potenciales para el control biológico, se basan en la capacidad de competencia, elaboración de sustancias antibióticas, mecanismos indirectos como la inducción de la resistencia, etc., pugna de espacio, procurando las mejores condiciones para sitios de fijación, entradas, zonas de exudación o por nichos micro-ecológicos, en donde su colonización asegure su mantenimiento. El enorme espectro

de actividad y variedad de antibióticos lo conforman sustancias sencillas, en bajas concentraciones con capacidad de tolerar altas presiones de vapor que en la mayoría de los casos actúan en forma de narcóticos y demás toxinas, que pueden afectar a una inmensa variedad de organismos superiores (Falconí, 1997).

### **3.2. *Trichoderma***

#### **3.2.1. Generalidades**

*Trichoderma* corresponde a un tipo de hongo anamórfico, que está presente en casi todos los suelos y otros hábitats diversos (Grondona *et al.*, 1997 citado por Chavez, 2006). Es un habitante común del suelo, controla una gran gama de fitopatógenos tales como *Armillaria mellea*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Chondrostereum purpureum*, *Sclerotium rolfii*, y *Heterobasidion annosum* (Cook, 1989 citado por Obreque, 2004).

#### **3.2.2. Clasificación taxonómica**

División 1: MYXOMICOTINA

Subdivisión 4: DEUTEROMYCOTINA

Clase 2: HYPHOMICETES

Orden: *Hyphales*

Familia: *Monilaceae*

Género: *Trichoderma*

Especie: *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. viride*, entre otras (Agrios, 1996).

*Trichoderma* es un hongo imperfecto, heterótrofo, anaerobio, con una pared celular compuesta por quitina, de rápido crecimiento. Sus esporas asexuales se forman sobre las hifas o en su interior, se encuentran expuestas libremente a la atmósfera (Agrios 1996, citado por Cornejo, 2005).

El género *Trichoderma* posee conidióforos erectos, altamente ramificados, más o menos cónicos, al final del conidióforo las conidias se agrupan en forma de pelota . Las conidias son de distinto tamaño y forma, pueden ser subglobosas y ovoides (Cook & Baker citado por González, 2000).

### **3.2.3. Características Morfológicas**

El género *Trichoderma* presenta las siguientes estructuras:

- Conidióforos: Son erectos, hialinos, no verticilados, los cuales pueden ser solitarios o en grupos (Arango *et al.*, 1988, citado por Chavez, 2006). Los conidióforos son muy ramificados, a menudo formado por anillos concéntricos o transmitidas a lo largo de las hifas aéreas (Bradley, 2008).
- Fialides: Son en forma de botellas, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgadas hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos (Arango *et al.*, 1988, citado por Chavez, 2006). Pueden estar dispuestos regularmente en forma de verticilos, en parejas alternadas o en disposiciones irregulares (Gams y Bisett citado por Cholango 2009).

- Hifas: Pueden ser anchas y rectas o relativamente angostas y flexibles (Gams y Bisett citado por Cholango 2009).
- Conidias: Son suaves, verdes, subglobosas a cortas ovoides, con medidas de 2,4 a 3,2 x 2,2 a 2,8  $\mu\text{m}$  (Rifai, 1969, citado por Cook *et al.*, 1989, citado por Obrequé, 2004). 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. 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 (Gams y Bisett citado por Cholango 2009)..
- Clamidosporas: Son muy comunes en las especies de *Trichoderma*, intercaladas o raramente terminales las que son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave (Cook & Baker citado por González, 2000).

#### **3.2.4. Ecología de *Trichoderma* sp.**

*Trichoderma* sp. es capaz de crecer en suelos con un pH de 2,5 a 9,5; aunque la mayoría prefiere un entorno moderadamente ácido. Las colonias al inicio del crecimiento son generalmente de color blanco y luego desarrollan tonos amarillentos hasta tonos verdes. Las colonias de *Trichoderma* spp., son de rápido crecimiento, con micelio compactado de blanco a verde (Bradley, 2008).

### 3.2.5. Mecanismos de Acción de *Trichoderma* sp.

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

- El primer tipo de protección la logra al consumir ese exudado que liberan las raíces. Este exudado es el alimento inicial que usan los hongos patógenos para infectar la planta y muchos de estos hongos patógenos usan este exudado para encontrar las raíces que ellos infectan (Purces *et al.*, citado por Gómez, 2008).
- El segundo tipo de protección de *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 (Purces *et al.*, citado por Gómez, 2008). Los micelios se enrollan alrededor de las hifas del hongo presa, produciendo un estrangulamiento. Se ha observado que hifas susceptibles son penetradas siendo vacuoladas, colapsando y siendo finalmente desintegradas (Cook *et al.*, 1989, citado por Obreque, 2004).
- El tercer tipo de protección es por exclusión. Esto es porque *Trichoderma* sp; ocupa todos los espacios cercanos a las raíces formando una barrera física y excluyendo (Purves *et al.*, citado por Gómez, 2008).

### 3.2.6. Estrategias de Biocontrol

El uso de *Trichoderma* como un tratamiento preventivo de las infecciones de heridas o podas de árboles frutales, ha tenido considerable éxito. Las preparaciones comerciales de

*Trichoderma* son destinadas para tratar las porciones aéreas de árboles contra un gran número de pudriciones. Otra de las aplicaciones más recientes de este hongo es su uso como un microorganismo promotor de crecimiento vegetal, es decir, que en ausencia del patógeno, el vegetal se sirve de la producción de metabolitos del organismo (Falconí, 1997).

Las especies de *Trichoderma*, produce enzimas tales como quitinasas y/ glucanasas que pueden ser responsables de la disminución de los hongos patógenos (De la Cruz *et al.*, 1995, citado por Chavez, 2006). Estas enzimas son hidrolíticas y degradan los polisacáridos que otorgan rigidez y estructura a la pared celular de hongos destruyendo la integridad de los mismos; así mismo se ha establecido que estos hongos pueden producir proteasa que afectan las enzimas de los patógenos perturbando su capacidad de atacar las células de las plantas (Howell, 2003, citado por Chavez, 2006). El género *Trichoderma* no son exigentes en cuanto al uso de nutrientes, utilizan como fuente de Carbono casi todo componente carbónico, no importa si son aminoácidos, azúcares o fenoles, que para otros hongos, no pudieran ser beneficiosos, incluso pueden utilizar taninos condensados. Parecen ser especializados a substratos orgánicos, como “primeros colonizadores”, los cuales utilizan sustancias digeribles, por ello en algunas ocasiones se los localiza en substratos predigeridos, bajo esas condiciones y gracias a su alta potencia parasítica y su cualidad de formar algunos tipos de antibióticos (Allen & Haenseler citados por Falconí, 1997).

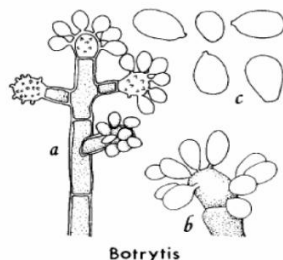


### 3.3. *Botrytis* o Moho Gris

Es una de las enfermedades de más amplia difusión a nivel mundial pudiendo producir severos daños no sólo a muchas especies de flores y ornamentales, sino otros vegetales (Gallegos *et al.*, 1999).

En rosa, *Botrytis* (Figura 3.3) también puede producir cáncer en los tallos. Los daños más severos de *Botrytis* se producen en almacenamiento o tránsito. Las infecciones no necesariamente son visibles al momento del corte de la flor, pero se desarrollan rápidamente en condiciones de humedad durante el almacenamiento y el transporte (Kenneth, 1998).

La susceptibilidad al moho gris de los órganos de las plantas, particularmente frutos y flores, se incrementa con la edad o maduración. Los factores que aceleran la senescencia, como el etileno, tiende a incrementar la susceptibilidad, mientras que los tratamientos que disminuyen la senescencia, como el calcio, citoquinina y giberelina, tienden a incrementar la resistencia (Elad citado por Martínez y Moreno, 2008).



**Figura 3.3.: Diagrama de *Botrytis cinerea*; a) Conidióforo de *Botrytis cinerea* produciendo agrupaciones de esporas; b) Esporulación en la punta del conidióforo; c) Conidias maduras. Fuente: Dibujos realizados por L. Gray (Sandón, 2005).**

### 3.3.1. Clasificación Taxonómica de *Botrytis cinerea*

Super Reino: Eucaryote

Reino: Fungi

División: Amastigomycota

Subdivisión: Deuteromycota

Clase: Deuteromycetes

Subclase: Hyphomycetidae

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *cinerea* (Barnett y Barry citado por Sandón, 2005)

### 3.3.2. Morfología

La enfermedad es producida por el hongo de la Clase Deuteromycetes o Imperfecta, Orden Moniliales cuya fase asexual se denomina *Botrytis cinerea* y la sexual o teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (solo en algunas especies de *Botrytis*). El hongo no desarrolla cuerpos fructíferos especiales y la agrupación de las conidias da el nombre al género; *botrys* derivado del griego que significa “racimo de uvas” (Kenneth, 1998).

*Botrytis cinerea* forma conidios en forma de huevos hialinos, unicelulares, ovoides sobre extremos redondeados, engrosados, de conidióforos ramificados que se desarrollan libres sobre la superficie de los tejidos infectados. En ocasiones el patógeno también forma esclerocios aplastados e irregulares o hemisféricos, de color negro que se desarrollan sobre, o debajo de la epidermis de la planta. Dichos esclerocios presentan un anillo exterior oscuro

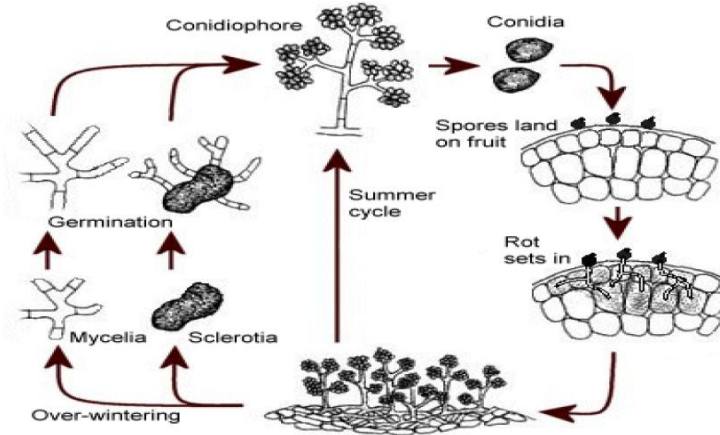
y médula central blanquesina y le sirven al hongo como cuerpos de resistencia para la invernación (Gallegos *et al.*, 1999).

### **3.3.3. Ciclo Biológico y Aspectos Epidemiológicos**

El hongo es capaz de actuar como un hongo saprofito y como un hongo patógeno; se hace referencia a las diferentes fuentes de inóculo, que permiten mantener el hongo en el cultivo y ser capaz de infectar nuevamente tejido susceptible. Los conidios pueden dispersarse a las flores sanas por acción del viento, el agua o las operaciones de cosecha (Sandón, 2005).

El hongo puede hibernar como micelio, el cual vive sobre material moribundo de la planta. Este puede también formar esclerocios y permanecer por varios años en el suelo, hasta que las condiciones sean favorables. Cuando éstas son adecuadas, los esclerocios pueden evolucionar en dos formas, en forma de apotecios que encierran los ascos y ascosporas (propagación sexual) y en forma de conidióforo (portador de conidios) que es la evolución más frecuente (reproducción asexual). Los conidios maduros se sueltan y son transportados por el viento o por la lluvia, en condiciones adecuadas ellos pueden encontrar y atacar un nuevo hospedero. Después de establecidos, los conidios generan nuevo micelio el cual invade los tejidos, causando el colapso y la desintegración de las células, los tejidos se emblandecen y se pudren como resultado de la podredumbre gris. Con crecimiento adicional el hongo intenta la producción de conidióforos de nuevo, los cuales se quedan en el hospedero, y nuevos conidios son liberados. El ciclo continúa hasta que las condiciones

climáticas y nutricionales sean desfavorables para el desarrollo de la enfermedad (Martínez y Moreno, 2008).



**Figura 3.4.: Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* (Martínez & Moreno, 2008).**

Según Benito *et al.*, 2000 (Martínez y Moreno, 2008) el ciclo de infección inicia una vez que los conidios han alcanzado la superficie del hospedero que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias fases:

1. La adhesión y germinación de los conidios sobre la superficie del hospedero.
2. Su penetración en el tejido vegetal a través de heridas o de aberturas naturales, o directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración).
3. El establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de

una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta.

4. En muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en las áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias.
5. Transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su disseminación en el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve período de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de conidios que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

### **3.3.4. Condiciones Óptimas para el Desarrollo de *B. cinerea***

El clima es un factor de gran importancia para el establecimiento y desarrollo del hongo en el tejido vegetal o sustrato. Los dos elementos que más influyen son la humedad relativa y la temperatura.

#### **3.3.4.1. Humedad Relativa**

La humedad relativa se considera como el principal factor en el desarrollo del hongo *Botrytis cinerea* para su crecimiento. Necesita de alta humedad relativa, principalmente para la germinación de los conidios ya que estos germinan en un rango de 93-100% de humedad relativa, mientras que la esporulación del hongo comienza cuando la humedad

relativa se ubica entre 70 y 100% (Eden *et al*, Barnes & Shaw citados por Martínez y Moreno, 2008).

#### **3.3.4.2. Temperatura**

Este factor es de gran importancia para el crecimiento del hongo. La temperatura óptima para el crecimiento del hongo y desarrollo de la enfermedad es 15 °C (Kenneth, 1998). El patógeno es activo a bajas temperaturas y causa pérdidas considerables en los cultivos en periodos prolongados de bajas temperaturas; presenta problemas cuando la temperatura se encuentra entre 0 y 10°C (Agrios, 2005).

#### **3.3.4.3. pH**

Los conidios de *Botrytis* germinan desde un pH de 3.7, encontrándose una germinación óptima a un pH de 4 (Figuerola & García citados por Martínez y Moreno, 2008).

#### **3.3.5. Factores que predisponen a las plantas al ataque de *Botrytis cinerea***

Las prácticas culturales crean muchas veces oportunidades para las infecciones por ejemplo, realizar heridas o quitar las hojas inferiores en los esquejes facilitan el proceso de penetración en plantas ornamentales (Daughtrey *et al.*, citados por Sandón, 2005)

La condensación de agua en invernaderos es muy alta cuando la temperatura externa está bajando y la humedad en general es alta. La condensación puede ser reducida por ventilación y circulación de aire (Gallegos *et al.*, 1999).

### **3.3.7. Síntomas**

*Botrytis cinerea* causa quemazón del botón flora, pudrición de las yemas, lesiones en los tallos, pudrición del tallo y corona, pudrición de los cortes, necrosis de hojas y “damping off” o pudrición de plántulas (University of Illinois, 1997 citado por Sandón, 2005). La penetración puede ocurrir a través de aberturas naturales, directamente o por heridas; por medio de tubos germinativos de las conidias, el crecimiento hifal sobre tejido necrosado de las plantas muertas colonizadas o por desechos orgánicos que entran en contacto con los tejidos sanos (Gallegos *et al.*, 1999).

El primer síntoma es la aparición de una pequeña mancha de color habano que se puede agrandar rápidamente (Stanton *et al.*, 2001). El hongo una vez que se ha establecido en los pétalos de la flor aparece como una mancha irregular, alargada, oscura y acuosa; los pétalos infectados se pudren y se vuelven café oscuro, el micelio de *Botrytis cinerea* continua creciendo e invade el resto de la flor y si la condición de humedad persiste, ocurre la producción de conidias (University of Illinois, 1997 citado por Sandón, 2005).

En el cultivo, durante periodos prolongados de bajas temperaturas y humedad continua, la infección primero aparece como una lesión acuosa y parda en el tejido afectado, las flores no se abren y son cubiertas con un crecimiento micelial de color negro grisáceo, los botones infectados eventualmente pueden caer y la enfermedad puede extenderse a lo largo del tallo, hacia abajo (Gallegos *et al.*, 1999).

*Botrytis* puede infectar las partes terminales de los tocones que resulten del corte de las flores y también a través de las heridas de las podas tanto en invernaderos como en cultivos de campo, al final de estas infecciones producen la lancha de los tallos. En plantas adultas se producen extensas necrosis a partir de los sitios en los que se han realizado cortes para podas o cosechas de flores. Los cánceres causados por *Botrytis* pueden desarrollarse en cualquier parte donde se produzcan las heridas, cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables para el desarrollo del hongo. Aparecen recubiertas de un tejido grisáceo pulverulento que corresponde al micelio, conidióforo y conidios del hongo. Las lesiones se presentan en los cortes con tijeras no desinfectadas, como pudriciones secas que avanzan del lugar del corte hacia abajo dañando la yema inmediata, en los botones como halos rojizos con una puntuación hendida en el centro (Kenneth, 1998).

### **3.3.8. Métodos de Control**

La prevención de enfermedades causadas por *Botrytis cinerea* puede resultar muy difícil cuando el clima es nublado, fresco y muy húmedo. La base del control es el saneamiento y



la prevención evitando períodos extendidos durante los cuales el follaje permanezca mojado (Stanton *et al.*, 2001).

### **3.3.8.1. En el campo**

Una de las medidas recomendadas es el retiro de las plantas viejas y afectadas de la zona de producción. Además, de utilizar densidades de siembra que permita que el agua se seque rápidamente después del riego. Dentro de los invernaderos los sistemas que propicien el movimiento de aire y la calefacción nocturna pueden minimizar los períodos en que el follaje permanece mojado (Stanton *et al.*, 2001).

El agua condensada en los invernaderos se acumula cuando la temperatura exterior cae. Esto se puede reducir ventilando mejor los invernaderos, las culatas de sarán ayudan a reducir la condensación interna. De otro lado, como el agente causal requiere de preferencia para esporular de luz ultravioleta de longitudes de onda entre 310 a 390 nanómetros, resulta importante proteger el cultivo con una cubierta que no permita el paso de luz ultravioleta, es decir, cambiar el plástico del invernadero con cubierta de inhibidores UV. Se recomienda usar fungicidas protectantes para cubrir las heridas. Desinfecciones de suelo o aplicaciones de fungicidas al suelo, podrían ser recomendables en casos de prevalencia peligrosa. Cabe recalcar que se debe realizar rotación de productos para evitar que el hongo genere resistencia (Gallegos *et al.*, 1999).

En evaluaciones de antagonismo para controlar al moho gris en rosas, se encontró que aislamientos microbianos de hojas y pétalos, y microorganismos de colección de laboratorio al ser evaluados frente al hongo patógeno, como *Trichoderma inhamatum*, *Cladosporium oxysporum* y *Gliocladium roseum* fueron los microorganismos más efectivos frente a *Botrytis cinerea* en los botones florales, reduciendo el número de lesiones en un 46-65% comparado con un 59-89% para un fungicida estándar. Esto sugiere que la aplicación de estos antagonistas a las hojas y flores optimiza el control de la producción de inóculo de *Botrytis cinerea* cuando estos tejidos mueren, por cuanto reducen la esporulación del patógeno (Tatagiba *et al.*, citados por Sandón, 2005).

#### **3.3.8.2. En postcosecha**

Se debe mantener la mayor asepsia posible evitando la presencia de flores, tallos, hojas o cualquier residuo vegetal viejo procesado con anterioridad a nivel de cuarto frío, a más de la asepsia que se debe guardar, la temperatura debe mantenerse en niveles muy bajos (0-2°C) y con adecuada ventilación. Finalmente durante el transporte se debe procurar mantener bajas temperaturas en el interior de las cajas, para lo cual en ocasiones incluso es conveniente usar fundas de hielo o en su defecto transportar las cajas en vehículos o aviones que dispongan de refrigeración. Las rosas se deben sumergir en un botricida para protegerlas en el almacenamiento (Gallegos *et al.*, 1999).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA EN ESTUDIO**

La fase de laboratorio se llevó a cabo en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Sector San Fernando, hacienda El Prado, en el laboratorio del área de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA, ubicada a 78°24'44'' (O) y 0° 23'20'' (S) con una altitud de 2.748 msnm (Pozo *et. al*, 2006). La humedad relativa promedio es del 67,91% y una temperatura promedio de 13,96 °C (Arce, 2009).

La fase de campo se llevó a cabo en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Machachi, Sector San Alfonso, Florícola Agroindustrias San Alfonso, ubicada a una altitud de 2880 msnm. La precipitación es de 1572 mm/año y una temperatura promedio de 13°C.

### **4.2. MATERIALES**

Los materiales que se usaron en cada una de las fases fueron:

#### **4.2.1. Fase de laboratorio**

Alcohol antiséptico y potable, agar, algodón, papel toalla, papel aluminio, atomizadores, guantes quirúrgicos desechables, hipoclorito de sodio al 5,5 %, bisturí, mechero de alcohol, agua estéril, cucharas plásticas, asa de transferencia, porta y cubre objetos, frasco de KOH al 15 %, saca bocados de 1 cm de diámetro, regla, pipeta automática de 500 - 100 µl, puntas estériles para micropipeta, crioviales con tapa de 1ml, recipientes de plástico con tapa hermética, fundas de polipropileno de 17,8 x 25 cm , jeringas de 60 ml, probetas de 50 ml

estériles, cajas petri con medio TSMC para el aislamiento de *Trichoderma*, cajas petri con medio selectivo para el aislamiento de *Botrytis*, cajas petri con medio PDA, muestras de suelo, rosas de la variedad Amelia y High & Peace infectados con *Botrytis*, arroz, cascarilla de arroz.

Los equipos utilizados fueron: vórtex (mezclador), autoclave, cámara de flujo laminar, incubadora, refrigerador y microscopio óptico Olympus CH30 o Axiostar Zeiss.

#### **4.2.2. Fase de campo**

Libreta de campo, marcadores, fundas plásticas, barreno, baldes, balanza, bomba de mochila para fumigar, biocarrier, arroz, frascos de vidrio y recipientes plásticos.

### **4.3. MÉTODOS**

#### **4.3.1. Toma de muestras de suelo**

Para obtener las cepas nativas de *Trichoderma* de la finca se tomaron submuestras de suelo mediante un barreno a una profundidad de 15 a 20 cm; el número total de éstas dependió del tamaño del lote. Se tomaron 16 muestras, una por cada bloque. Cada muestra consistió en 500 g de suelo.

#### **4.3.2. Aislamiento de *Trichoderma* spp.**

De cada muestras de suelo se tomo 40 g de suelo y se suspendió en 60 ml de agua esterilizada. Las muestras se agitaron a 130 rpm durante 15 min. De la suspensión madre de suelo se transfirió 1 ml a un tubo de ensayo con 9 ml de agua estéril (dilución  $10^{-1}$ ). Esta solución se agitó en un vórtex y se tomó 100  $\mu$ l con una micropipeta y se inoculó en una caja petri que contenía el medio selectivo (TSMC).

Las muestras se incubaron a 24-25 °C durante 14 días para observar el crecimiento de las colonias del hongo *Trichoderma* spp. Posteriormente se purificaron las colonias en el medio PDA, transfiriéndose finalmente a tubos de ensayo, que contenían el mismo medio.

#### **4.3.3. Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea***

De acuerdo al protocolo aplicado por Jiménez (2008), primeramente se recolectaron muestras de botones de las variedades de rosas más susceptibles que presentaron síntomas o signos de la presencia de *Botrytis cinerea*.

Luego las muestras vegetales fueron colocadas en fundas plásticas y transportadas al laboratorio. El material muestreado se colocó en las cámaras húmedas durante el tiempo necesario para propiciar esporulación del hongo. El material se incubó a temperatura de laboratorio.

Después que el hongo esporuló se procedió a realizar su aislamiento. Utilizando un asa de transferencia se realizó un barrido sobre las estructuras de fructificación inoculándose los propágulos en cajas petri con medio PDA y con medio agar agua (AA). Las cajas fueron incubadas a 26 °C. Luego de obtener las colonias de *Botrytis*, el hongo fue purificado y luego conservado en tubos con PDA inclinado y silica gel estéril, material experimental que fue almacenado en refrigeradora (Falconí citado por Jiménez, 2008).

#### **4.3.4. Conservación de las cepas**

Las cepas aisladas fueron conservadas mediante los procedimientos que se detallan a continuación. Estas cepas constituyeron un banco de cepas de *Trichoderma* spp.

##### **4.3.4.1. Conservación de *Trichoderma* spp. y *Botrytis* en silica gel**

Este procedimiento se denomina conservación en criogénesis, para lo cual se utilizó crioviales de 1 ml y 0,5 ml de caldo criogénico y 0,5 g de silica gel. En tubos de ensayo con 6 ml de PDA se procedió a cultivar las cepas de *Trichoderma* spp. y *Botrytis*; una vez que estas alcanzaron buen desarrollo, se agregó 2-4 ml de caldo criogénico A (caldo nutritivo estéril 85% + glicerol estéril 15%) o B (caldo de papa + glucosa + glicerol 15%).

Utilizando un asa de platino estéril se realizó un raspado, luego se agitó en un vórtex hasta obtener una suspensión uniforme y concentrada de esporas. Posteriormente, con una

micropipeta se transfirió 0,5 ml de suspensión a cada criovial esterilizado a 121 °C con 0.5 g de silica gel; luego se mantuvo en refrigeración.

Se recomienda realizar duplicados de cada cepa. Para asegurar su conservación se selló las tapas de cada criovial con parafilm, los mismos que fueron guardados en recipientes de plástico refrigerables, herméticamente sellados. Para comprobar la viabilidad de los aislamientos conservados se sembró algunos cristales de silica gel en PDA después de 24 a 48 horas (Tuite y Schaad citado por Jiménez, 2008).

#### **4.3.4.2. Conservación de *Trichoderma* sp. en suelo estéril**

Para realizar este tipo de conservación de *Trichoderma* sp. se necesitó un suelo franco con poca humedad, el cual se colocó en una cantidad que permita una inclinación en el recipiente que lo contenía. Luego este material se esterilizó a 121 °C por una hora o en dos días consecutivos por 20 minutos. Se agregaron los propágulos que se deseaban conservar suspendidos en suficiente agua para humedecer al suelo en 25% de su capacidad. Se almacenaron los tubos a temperatura ambiente o refrigeración. Si se desea recuperar el hongo almacenado, se procede a inocular partículas de suelo en un medio adecuado. Estos tubos pueden proveer el hongo durante varios años, debido a que el suelo es un medio de sostén de los propágulos.

#### 4.3.5. Caracterización de cepas de *Trichoderma* spp. nativas de la finca

Para realizar la caracterización de *Trichoderma* sp. se realizó el refrescamiento de las cepas almacenadas. Utilizando un asa de transferencia se procedió a transferir las cepas a cajas petri con medio PDA, incubándose a 26 °C durante dos a tres días hasta observar apareamiento de colonias, micelio y esporas (Falconí citado por Jiménez 2008).

Aplicando los procedimientos descritos por Gams y Bissett, citado por Jiménez (2009), se identificó a *Trichoderma* sp. tomando en cuenta las características de crecimiento del micelio, olor de los aislados, presencia o ausencia metabolitos, conidióforos, conidias, fialides y clamidósporas.

A partir de cada aislado de *Trichoderma* sp. desarrollado en las cajas petri con PDA se procedió a preparar muestras frescas de micelio sobre placas porta objetos, con una gota de KOH al 3% o lactofenol (Falconí citado por Jiménez, 2008). Para observar las placas porta objetos se utilizó un microscopio Axiostar Zeiss con contraste de fases, con aumento objetivo de 10, 20, 40 y 100x. También se tomaron las dimensiones de las estructuras con una retícula ocular micrométrica Olympus con escala de 0 a 50 divisiones, de 4 ejes.

La caracterización de *Trichoderma* sp. se lo realizó tomando en cuenta características macro y microscópicas que fueron comparadas con claves taxonómicas de identificación de género según Gams y Bissett, citados por Jiménez (2008). Para la identificación a nivel de



especies se utilizó las claves de Gilman, citado por Jiménez (2008) y la clave interactiva de la APS de Samuels *et al.*, citado por Jiménez (2008). Igualmente se utilizaron los diagramas para reconocimiento de estructuras fungosas descritos por Ainsworth, citado por Jiménez (2008).

#### 4.3.6. Distribución de los tratamientos en la fase de laboratorio

De las 16 muestras de suelo que se tomaron de la florícola se aisló 21 cepas de *Trichoderma* spp y una cepa proveniente del laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias IASA, es decir, se conformaron un total de 22 tratamientos.

**Cuadro 4.3.: Distribución de los tratamientos en la fase de laboratorio**

Tratamientos	Cepa	Origen
T <sub>1</sub>	7 <sub>c</sub>	Nativo
T <sub>2</sub>	3 <sub>c</sub>	Nativo
T <sub>3</sub>	2 <sub>c</sub>	Nativo
T <sub>4</sub>	15 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>5</sub>	5 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>6</sub>	9 <sub>a</sub>	Nativo
T <sub>7</sub>	7 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>8</sub>	6 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>9</sub>	12 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>10</sub>	10 <sub>a</sub>	Nativo
T <sub>11</sub>	10 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>12</sub>	13 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>13</sub>	8 <sub>a</sub>	Nativo
T <sub>14</sub>	8 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>15</sub>	C <sub>19</sub>	Exótico
T <sub>16</sub>	15 <sub>a</sub>	Nativo
T <sub>17</sub>	16 <sub>c</sub>	Nativo
T <sub>18</sub>	10 <sub>c</sub>	Nativo
T <sub>19</sub>	7 <sub>a</sub>	Nativo
T <sub>20</sub>	5 <sub>c</sub>	Nativo
T <sub>21</sub>	11 <sub>b</sub>	Nativo
T <sub>22</sub>	13 <sub>c</sub>	Nativo

Los tratamientos fueron dispuestos bajo un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones, cuyo modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + b_i + \tau_j + \varepsilon_{ijk}, \quad \text{con } i=1, \dots, a \text{ y } j=1, \dots, n$$

Donde:

$Y_{ij}$  Es la  $j$ -ésima observación del  $i$ -ésimo tratamiento

$\mu$  Es la media general de las observaciones

$B_i$  Efecto del  $i$ -ésimo bloque

$\tau_i$  Es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  Es una variable aleatoria normal independientemente distribuida con esperanza 0 y varianza  $\sigma^2 \forall i, j$ .

Para las comparaciones entre los tratamientos se realizaron pruebas de comparación de medias al 5%.

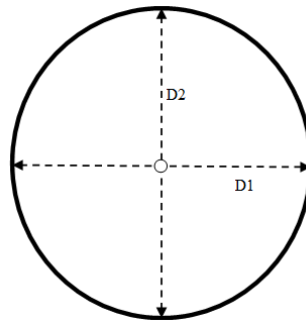
Para las variables crecimiento diametral, pruebas de antagonismo y pruebas de inocuidad se utilizó el análisis de conglomerados según Hotelling y una técnica gráfica (dendrogramas).

Mientras que para las variables conidiación y prueba de antagonismo según la escala de Bell, se analizó según Duncan.

Cada tratamiento estuvo constituido por tres cajas petri de un diámetro de 9 cm. Después de la inoculación todos los tratamientos fueron almacenados en la incubadora a una temperatura de 25 °C.

Las variables que se utilizadas en la fase de laboratorio se evaluaron de la siguiente manera:

- Crecimiento diametral: 24, 48 y 72 horas después de la siembra puntual de *Trichoderma* se tomaron dos medidas: crecimiento longitudinal (D1) y crecimiento transversal (D2) de *Trichoderma*.



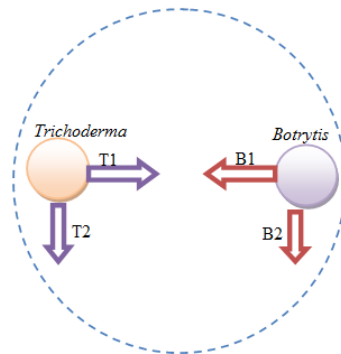
**Figura 4.3.: Variables medidas durante la evaluación del crecimiento radial D1 (crecimiento longitudinal) y D2 (crecimiento transversal) de *Trichoderma* spp.**

- Pruebas de antagonismo: Una vez obtenidas las cepas de *Trichoderma* spp. y *Botrytis* se ejecutaron las pruebas de antagonismo, empleando la metodología descrita por Oleas *et al.*, (1987) y Yandún (1998), citado por Jiménez (2008). A continuación se detalla el procedimiento:

Las cepas de *Trichoderma* spp. y *Botrytis* fueron sembradas en cajas petri con medio PDA. Las cajas con *Trichoderma* sp. se incubaron por 4 días bajo luz artificial, a una temperatura de 26 °C hasta que el hongo presente crecimiento micelial. En cambio, las cajas con *Botrytis* se incubaron por siete días bajo luz natural, a un rango de temperatura de 21-26°C (Falconí citado por Jiménez, 2008). Luego de obtener un crecimiento total de las cajas petri se procedió a cortar rodajas de *Botrytis* y *Trichoderma* sp. utilizando un sacabocados. Las rodajas tuvieron un diámetro de 0,5 cm y fueron sembradas en cajas petri con medio PDA,

de forma que cada rodaja quede una frente a la otra, a 1 cm del borde. Posteriormente se incubaron por 4 días entre 22-26 °C, bajo luz artificial (Oleas *et al.*, citado por Jiménez, 2008).

Se tomaron datos de crecimiento de *Botrytis* y *Trichoderma* sp. después de 24, 48,72 y 96 horas de la inoculación. Todos estos datos se registraron en el libro de campo. Las medidas que se tomaron fueron las siguientes: crecimiento del antagonista *Trichoderma* (T1), crecimiento del patógeno *Botrytis* (B1), crecimiento del antagonista *Trichoderma* spp. hacia los bordes (T2), crecimiento del patógeno *Botrytis* hacia los bordes (B2). En la siguiente figura se indican los datos tomados:



**Figura 4.4.: Variables evaluadas durante las pruebas de antagonismo (crecimiento del antagonista *Trichoderma* (T1 y T2) y crecimiento del patógeno *Botrytis* (B1 y B2)).**

- Pruebas de susceptibilidad de *Trichoderma* spp. frente a fungicidas: En esta variable se midió la capacidad que tienen las cepas de *Trichoderma* spp. de crecer sobre fungicidas que se usan con mayor frecuencia en la florícola. Al igual que en las

pruebas de crecimiento diametral (Figura 4.3) se tomaron las medidas de crecimiento longitudinal (D1) y crecimiento transversal (D2) durante tres días. Los fungicidas utilizados fueron: Sanystar (St), Switch (Sw), Collis (C) y Teldor (T).

- Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. según la escala de Bell *et al.*, (1982): Se midió a las 96 horas después de la inoculación de *Trichoderma* y *Botrytis* (Figura 4.4). A continuación se detalla la escala propuesta por Bell *et al.*, (1982) para las pruebas de antagonismo.

**Cuadro 4.4.: Escala de Bell *et al.*, (1982) para la evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp .**

<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio,
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio,
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro,
4	El patógeno sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i> ,
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio.

(Citado por Arzate *et. al*, 2006).

- Conidiación: Para el recuento de esporas se utilizó la cámara de Neubauer o hematocitómetro. Antes de proceder al recuento de esporas, el hematocitómetro fue lavado y secado. Cada tubo con la muestra diluída fue agitado en un vortex por 30 segundos, entonces se tomó una muestra de 10 ml con una micropipeta y se depositó con cuidado, de manera que el líquido entró a través del cubre objetos y el hematocitómetro, por capilaridad. En cada compartimiento de la cámara se depositó

la dilución  $10^{-4}$ . Luego se colocó la cámara en el microscopio y con el objetivo de 10X se localizó el campo visual en el cuadrante central (Falconí, 1998).

El recuento se determinó sumando el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. Para cada muestra se realizó seis lecturas. La concentración de esporas se calculó multiplicando el promedio del número de esporas obtenidas por el inverso de la dilución empleada para el conteo.

#### **4.3.6. Preparación de los bioformulados**

El procedimiento para la formulación artesanal de *Trichoderma* spp que se utilizó se detalla a continuación:

Las cepas conservadas en silica gel fueron refrescadas y sembradas en PDA para obtener una mayor cantidad de conidias. Las cajas se incubaron durante 4 días a 26 °C hasta obtener una colonización total y esporulación del hongo (Caicedo citado por Jiménez, 2008).

Las cajas incubadas con PDA fueron utilizadas para coleccionar el micelio y esporas que posteriormente fueron transferidos a tubos de ensayo con 30 ml de caldo de papa dextrosa estéril hasta obtener una suspensión concentrada  $10^{10}$  esporas/ml. Se colocó entre 10-30 ml de la suspensión con una jeringa estéril en fundas, dejando una cámara de aire.

El bioformulado fue a base de arroz, para lo cual, se necesitó remojarlo por 24 horas junto con 5 ml de aceite vegetal comestible por cada Kg de arroz. Después de este tiempo se retiró el exceso de agua e impurezas. Luego se procedió a colocar 100 g de arroz en frascos de vidrio, posteriormente estos materiales fueron esterilizados y se colocó 8 rodajas de 5 cm de diámetro de PDA que contenía el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. (Manual Merck citado por Jiménez, 2008).



**Figura 4.5.: Bioformulado de *Trichoderma* spp. de la cepa 8a.**

Estos frascos se incubaron a 26 °C de 3 a 4 días o hasta que presentó un micelio esporulado a una concentración de  $10^8$  a  $10^{10}$  esporas de *Trichoderma* sp./gramo de sustrato. El bioformulado fue agitado manualmente para evitar la compactación del material de soporte y obtener un crecimiento homogéneo del micelio y favorecer la esporulación (Yáñez citado por Jiménez, 2008). El bioformulado fue preparado en base a las cepas seleccionadas en la fase de laboratorio.

#### **4.3.7. Determinación de la concentración de esporas**

Se agregó agua mas Tween a las fundas de arroz donde creció el antagonista. Mediante una espátula fue removida las esporas del arroz. Luego fue filtrado por medio de un tamíz o

colador. El filtrado fue la suspensión madre. Se tomó 1 ml y fue transferido a un tubo con 9 ml (dilución  $10^{-1}$ ). Se repitió el procedimiento llevando 1 ml de esta dilución ( $10^{-1}$ ) a otro tubo con 9 ml, es decir,  $10^{-2}$  y así sucesivamente hasta obtener una dilución  $10^{-4}$  o la apropiada para estimar el número de esporas (Falconí, 1998).

Para el recuento se usó la cámara de Neubauer o hematocitómetro. Antes de proceder al recuento de esporas, el hematocitómetro fue lavado y secado. Cada tubo con la muestra diluída fue agitado en un vortex por 30 segundos, entonces se tomó una muestra con una micropipeta y se depositó con cuidado, de manera que el líquido entre a través del cubre objetos y el hematocitómetro, por capilaridad.

En cada compartimiento de la cámara se depositó 1 ml de la dilución  $10^{-4}$ . Luego se colocó la cámara en el microscopio y con el objetivo de 10X se localizó el campo visual en el cuadrante central.

El recuento se determinó sumando el total de esporas presentes en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. Para cada muestra se realizó seis lecturas. La concentración de esporas se calculó multiplicando el promedio del número de esporas obtenidas por el inverso de la dilución empleada para el conteo. Para el cálculo de esporas por gramo se determinó previamente el peso del sustrato arroz – agua utilizada para el cultivo. Se multiplicó el promedio del número de esporas por mililitro obtenido en el recuento, por el



volumen empleado en la preparación de la suspensión madre y se dividió por el peso de la muestra utilizada (Falconí, 1998).

#### 4.3.8. Aplicación de los bioformulados

La aplicación de los bioformulados de *Trichoderma* en el campo se realizó en camas de variedades Amelia (susceptible), Freedom (resistente) y Dekora (moderadamente susceptible). El bioformulado se aplicó a toda la planta utilizando una bomba de mochila. Se disolvió 22,5 g del producto en 20 litros de agua y 5 ml de Carrier por tratamiento. La aplicación se realizó una vez por semana.



**Figura 4.6.: Aplicación del bioformulado en campo a) Pantallas fijas para evitar el traslape de otros fungicidas, b) Fumigador aplicando el bioformulado con una bomba de mochila.**

A todas las plantas seleccionadas se les realizó un pinch antes de iniciar las aplicaciones. Posteriormente estos tallos fueron etiquetados para ser evaluados hasta la cosecha. Los datos de incidencia y severidad fueron tomados una vez por semana.



**Figura 4.7.: Tallos etiquetados luego de haber realizado un pinch.**

#### **4.3.9. Distribución de los tratamientos en la fase de campo**

Con las tres variedades de rosas seleccionadas (variedad Amelia, Dekora y Freedom) y las tres cepas de *Trichoderma* spp. escogidas (cepas 7<sub>b</sub>, 8<sub>a</sub> y C<sub>19</sub>) se conformaron un total de nueve tratamientos con 90 tallos cada uno. Además, cada variedad tuvo un testigo químico. La distribución de los tratamientos se realizó en 36 camas de acuerdo a la variedad y cepa utilizada.

**Cuadro 4.5.: Distribución de los tratamientos en la fase de campo**

<b>Tratamiento</b>	<b>Variedad</b>	<b>Cepa</b>
T <sub>1</sub>	Freedom	C <sub>19</sub>
T <sub>2</sub>	Freedom	8 <sub>a</sub>
T <sub>3</sub>	Freedom	7 <sub>b</sub>
Testigo1	Freedom	
T <sub>4</sub>	Dekora	C <sub>19</sub>
T <sub>5</sub>	Dekora	8 <sub>a</sub>
T <sub>6</sub>	Dekora	7 <sub>b</sub>
Testigo 2	Dekora	
T <sub>7</sub>	Amelia	C <sub>19</sub>
T <sub>8</sub>	Amelia	8 <sub>a</sub>
T <sub>9</sub>	Amelia	7 <sub>b</sub>
Testigo3	Amelia	

Los tratamientos fueron dispuestos bajo un diseño de parcelas divididas, cuyo modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + \Delta_i + \delta_{k(i)} + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$

donde,

$\Delta_i$  Efecto de la parcela grande

$\delta_{k(i)}$  Error para la parcela grande

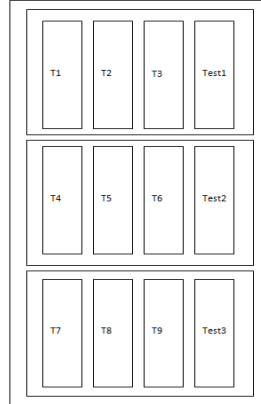
$B_j$  Efecto principal de la parcela pequeña

$e_{ijk}$  Error para la parcela pequeña

Para las comparaciones entre los tratamientos se realizaron pruebas de comparación de medias al 5%. El análisis comparativo de las variables incidencia y severidad tanto en el campo como de vida en florero se realizó según Duncan.

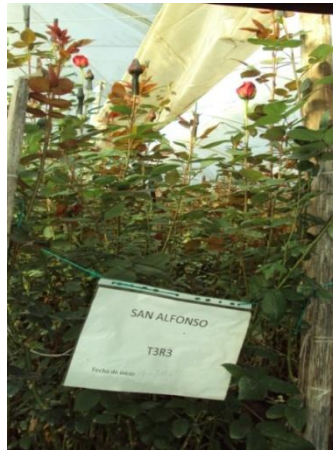
Los tratamientos aplicados a cada variedad se mantuvieron bajo las mismas condiciones; no obstante, los testigos fueron manejados de acuerdo al esquema de la florícola.

La distribución de los tratamientos se realizó en diferentes bloques según la variedad de rosa.



**Figura 4.8.: Distribución de los tratamientos en el campo (Villacís, 2011)**

La fase de campo estuvo constituida por nueve tratamientos, los cuales se iniciaron con 90 tallos, ya que correspondía aproximadamente al 10% de la población. Cada tratamiento estuvo formado por tres camas de 1 m de ancho y 40 m de largo.



**Figura 4.9.: Identificación de los tratamientos en el campo.**

Las variables medidas en esta fase fueron la incidencia y severidad en cámaras húmedas y en campo. La colocación de las cámaras húmedas se realizó semanalmente para observar la

presencia del patógeno y la severidad del ataque; y consistió en la colocación de fundas plásticas en los botones florales en el campo durante una semana. Se dispusieron 9 cámaras húmedas, cada semana. La incidencia y severidad en el campo se evaluó una vez por semana en los 90 tallos por tratamiento que fueron marcados al inicio de la investigación.

Con el fin de conocer el efecto del transporte y la duración de las rosas en el florero se realizó la evaluación de la vida en florero. De cada uno de los tratamientos se tomó al azar 50 tallos en punto de corte, luego se les realizó una inmersión en un fungicida específico para el patógeno y se llevó al cuarto frío por 1 día y luego se realizó el viaje simulado durante 6 días. Este manejo permitió asumir las condiciones que se presentan durante el transporte de la flor con destino al mercado internacional y que consiste en choques térmicos y de humedad.



**Figura 4.10.: Preparación de los botones para la realización del viaje simulado.**

Adicionalmente, con el fin de conocer el efecto de los tratamientos sobre la expresión de síntomas del moho gris, las flores se dejaron por un tiempo de 10 días en florero, que

permitió observar el porcentaje de flores infectadas. Las evaluaciones de los botones infectados se realizaron diariamente.



**Figura 4.11.: Botones florales durante la evaluación en el florero**

La cuantificación de la severidad de la enfermedad en los botones del rosal en el campo y en florero se realizó en base a la escala de severidad que se menciona a continuación:

**Cuadro 4.6.: Grados de severidad de la enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea* en rosas.**

Grados	Descripción
0	La flor no presenta infección en ninguno de los pétalos
1	La flor presenta una infección leve no mayor de 2 mm en los dos primeros pétalos
2	La flor presenta una lesión mayor a 2 mm y menor a 1 cm en los dos primeros pétalos
3	La flor presenta una lesión mayor de 1 cm, en los 4 primeros pétalos, pero sin esporular
4	La flor presenta lesiones esporuladas en cualquier pétalo

Fuente: Laboratorio Américaflor citado por Sandón, 2005.

La incidencia de la enfermedad tanto en el campo como de la vida en florero se obtuvo mediante el conteo del número de flores infectados, sobre el total de la muestra (Sandón,

2005). Con estos datos se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de incidencia.

$$\% \text{ incidencia} = \frac{\# \text{ Botones de rosa afectados}}{\text{total de botones evaluados}} * 100$$

La información proveniente de las evaluaciones se analizó con estadística descriptiva (media, desviación estándar y coeficiente de variación).

#### **4.4.10. ANÁLISIS ECONÓMICO**

Se realizó el análisis de presupuesto parcial según Perrín *et al.*, (1976) para lo cual se tomaron todos los costos variables (insumos y aplicaciones) y costos fijos (mano de obra) que restados del beneficio bruto (precio de venta de los botones florales) dieron el beneficio neto. Con el beneficio neto y los costos variables se procedió a realizar el análisis de dominancia (tratamiento dominado es aquel que a igual o mayor beneficio neto presenta un mayor costo variable). Con los tratamientos no dominados se procedió a realizar el análisis marginal para la obtención de la tasa de retorno marginal.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. FASE DE LABORATORIO

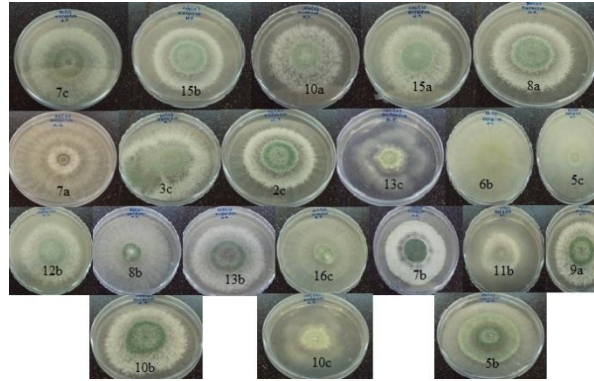
#### 5.1.1. Aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp.

De las 16 muestras de suelo tomadas de la finca se aislaron 21 cepas nativas de *Trichoderma* spp. El número de cepas aisladas es considerable comparado con las 105 cepas nativas obtenidas por Michel *et al.*, (2001) de suelo colectado en 25 huertas de mango (*Mangifera indica* L.), y similar con las 25 cepas nativas obtenidas por Arzate *et al.*, (2006) de suelo colectado en 15 huertas comerciales de plátano (*Musa* sp.). Este resultado se puede atribuir al manejo que se le ha venido dando por años al suelo de la florícola, considerando el efecto que tiene la aplicación de productos químicos dentro de la dinámica poblacional.

**Cuadro 5.1: Cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de la florícola San Alfonso**

Cepa	Bloque de Origen	Repetición
7 <sub>c</sub>	Bloque 7	C
3 <sub>c</sub>	Bloque 3	C
2 <sub>c</sub>	Bloque 2	C
15 <sub>b</sub>	Bloque 15	B
5 <sub>b</sub>	Bloque 5	B
9 <sub>a</sub>	Bloque 9	A
7 <sub>b</sub>	Bloque 7	B
6 <sub>b</sub>	Bloque 6	B
12 <sub>b</sub>	Bloque 12	B
10 <sub>a</sub>	Bloque 10	A
10 <sub>b</sub>	Bloque 10	B
13 <sub>b</sub>	Bloque 13	B
8 <sub>a</sub>	Bloque 8	A
8 <sub>b</sub>	Bloque 8	B
15 <sub>a</sub>	Bloque 15	A
16 <sub>c</sub>	Bloque 16	C
10 <sub>c</sub>	Bloque 10	C
7 <sub>a</sub>	Bloque 7	A
5 <sub>c</sub>	Bloque 5	C
11 <sub>b</sub>	Bloque 11	B
13 <sub>c</sub>	Bloque 13	C





**Figura 5.1: Cepas aisladas de *Trichoderma* spp. de la Florícola San Alfonso S.A.**

### **5.1.2. Caracterización de las cepas nativas de *Trichoderma* spp.**

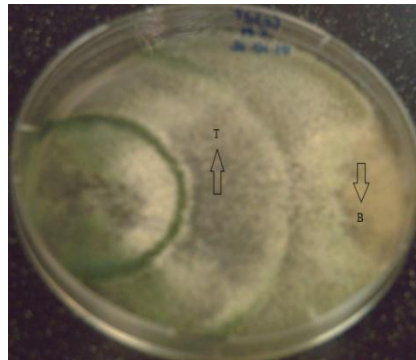
De las diferentes aislamientos realizados se identificaron 22 cepas del género *Trichoderma* las mismas que se determinaron por sus características morfológicas, por lo que se puede afirmar la gran diversidad de este hongo antagonista en los suelos agrícolas (Cholango, 2009).

De los hongos identificados como *Trichoderma* se caracterizaron morfológicamente a dos cepas, estas fueron las cepas nativas que mostraron mayor capacidad antagónica y tolerancia a productos químicos; las cepa 7<sub>b</sub> y 8<sub>a</sub> fueron identificadas como *Trichoderma harzianum*, ya que esta mostró una diversidad de características pertenecientes a la sección *Trichoderma* las mismas que sirvieron para determinar la especie, una característica básica para llegar a esta determinación fue el ritmo rápido de crecimiento que alcanzó 9 cm en 3 días, color del micelio verde claro, forma y disposición de fialides, los conidióforos largos,

en cambio los conidios son de forma redonda, a menudo con las dimensiones de 3,16 x 3,16  $\mu\text{m}$  (Kubicek *et al.*, 1998).

### 5.1.3. Crecimiento diametral de *Trichoderma* spp. y pruebas de antagonismo

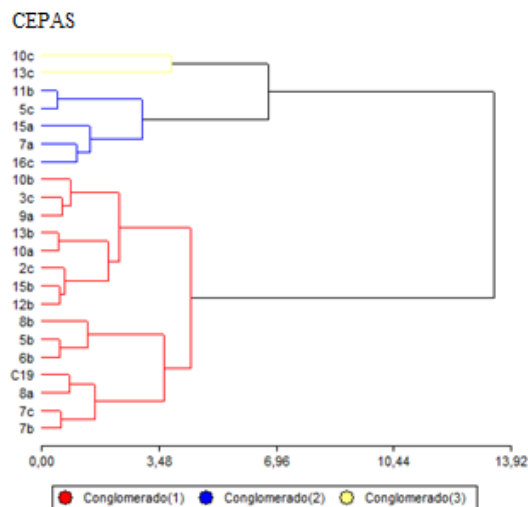
El análisis de conglomerados se realizó utilizando 22 tratamientos y cuatro variables: “crecimiento longitudinal”, “crecimiento transversal”, “crecimiento de *Trichoderma* hacia *Botrytis*” y “crecimiento de *Trichoderma* hacia los bordes de la caja petri” o de manera “perpendicular a la dirección hacia *Botrytis*”.



**Figura 5.2.: Colonización *Trichoderma* spp. (T) sobre micelio de *Botrytis cinerea* (B)**

Este análisis mostró tres grupos con un coeficiente de correlación cofenética de 0,586 (Figura 5.2); el primer grupo estuvo formado por las cepas 10<sub>c</sub> y 13<sub>c</sub> (cepas nativas) caracterizadas por presentar un crecimiento lento crecimiento y en consecuencia menor crecimiento; el segundo grupo conformado por las cepas 11<sub>b</sub>, 5<sub>c</sub>, 15<sub>a</sub>, 7<sub>a</sub> y 16<sub>c</sub> (cepas nativas), las cuales presentaron un crecimiento medio; y el tercero formado por las cepas

10<sub>b</sub>, 3<sub>c</sub>, 9<sub>a</sub>, 13<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 8<sub>b</sub>, 5<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, C<sub>19</sub>, 8<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub> (cepas nativas excepto la cepa C<sub>19</sub>), caracterizados por presentar un mayor y rápido crecimiento diametral.



**Figura 5.3.: Dendrograma de clasificación de las cepas de *Trichoderma* spp. en base a su crecimiento diametral .**

Con respecto al crecimiento radial y crecimiento en las pruebas de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. se encontró que el conglomerado 1 (Cepas 10<sub>b</sub>, 3<sub>c</sub>, 9<sub>a</sub>, 13<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 8<sub>b</sub>, 5<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, C<sub>19</sub>, 8<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub>) presentó un mayor crecimiento que el conglomerado 2 (cepas 11<sub>b</sub>, 5<sub>c</sub>, 15<sub>a</sub>, 7<sub>a</sub> y 16<sub>c</sub>) y 3 (cepas 10<sub>c</sub> y 13<sub>c</sub>).

El conglomerado 1 (Cepas 10<sub>b</sub>, 3<sub>c</sub>, 9<sub>a</sub>, 13<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 8<sub>b</sub>, 5<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, C<sub>19</sub>, 8<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub>) alcanzó un crecimiento de 7,12 cm; estos resultados difieren a los encontrados en el estudio realizado por Guigón y González (2004), que encontró que las cepas TC74, TvB y TS01 mostraron la mayor tasa de crecimiento, alcanzando el máximo crecimiento posible (9 cm)

y superando a las cepas TvVA y TbVA que tuvieron un crecimiento de 82,2 cm y 72 cm respectivamente.

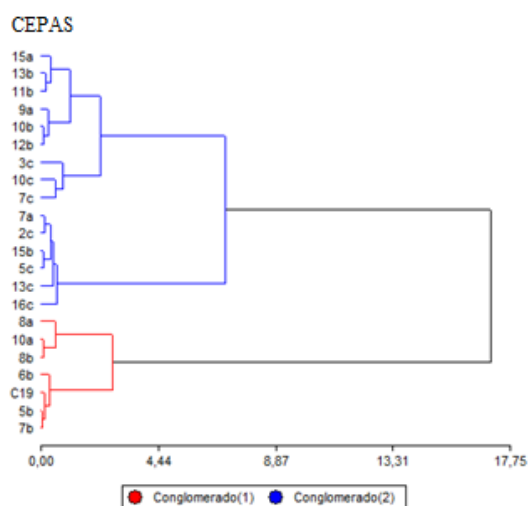
Al analizar el crecimiento de *Trichoderma* spp. en las pruebas de antagonismo (T1 y T2) se puede afirmar que los resultados superan a los obtenidos por Guigón y González (2004), que obtuvieron un crecimiento máximo de 3,9 cm comparando con el conglomerado 1 (Cepas 10<sub>b</sub>, 3<sub>c</sub>, 9<sub>a</sub>, 13<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 8<sub>b</sub>, 5<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, C<sub>19</sub>, 8<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub>) que alcanzó un crecimiento de 4,02 cm.

**Cuadro 5.2: Crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. durante las pruebas diametrales (crecimiento diametral de *Trichoderma* (D1 y D2) y crecimiento de *Trichoderma* en las pruebas de antagonismo (T1 y T2)).**

<b>Crecimiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.</b>				
<b>Conglomerado</b>	<b>D1 (cm)</b>	<b>D2 (cm)</b>	<b>T1 (cm)</b>	<b>T2 (cm)</b>
1	7,12±0,01 c	6,94±0,03± c	4,02±0,01 c	3,43±0,04 c
2	6,58±0,03 b	6,53±0,04 b	3,31±0,03 b	3,25±0,03 b
3	5,62±0,02 a	5,45±0,04 a	2,99±0,01 a	2,59±0,05 a

El segundo análisis de conglomerados se realizó utilizando 22 tratamientos y dos variables: “crecimiento de *Botrytis* hacia *Trichoderma*” y “crecimiento de *Botrytis* hacia los bordes de la caja petri”.

Este análisis mostro dos grupos con un coeficiente de correlación cofenética de 0,777 (Figura 5.2.); el grupo 1 estuvo formado por las cepas 15<sub>a</sub>, 13<sub>b</sub>, 11<sub>b</sub>, 9<sub>a</sub>, 10<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 3<sub>c</sub>, 10<sub>c</sub>, 7<sub>c</sub>, 7<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 5<sub>c</sub>, 13<sub>c</sub> y 16<sub>c</sub> (cepas nativas), caracterizadas por su baja capacidad antagónica; el segundo formado por las cepas 8<sub>a</sub>, 10<sub>a</sub>, 8<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, C<sub>19</sub>, 5<sub>b</sub> y 7<sub>b</sub> (cepas nativas excepto la cepa C<sub>19</sub>), los cuales presentaron buenas características antagónicas



**Figura 5.4.: Dendrograma de clasificación de las cepas de *Trichoderma* spp. en base a su capacidad antagónica.**

Al analizar el crecimiento de *Botrytis cinerea* durante las pruebas de antagonismo se encontró que el conglomerado 1 (cepas 8<sub>a</sub>, 10<sub>a</sub>, 8<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, C<sub>19</sub>, 5<sub>b</sub> y 7<sub>b</sub>) presentó un menor crecimiento, es decir que las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron una mayor capacidad de inhibición. El conglomerado 2 y 3 (cepas 15<sub>a</sub>, 13<sub>b</sub>, 11<sub>b</sub>, 9<sub>a</sub>, 10<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 3<sub>c</sub>, 10<sub>c</sub>, 7<sub>c</sub>, 7<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 5<sub>c</sub>, 13<sub>c</sub> y 16<sub>c</sub>) se consideró un solo grupo ya que no presentan diferencias significativas

y exhibieron un mayor crecimiento de *Botrytis cinerea*, es decir, que tienen una menor capacidad antagonica.

**Cuadro 5.3: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en las pruebas de antagonismo (Crecimiento de *Botrytis* (B1 y B2))**

<b>Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i></b>		
<b>Conglomerado</b>	<b>B1 (cm)</b>	<b>B2 (cm)</b>
1	1,06±0,07 a	1,61±0,11 a
2	1,49±0,05 b	1,96±0,08 b
3	1,72±0,05 b	2,54±0,08 b

**5.1.4. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. según la escala de Bell *et al.*, (1982).**

Para evaluar la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. según la escala de Bell *et al.*, (1982) (Cuadro 4.4.) se encontraron diferencias significativas. El tipo de antagonismo según Bell *et al.*, (1982) fue de clase 1 al observar el crecimiento de los dos hongos, las cepas 7<sub>c</sub>, 3<sub>c</sub>, 5<sub>b</sub>, 9<sub>a</sub>, 7<sub>b</sub>, 12<sub>b</sub>, 13<sub>b</sub>, 8<sub>a</sub>, C<sub>19</sub>, 16<sub>c</sub> y 7<sub>a</sub> fueron capaces de atacar el hongo y cubrirlo totalmente, mientras que las cepas 2<sub>c</sub>, 15<sub>b</sub>, 6<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 10<sub>b</sub>, 8<sub>b</sub>, 15<sub>a</sub>, 10<sub>c</sub> y 5<sub>c</sub> sobrecrece aproximadamente las dos terceras partes de la superficie del medio. Para las cepas 11<sub>b</sub> y 13<sub>c</sub> ninguno de los dos hongos fue dominante, cada uno cubrió el 50% de la superficie del medio de cultivo, que corresponde a la clase 3. La colonización del área compitiendo por espacio y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio (Dennis y Webster citados por Arzate *et al.*, 2006).

Esto permite visualizar que *Trichoderma* tiene capacidad antagónica sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

**Cuadro 5.4.: Promedios  $\pm$  error estándar de la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. según la escala de Bell *et al.*, (1982).**

Cepa	Actividad antagónica según la escala de Bell <i>et al.</i> , (1982)
7 <sub>c</sub>	1 a
3 <sub>c</sub>	1 a
2 <sub>c</sub>	2 <u>bc</u>
15 <sub>b</sub>	2 <u>bc</u>
5 <sub>b</sub>	1 a
9 <sub>a</sub>	1 a
7 <sub>b</sub>	1 a
6 <sub>b</sub>	1,5 $\pm$ 0,50 <u>ab</u>
12 <sub>b</sub>	1 a
10 <sub>a</sub>	2 <u>bc</u>
10 <sub>b</sub>	1,67 $\pm$ 0,33 <u>abc</u>
13 <sub>b</sub>	1 a
8 <sub>a</sub>	1 a
8 <sub>b</sub>	2 <u>bc</u>
C <sub>19</sub>	1 a
15 <sub>a</sub>	2,33 $\pm$ 0,33 <u>cd</u>
16 <sub>c</sub>	1 a
10 <sub>c</sub>	2 $\pm$ 1 <u>bc</u>
7 <sub>a</sub>	1 a
5 <sub>c</sub>	2 <u>bc</u>
11 <sub>b</sub>	3 d
13 <sub>c</sub>	3 d

#### 5.1.5. Capacidad de conidiación de las cepas de *Trichoderma* spp.

Al analizar la capacidad de conidiación de las cepas de *Trichoderma* spp. se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Las cepas 7<sub>c</sub>, 7<sub>b</sub>, 8<sub>a</sub> y 16<sub>c</sub> presentaron la

mayor capacidad de conidiación. Según Yáñez citado por Jiménez (2008) la capacidad de conidiación debe encontrarse a una concentración de  $10^8$  a  $10^{10}$  esporas de *Trichoderma* sp./ml, pero la máxima concentración en las cepas aisladas se ubicó entre  $1,9 \times 10^6$  y  $1,6 \times 10^7$  esporas/ml.

**Cuadro 5.5.: Capacidad de conidiación de las cepas de *Trichoderma* spp.**

Cepa	Conidiación (esporas/ml)
7 <sub>c</sub>	$1,6 \times 10^7$ c
3 <sub>c</sub>	$1,5 \times 10^5$ ab
2 <sub>c</sub>	$4,7 \times 10^5$ ab
15 <sub>b</sub>	$2,6 \times 10^5$ ab
5 <sub>b</sub>	$3,7 \times 10^5$ ab
9 <sub>a</sub>	$2,7 \times 10^5$ ab
7 <sub>b</sub>	$6,6 \times 10^7$ c
6 <sub>b</sub>	$5,8 \times 10^4$ a
12 <sub>b</sub>	$1,4 \times 10^5$ ab
10 <sub>a</sub>	$5,3 \times 10^4$ a
10 <sub>b</sub>	$9,7 \times 10^4$ a
13 <sub>b</sub>	$3,6 \times 10^5$ ab
8 <sub>a</sub>	$3,9 \times 10^6$ b
8 <sub>b</sub>	$1,2 \times 10^5$ cb
C19	$1,5 \times 10^5$ ab
15 <sub>a</sub>	$1,5 \times 10^5$ ab
16 <sub>c</sub>	$1,9 \times 10^6$ b
10 <sub>c</sub>	$3,04 \times 10^5$ ab
7 <sub>a</sub>	$3,1 \times 10^5$ ab
5 <sub>c</sub>	$2,8 \times 10^5$ ab
11 <sub>b</sub>	$2,2 \times 10^5$ ab
13 <sub>c</sub>	$2,2 \times 10^5$ ab

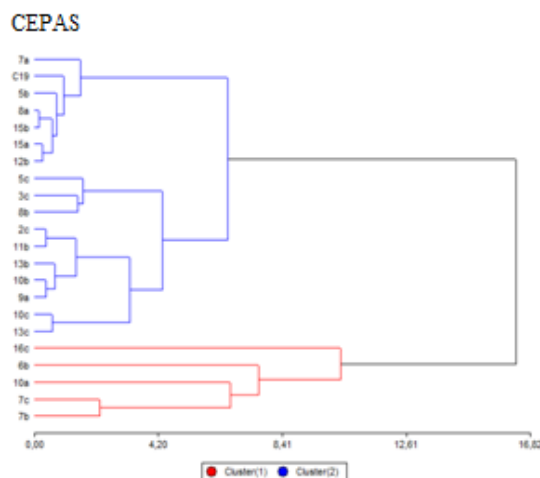
### 5.1.6. Pruebas de susceptibilidad de *Trichoderma* spp. frente a productos químicos

Falconí (2008) manifiesta que dentro de un sistema de control químico, suceden serias acumulaciones de ingredientes activos fungicidas que provocan la generación de estructuras biológicas que heredan ciertos índices de resistencia hacia fungicidas.



Estudios revelan la presencia de microorganismos reguladores de infección ocasionada por *B. cinerea*, los cuales escapan al efecto de control de fungicidas tratados. Estos microorganismos antagonistas están adaptados a los programas de aplicación de fungicidas, revelando la posibilidad de ejecutar aplicaciones conjuntas.

El análisis de conglomerados se realizó utilizando 22 tratamientos y dos variables: “crecimiento longitudinal de *Trichoderma* spp.” y “crecimiento transversal de *Trichoderma* spp.”. Este análisis mostró 2 grupos con un coeficiente de correlación cofenética de 0,812(Figura 5.3); el grupo 1 estuvo formado por las cepas 7<sub>a</sub>, C<sub>19</sub>, 5<sub>b</sub>, 8<sub>a</sub>, 15<sub>b</sub>, 15<sub>a</sub>, 12<sub>b</sub>, 5<sub>c</sub>, 3<sub>c</sub>, 8<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 11<sub>b</sub>, 13<sub>b</sub>, 10<sub>b</sub>, 9<sub>a</sub>, 10<sub>c</sub> y 13<sub>c</sub> (cepas nativas excepto la cepa C<sub>19</sub>), caracterizados por presentar un escaso crecimiento frente a ciertos fungicidas; el segundo conformado por las cepas 16<sub>c</sub>, 6<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub> (cepas nativas), caracterizados por presentar un considerable crecimiento frente a fungicidas.



**Figura 5.5.: Dendrograma de clasificación de las cepas de *Trichoderma* spp. en base a su capacidad de crecimiento frente a fungicidas.**

Al analizar la capacidad de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre fungicidas utilizados con frecuencia en la florícola se formaron dos grupos que presentan diferencias significativas. El conglomerado 1 (16<sub>c</sub>, 6<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub>) manifestó un mayor crecimiento en todos los fungicidas (Sanystar, Switch, Collis y Teldor) y el conglomerado 2 (cepas 7<sub>a</sub>, C<sub>19</sub>, 5<sub>b</sub>, 8<sub>a</sub>, 15<sub>b</sub>, 15<sub>a</sub>, 12<sub>b</sub>, 5<sub>c</sub>, 3<sub>c</sub>, 8<sub>a</sub>, 2<sub>c</sub>, 11<sub>b</sub>, 13<sub>b</sub>, 10<sub>b</sub>, 9<sub>a</sub>, 10<sub>c</sub> y 13<sub>c</sub>) no presentó crecimiento sobre el fungicida Teldor y con respecto a los demás fungicidas exhibió un menor crecimiento comparado con el conglomerado 1 (16<sub>c</sub>, 6<sub>b</sub>, 10<sub>a</sub>, 7<sub>c</sub> y 7<sub>b</sub>). Del análisis de los dos conglomerados, los fungicidas que presentaron un mayor poder de inhibición al crecimiento de *Trichoderma* fueron Sanystar y Teldor.

**Cuadro 5.6.: Pruebas de susceptibilidad de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a productos químicos ( Sanystar (St), Switch (Sw), Collis (C) y Teldor (T)) y su efecto en el crecimiento longitudinal (D1) y transversal (D2) (cm).**

<b>Pruebas de susceptibilidad de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a fungicidas</b>		
<b>Variables</b>	<b>Conglomerado 1</b>	<b>Conglomerado 2</b>
St – D1 (cm)	0,08±0,02 a	0,004±0,01 b
St-D2 (cm)	0,10±0,03 a	0,0029±0,02 b
Sw-D1 (cm)	0,80±0,11 a	0,20±0,06 b
Sw-D2 (cm)	0,82±0,1 a	0,20±0,06 b
C-D1 (cm)	4,35±0,31 a	3,09±0,17 b
C-D1 (cm)	4,42±0,3 a	3,21±0,16 b
T-D1 (cm)	0,04±0,01 a	0±0,01 b
T-D2 (cm)	0,05±0,02 a	0±0,01 b

## 5.2. FASE DE CAMPO

### 5.2.1. Severidad de infección de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda

La cámara húmeda propició las condiciones ideales para que *Botrytis cinerea* se expresara en el menor tiempo, donde se observaron los síntomas y signos característicos de su infección; tales como crecimiento micelial, decoloración de los pétalos de la rosa, marchitez, podredumbre, y en algunos casos esporulación color grisácea.

Cuando los botones florales fueron colocados en cámara de humedad se encontraban asintomáticos; detalle que parece corroborar una característica del hongo que puede permanecer quiescente hasta que las condiciones sean adecuadas, como lo cita Sandón (2005).

Al realizar las comparaciones ortogonales de la severidad del ataque de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda, se obtuvieron diferencias significativas en todas las evaluaciones realizadas. Pero al analizar la comparación de los tratamientos evaluados con sus respectivos testigos se encontró diferencias significativas solamente en la quinta semana de evaluación, lo cual de alguna manera corrobora diversos estudios citados por Cornejo (2005) que muestran la posibilidad de control de enfermedades fungosas mediante el uso de antagonistas, los cuales son aplicados en forma directa sobre el cultivo; mientras que al realizar la comparación entre las variedades de rosas (Freedom, Dekora y Amelia) se

encontraron diferencias significativas en todas las evaluaciones programadas, similar a la comparación realizada entre las variedades Dekora y Amelia.

Al comparar los tratamientos aplicados sobre la variedad Freedom y su respectivo testigo no se encontraron diferencias significativas en todas las semanas de evaluación, similar a la comparación entre T<sub>1</sub> (Freedom + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>2</sub> (Freedom + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>3</sub> (Freedom + Cepa 7<sub>b</sub>) que no presenta diferencias significativas.

Al comparar los tratamientos aplicados sobre la variedad Dekora y su respectivo testigo no se encontraron diferencias significativas; pero al comparar los tratamientos T<sub>4</sub> (Dekora + Cepa C<sub>19</sub>) y T<sub>5</sub> (Dekora + Cepa 8<sub>a</sub>) - T<sub>6</sub> (Dekora + Cepa 7<sub>b</sub>) presentaron diferencias significativas en la quinta semana de evaluación. Mientras que la comparación entre los tratamiento T<sub>5</sub> (Dekora + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>6</sub> (Dekora + Cepa 7<sub>b</sub>) no exhibió diferencias significativas.

La comparación entre los tratamientos asignados en la variedad Amelia con su respectivo testigo mostró diferencias significativas en la quinta semana de evaluación; mientras que la comparación entre T<sub>7</sub> (Amelia + Cepa C<sub>19</sub>) y T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>) -T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>) presentó diferencias significativas en la segunda semana de evaluación.

La comparación del tratamiento T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>) manifestó diferencias significativas en las semanas 3 y 5.

**Cuadro 5.7.: Probabilidades ajustadas a cada fuente de variación de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* de los tratamientos evaluados en cámara húmeda.**

Severidad de Infección en Cámara Húmeda				
Comparaciones	Semana 1	Semana 3	Semana 5	Semana 7
	P	P	P	P
Tratamiento vs testigos	0,3218	0,4228	0,0042	>0,9999
Frd, Dk vs Am	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Dk vs Am	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T Frd vs Test Frd	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T <sub>1</sub> vs T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub>	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub>	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
T Dk vs Test Dk	0,7545	>0,9999	0,3579	0,6226
T <sub>4</sub> vs T <sub>5</sub> , T <sub>6</sub>	0,1239	>0,9999	0,0104	0,7277
T <sub>5</sub> vs T <sub>6</sub>	0,7017	>0,9999	>0,9999	0,0728
T Am vs Test Am	0,1614	0,1665	0,0001	0,6226
T <sub>7</sub> vs T <sub>8</sub> , T <sub>9</sub>	0,5075	0,0515	0,053	0,7277
T <sub>8</sub> vs T <sub>9</sub>	0,7017	0,0009	0,001	0,5468
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Con respecto a la severidad de infección de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda se observó que los tratamientos T<sub>1</sub> (variedad Freedom + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>2</sub> (Freedom + Cepa 8<sub>a</sub>), T<sub>3</sub> (Freedom + Cepa 7<sub>b</sub>) y Testigo 1 (Freedom) no presentan diferencias significativas, mostrando un valor de 0 en la escala de severidad (Cuadro 4.6.). La severidad del ataque de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda en los tratamientos T<sub>4</sub> (Variedad Dekora + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>5</sub> (Variedad Dekora + Cepa 8<sub>a</sub>), T<sub>6</sub> (Variedad Dekora + Cepa 7<sub>b</sub>) y Testigo 2 (Variedad Dekora) presentaron una menor severidad que los tratamientos T<sub>7</sub> (variedad Amelia + Cepa

C<sub>19</sub>), T<sub>8</sub> (variedad Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>), T<sub>9</sub> (variedad Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>) y Testigo (variedad Amelia); los cuales acusaron el grado de severidad más alto.

**Cuadro 5.8.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* de los tratamientos evaluados en cámara húmeda.**

Severidad de Infección en Cámara Húmeda				
Tratamiento	Semana 1	Semana 3	Semana 5	Semana 7
T <sub>1</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>2</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>3</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>4</sub>	0,89 $\pm$ 0,20 bc	0 a	0,44 $\pm$ 0,24 a	0,33 $\pm$ 0,24 ab
T <sub>5</sub>	0,44 $\pm$ 0,24 ab	0 a	0 a	0,11 $\pm$ 0,11 ab
T <sub>6</sub>	0,56 $\pm$ 0,18 ab	0 a	0 a	0,44 $\pm$ 0,24 b
T <sub>7</sub>	1,44 $\pm$ 0,24 cd	1,78 $\pm$ 0,22 c	1,89 $\pm$ 0,11 c	1 c
T <sub>8</sub>	1,67 $\pm$ 0,29 d	0,89 $\pm$ 0,20 b	2,56 $\pm$ 0,18 d	1 c
T <sub>9</sub>	1,56 $\pm$ 0,24 d	1,78 $\pm$ 0,40 c	1,89 $\pm$ 0,31 c	1,11 $\pm$ 0,11 c
Test1	0 a	0 a	0 a	0 a
Test2	0,56 $\pm$ 0,18 ab	0 a	0 a	0,22 $\pm$ 0,15 ab
Test3	1,22 $\pm$ 0,36 cd	1,78 $\pm$ 0,40 c	1,44 $\pm$ 0,18 b	1,11 $\pm$ 0,20 c

Al analizar el grado de severidad de infección de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda tomando en cuenta las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas se nota que existe un menor grado de severidad con las cepas 7<sub>b</sub> y 8<sub>a</sub> (cepas nativas) aunque el grado de severidad varía entre una semana y otra. Mientras que la cepa C<sub>19</sub> (cepa exótica) presentó un mayor grado de severidad casi en todas las evaluaciones realizadas. Estos resultados corroboran ciertos estudios citados por Benzing (2001), que afirman que un control biológico más efectivo se realiza utilizando cepas locales y adaptadas a la zona del cultivo.

**Cuadro 5.9.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda ante la aplicación de la cepas de *Trichoderma* spp., evaluadas durante 7 semanas.**

<b>Severidad de Infección en Cámara Húmeda</b>				
<b>Cepa</b>	<b>Semana 1</b>	<b>Semana 3</b>	<b>Semana 5</b>	<b>Semana 7</b>
7 <sub>b</sub>	0,70 $\pm$ 0,16 a	0,59 $\pm$ 0,21 a	0,63 $\pm$ 0,20 a	0,52 $\pm$ 0,12 a
8 <sub>a</sub>	0,70 $\pm$ 0,18 a	0,30 $\pm$ 0,10 a	0,85 $\pm$ 0,24 a	0,37 $\pm$ 0,09 a
C <sub>19</sub>	0,78 $\pm$ 0,15 a	0,59 $\pm$ 0,18 a	0,78 $\pm$ 0,18 a	0,44 $\pm$ 0,11 a

Para el grado de severidad de infección de *Botrytis cinerea* en cámara húmeda tomando en cuenta las variedades de rosas evaluadas se observó que la variedad Amelia tuvo los valores más altos de severidad y la variedad Dekora presentó el menor valor, estos resultados confirman la susceptibilidad de las variedades blancas y rosadas a la infección de *Botrytis cinerea* mencionado por Gallegos *et al.*, (1999); mientras que la variedad Freedom no manifestó infección, ya que esta variedad se caracteriza por su resistencia a enfermedades como lo mencionan Rodríguez y Flórez (2006).

**Cuadro 5.10.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* de las variedad de rosas evaluadas en cámara húmeda.**

<b>Severidad de Infección en Cámara Húmeda</b>				
<b>Variedad</b>	<b>Semana 1</b>	<b>Semana 3</b>	<b>Semana 5</b>	<b>Semana 7</b>
Amelia	1,47 $\pm$ 0,14 c	1,56 $\pm$ 0,17 b	1,94 $\pm$ 0,12 b	1,06 $\pm$ 0,06 c
Dekora	0,61 $\pm$ 0,10 b	0 a	0,11 $\pm$ 0,07 a	0,28 $\pm$ 0,09 b
Freedom	0 a	0 a	0 a	0 a

### 5.2.2. Incidencia de *Botrytis cinerea* en campo

Con respecto a la incidencia de *Botrytis cinerea* en campo, T<sub>1</sub> (Freedom + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>2</sub> (Freedom + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>3</sub> (Freedom + Cepa 7<sub>b</sub>) se constituyeron en los mejores tratamientos puesto que no presentaron infección de moho gris a nivel de campo durante las evaluaciones y los tratamientos T<sub>4</sub> (Dekora + C<sub>19</sub>), T<sub>5</sub> (Dekora + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>6</sub> (Dekora + Cepa 7<sub>b</sub>) presentaron porcentajes de incidencia en la cuarta semana de evaluación. Mientras que los tratamientos T<sub>7</sub> (Amelia + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>) presentaron infección a partir de la tercera semana de evaluación.

Los valores más altos de incidencia se manifestaron en los tratamientos T<sub>7</sub> (Amelia + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>)

Al analizar los tratamientos con sus respectivos testigos se observa que no existen diferencias significativas.

De acuerdo a estudios realizados por Hong *et al.*, y Cook & Baker citados por Cornejo (2005), el periodo entre el establecimiento del patógeno y su esporulación es el más vulnerable para ser desplazado por el antagonista.



**Cuadro 5.11.: Promedios  $\pm$  error estándar del porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en los tratamientos evaluados en el campo.**

Porcentaje de Incidencia en el Campo (%)				
Tratamiento	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
T <sub>1</sub>	0	0	0 a	0 a
T <sub>2</sub>	0	0	0 a	0 a
T <sub>3</sub>	0	0	0 a	0 a
T <sub>4</sub>	0	0	0 a	6,67 $\pm$ 1,93 b
T <sub>5</sub>	0	0	0 a	7,8 $\pm$ 1,1 b
T <sub>6</sub>	0	0	0 a	7,8 $\pm$ 1,1 b
T <sub>7</sub>	0	0	4,43 $\pm$ 1,13 b	16,67 $\pm$ 1,93 c
T <sub>8</sub>	0	0	4,43 $\pm$ 1,14 b	13,3 c
T <sub>9</sub>	0	0	4,43 $\pm$ 1,15 b	15,53 $\pm$ 2,23 c
Test1	0	0	0 a	0 a
Test2	0	0	0 a	6,7 b
Test3	0	0	6,7 c	13,33 $\pm$ 1,93 c

Para la incidencia de *Botrytis cinerea* en el campo tomando en cuenta las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas, no se encontraron diferencias significativas.

**Cuadro 5.12.: Promedios  $\pm$  error estándar del porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* por acción de las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en el campo.**

Porcentaje de Incidencia en el Campo (%)				
Cepa	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
7 <sub>b</sub>	0 a	0 a	1,48 $\pm$ 0,81 a	7,78 $\pm$ 2,35 a
8 <sub>a</sub>	0 a	0 a	1,48 $\pm$ 0,81 a	7,03 $\pm$ 1,96 a
C <sub>19</sub>	0 a	0 a	1,48 $\pm$ 0,81 a	7,78 $\pm$ 2,55 a

La incidencia de *Botrytis cinerea* en el campo tomando en cuenta las variedades de rosas evaluadas, generó diferencias significativas. Siendo la variedad Amelia la que presentó un mayor porcentaje de incidencia, seguido por la variedad Dekora que manifestó infección en

la última semana de evaluación, debido a la susceptibilidad que presentan estas variedades a la infección de *Botrytis cinerea* como lo menciona Gallegos *et. al.*, (1999); mientras que la variedad Freedom no acusó infección en campo.

Con respecto al tiempo en que *Botrytis cinerea* suscita infección, Helbing citado por Martínez y Moreno (2008) afirma que el moho gris crece principalmente sobre frutos maduros después de la cosecha, pero también sobre flores y frutos maduros e inmaduros antes de la cosecha. Chase citado por Martínez y Moreno (2008) menciona que la susceptibilidad al moho gris de los órganos de las plantas, especialmente frutos y flores, incrementa con la edad o maduración.

**Cuadro 5.13.: Promedios  $\pm$  error estándar del porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en las variedades evaluadas en el campo.**

<b>Porcentaje de Incidencia en el Campo (%)</b>				
<b>Variedad</b>	<b>Semana 12</b>	<b>Semana 13</b>	<b>Semana 14</b>	<b>Semana 15</b>
Amelia	0 a	0 a	5 $\pm$ 0,51 b	14,71 $\pm$ 0,87 c
Dekora	0 a	0 a	0 a	7,24 $\pm$ 0,56 b
Freedom	0 a	0 a	0 a	0 a

### **5.2.3. Severidad de infección de *Botrytis cinerea* en tres variedades de rosa evaluadas en el campo**

La severidad de infección de *Botrytis cinerea* en las variedades de rosa evaluadas en el campo manifestaron diferencias estadísticas.

Según Coertze citado por Sandón (2005) la severidad de la infección se encuentra directamente relacionada a la cantidad de inóculo presente al momento de la inoculación, y es esto precisamente lo que se presentó en casi todos los tratamientos excepto el T<sub>1</sub>

(Freedom + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>2</sub> (Freedom + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>3</sub> (Freedom + Cepa 7<sub>b</sub>). Este resultado se podría atribuir a la característica que presenta la variedad Freedom que es resistente a las enfermedades como lo menciona Rodríguez y Flores (2006).

Pero hay que tomar en cuenta que los tratamientos T<sub>7</sub> (Amelia + Cepa C<sub>19</sub>), T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>) y T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>) son los que presentaron un mayor grado de severidad, debido a la susceptibilidad que presenta esta variedad según la afirmación de Gallegos *et al.*, (1999). Según los estudios mencionados por Jiménez (2008), se ha podido establecer que mientras más tempranamente se aplique el bioformulado con respecto al estado fenológico que se desee proteger, mejor es el resultado de control otorgado, pero en el estudio realizado no se observó esta característica en la variedad Amelia.

**Cuadro 5.14.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* de los tratamientos evaluados en el campo.**

<b>Severidad de la Infección en el Campo</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Semana 12</b>	<b>Semana 13</b>	<b>Semana 14</b>	<b>Semana 15</b>
T <sub>1</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>2</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>3</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>4</sub>	0 a	0 a	0 a	0,07 $\pm$ 0,03 ab
T <sub>5</sub>	0 a	0 a	0 a	0,08 $\pm$ 0,03 abc
T <sub>6</sub>	0 a	0 a	0 a	0,08 $\pm$ 0,03 abc
T <sub>7</sub>	0 a	0 a	0,04 $\pm$ 0,02 b	0,17 $\pm$ 0,04 d
T <sub>8</sub>	0 a	0 a	0,06 $\pm$ 0,02 b	0,13 $\pm$ 0,04 bcd
T <sub>9</sub>	0 a	0 a	0,03 $\pm$ 0,02 ab	0,16 $\pm$ 0,04 cd
Test1	0 a	0 a	0 a	0 a
Test2	0 a	0 a	0 a	0,07 $\pm$ 0,03 ab
Test3	0 a	0 a	0,07 $\pm$ 0,03 b	0,13 $\pm$ 0,04 bcd

La severidad de infección de *Botrytis cinerea* en el campo tomando en cuenta las cepas de *Trichoderma* spp. aplicados no presentó diferencias significativas.

**Cuadro 5.15.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* por aplicación de cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en el campo.**

<b>Severidad de la Infección en el Campo</b>				
<b>Cepa</b>	<b>Semana 12</b>	<b>Semana 13</b>	<b>Semana 14</b>	<b>Semana 15</b>
7 <sub>b</sub>	0 a	0 a	0,01 $\pm$ 0,01 a	0,08 $\pm$ 0,02 a
8 <sub>a</sub>	0 a	0 a	0,02 $\pm$ 0,01 a	0,07 $\pm$ 0,02 a
C <sub>19</sub>	0 a	0 a	0,01 $\pm$ 0,01 a	0,08 $\pm$ 0,02 a

La severidad de infección de *Botrytis cinerea* en la variedad Amelia en campo, fue mayor que la severidad registrada en la variedad Dekora, mientras que la variedad Freedom no presentó infección. Según reportes de Expoflores y UCE, mencionados por Jimenez (2008) muchas variedades de rosas son susceptibles a *Botrytis cinerea*, entre las que se encuentra la variedad Amelia.

En el transcurso de la investigación la severidad fue siempre de mayor grado en la variedad Amelia. En la variedad Dekora apareció la infección en la última semana de evaluación. La inefectividad de las cepas de *Trichoderma* spp. aplicadas pudo deberse a la falta de prácticas de control de calidad en la florícola, como lo menciona Jiménez (2008). Además posiblemente la concentración de células viables de las cepas aplicadas pudieron ser menores a  $10^7$  esporas/ml, por esta razón no se logró controlar eficientemente la infección del patógeno, conforme había observado Jiménez (2008) en investigaciones.

**Cuadro 5.16.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* en las variedades de rosas evaluadas en campo.**

Severidad de la Infección en el Campo				
Variedad	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
Amelia	0 a	0 a	0,05 $\pm$ 0,01 b	0,15 $\pm$ 0,02 c
Dekora	0 a	0 a	0 a	0,07 $\pm$ 0,01 b
Freedom	0 a	0 a	0 a	0 a

### 5.3. VIDA EN FLORERO

#### 5.3.1. Severidad de infección de *Botrytis cinerea* en variedades de rosa en la prueba de florero

Con respecto a la severidad de infección de *Botrytis cinerea* en la prueba de florero, se tuvo diferencias significativas en todas las observaciones realizadas. En la comparación realizada entre los tratamientos y testigos se presentó diferencias significativas a partir del segundo día de evaluación.



**Figura 5.6.: Vida en florero de las variedades evaluadas, a) Variedad Amelia b) Variedad Dekora c) Variedad Freedom**

Al realizar la comparación entre variedades se observó diferencias significativas en todas las evaluaciones, pero la comparación entre los tratamientos dentro de la variedad Freedom (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>) y con su respectivo testigo no presentó diferencias significativas. Dentro del análisis de la variedad Dekora (T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> y Testigo 2)) se observaron diferencias significativas a partir de las evaluaciones efectuadas al segundo y tercer día. Mientras que al realizar el análisis de la comparación de la variedad Amelia (T<sub>7</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub> y su respectivo testigo) no se observaron diferencias significativas.

**Cuadro 5.17.: Probabilidades ajustadas a cada fuente de variación de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* de los tratamientos evaluados en el florero.**

<b>Severidad de Infección en el Florero</b>					
<b>Comparaciones</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 8</b>	<b>Día 10</b>
	<b>p</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>p</b>	<b>P</b>
Tratamiento vs testigos	0,042	0,0104	0,0077	0,0478	0,0037
Frd, Dk vs Am	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Dk vs Am	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T Frd vs Test Frd	>0,9999	0,8859	>0,9999	0,7377	0,816
T <sub>1</sub> vs T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub>	>0,9999	0,3106	0,1806	0,1241	0,1883
T <sub>2</sub> vs T <sub>3</sub>	>0,9999	>0,9999	0,7965	0,6817	0,5687
T Dk vs Test Dk	0,0204	0,0017	0,0033	0,0023	0,0015
T <sub>4</sub> vs T <sub>5</sub> , T <sub>6</sub>	0,1445	0,0034	0,0024	0,0038	0,0045
T <sub>5</sub> vs T <sub>6</sub>	0,0116	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T Am vs Test Am	0,2286	0,2513	0,0925	0,4767	0,0365
T <sub>7</sub> vs T <sub>8</sub> , T <sub>9</sub>	0,9031	0,4777	0,206	0,0018	0,0006
T <sub>8</sub> vs T <sub>9</sub>	0,5272	0,0227	0,8974	0,0517	0,0292
<b>p</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Al analizar el grado de severidad de infección de *Botrytis cinerea* en la prueba de florero se observa que los tratamientos que presentaron un alto grado de severidad fueron los tratamientos T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>), T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>), T<sub>6</sub> (Dekora + Cepa 7<sub>b</sub>) y T<sub>7</sub> (Amelia + Cepa C<sub>19</sub>), seguidos por los tratamientos T<sub>4</sub> (Dekora + C<sub>19</sub>), T<sub>5</sub> (Dekora + Cepa 8<sub>a</sub>) que presentó un menor valor que los tratamientos antes mencionados. Mientras que los tratamientos T<sub>1</sub> (Freedom + Cepa C<sub>19</sub>) y T<sub>3</sub> (Freedom + Cepa 7<sub>b</sub>) tuvieron el menor grado de incidencia; además, cabe mencionar que el tratamiento T<sub>2</sub> (Freedom + Cepa 8<sub>a</sub>) no registró ningún grado de severidad.

**Cuadro 5.18.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* de los tratamientos evaluados en el florero.**

Severidad de Infección en el Florero					
Tratamientos	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
T <sub>1</sub>	0 a	0,10 $\pm$ 0,04 ab	0,20 $\pm$ 0,09 ab	0,30 $\pm$ 0,13 a	0,30 $\pm$ 0,13 ab
T <sub>2</sub>	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T <sub>3</sub>	0 a	0 a	0,04 $\pm$ 0,03 ab	0,08 $\pm$ 0,06 a	0,12 $\pm$ 0,08 ab
T <sub>4</sub>	0,20 $\pm$ 0,06 a	0,20 $\pm$ 0,06 ab	0,30 $\pm$ 0,09 ab	0,42 $\pm$ 0,12 a	0,48 $\pm$ 0,14 b
T <sub>5</sub>	0,20 $\pm$ 0,07 a	0,28 $\pm$ 0,10 b	0,36 $\pm$ 0,13 b	0,40 $\pm$ 0,14 a	0,40 $\pm$ 0,14 ab
T <sub>6</sub>	0,44 $\pm$ 0,10 b	0,7 $\pm$ 0,14 cd	1,06 $\pm$ 0,17 c	1,42 $\pm$ 0,20 b	1,60 $\pm$ 0,22 c
T <sub>7</sub>	0,50 $\pm$ 0,12 b	0,58 $\pm$ 0,12 cd	0,98 $\pm$ 0,15 c	1,26 $\pm$ 0,18 b	1,58 $\pm$ 0,20 c
T <sub>8</sub>	0,52 $\pm$ 0,10 b	0,78 $\pm$ 0,09 d	1,14 $\pm$ 0,13 c	1,60 $\pm$ 0,16 bc	1,98 $\pm$ 0,19 c
T <sub>9</sub>	0,46 $\pm$ 0,08 b	0,52 $\pm$ 0,08 c	1,16 $\pm$ 0,12 c	1,98 $\pm$ 0,14 c	2,44 $\pm$ 0,15 d
Test1	0 a	0,02 $\pm$ 0,02 a	0,08 $\pm$ 0,05 ab	0,18 $\pm$ 0,10 a	0,18 $\pm$ 0,10 ab
Test2	0,10 $\pm$ 0,04 a	0,10 $\pm$ 0,04 ab	0,20 $\pm$ 0,09 ab	0,26 $\pm$ 0,12 a	0,28 $\pm$ 0,12 ab
Test3	0,40 $\pm$ 0,07 b	0,52 $\pm$ 0,10 c	0,88 $\pm$ 0,14 c	1,50 $\pm$ 0,18 b	1,64 $\pm$ 0,19 c

El grado de severidad de infección de *Botrytis cinerea* generada por las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en la prueba de florero, mostró diferencias significativas a

partir del quinto día de evaluación. Siendo las cepas 8<sub>a</sub> y C<sub>19</sub> las que presentaron un menor grado de severidad.

**Cuadro 5.19.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de infección de *Botrytis cinerea* por la aplicación de cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en florero**

<b>Severidad de Infección en el Florero</b>					
<b>Cepa</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 8</b>	<b>Día 10</b>
7 <sub>b</sub>	0,30 $\pm$ 0,04 a	0,41 $\pm$ 0,06 a	0,75 $\pm$ 0,08 b	1,16 $\pm$ 0,11 b	1,39 $\pm$ 0,12 b
8 <sub>a</sub>	0,24 $\pm$ 0,04 a	0,35 $\pm$ 0,05 a	0,50 $\pm$ 0,07 a	0,67 $\pm$ 0,09 a	0,79 $\pm$ 0,10 a
C <sub>19</sub>	0,23 $\pm$ 0,05 a	0,29 $\pm$ 0,05 a	0,49 $\pm$ 0,07 a	0,66 $\pm$ 0,09 a	0,79 $\pm$ 0,10 a

Con respecto al grado de severidad de infección de *Botrytis cinerea* en las variedades de rosas evaluadas en la prueba de florero se puede decir que existe diferencias significativas en todas las evaluaciones realizadas, siendo la variedad Amelia la variedad que presentó un mayor grado de severidad, seguido por la variedad Dekora.



**Cuadro 5.20.: Promedios  $\pm$  error estándar de la severidad de la infección de *Botrytis cinerea* en las variedades de rosas evaluadas en la prueba de florero.**

<b>Severidad de la infección en el Florero</b>					
<b>Variedad</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 8</b>	<b>Día 10</b>
Amelia	0,47 $\pm$ 0,05 c	0,60 $\pm$ 0,05 c	1,04 $\pm$ 0,07 c	1,59 $\pm$ 0,08 c	1,91 $\pm$ 0,09 c
Dekora	0,24 $\pm$ 0,04 b	0,32 $\pm$ 0,05 b	0,48 $\pm$ 0,07 b	0,63 $\pm$ 0,08 b	0,69 $\pm$ 0,09 b
Freedom	0 a	0,03 $\pm$ 0,01 a	0,08 $\pm$ 0,03 a	0,14 $\pm$ 0,04 a	0,15 $\pm$ 0,05 a

### **5.3.2. Incidencia de *Botrytis cinerea* en variedades de rosas en la prueba de florero**

La incidencia de *Botrytis cinerea* de los tratamientos T<sub>9</sub> (Amelia + Cepa 7<sub>b</sub>), T<sub>8</sub> (Amelia + Cepa 8<sub>a</sub>), T<sub>6</sub> (Dekora + Cepa 7<sub>b</sub>) y T<sub>7</sub> (Amelia + Cepa C<sub>19</sub>) en la prueba de florero, fue mayor que la incidencia de los tratamientos T<sub>4</sub> (Dekora + C<sub>19</sub>) y T<sub>5</sub> (Dekora + Cepa 8<sub>a</sub>). Se observó un mayor control de la cepa C<sub>19</sub> en la variedad Amelia; es decir, en éste comportamiento se corrobora lo mencionado por Wolf citado por Benzing (2001) quien asegura que no siempre los mejores antagonistas se encuentran en el ecosistema nativo.

**Cuadro 5.21.: Porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* de los tratamientos evaluados en el florero.**

Porcentaje de Incidencia en el Florero (%)					
Tratamiento	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
T <sub>1</sub>	0	10	10	10	10
T <sub>2</sub>	0	0	0	0	0
T <sub>3</sub>	0	0	4	4	4
T <sub>4</sub>	20	20	22	22	24
T <sub>5</sub>	16	16	16	16	16
T <sub>6</sub>	36	38	50	52	54
T <sub>7</sub>	34	38	54	58	58
T <sub>8</sub>	42	68	68	74	76
T <sub>9</sub>	44	48	74	90	90
Test1	0	2	6	6	6
Test2	10	10	10	10	12
Test3	40	42	48	68	68

La incidencia de *Botrytis cinerea* en la prueba de florero tomando en cuenta la acción de las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas, no muestra diferencias significativas, es decir que las cepas nativas y exótica muestran un comportamiento similar. Wolf citado por Benzing (2001) indica que no siempre los antagonistas más efectivos se encuentran en el mismo ecosistema que la planta hospedera o el patógeno.

**Cuadro 5.22.: Promedios  $\pm$  error estándar del porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* por acción de las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en la prueba de florero.**

Porcentaje de Incidencia en el Florero (%)					
Cepa	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
7 <sub>b</sub>	26,67 $\pm$ 13,53 a	28,67 $\pm$ 14,62 a	42,67 $\pm$ 20,54 a	48,67 $\pm$ 24,88 a	49,33 $\pm$ 24,94 a
8 <sub>a</sub>	19,33 $\pm$ 12,24 a	28 $\pm$ 20,53 a	28 $\pm$ 20,53 a	30 $\pm$ 22,48 a	30,67 $\pm$ 23,13 a
C <sub>19</sub>	18 $\pm$ 9,87 a	22,67 $\pm$ 8,19 a	28,67 $\pm$ 13,13 a	30 $\pm$ 14,42 a	30,67 $\pm$ 14,25 a

Al analizar la incidencia de *Botrytis cinerea* en la prueba de florero tomando en cuenta las variedades de rosas se observó la existencia de diferencias significativas y la variedad con mayor porcentaje de incidencia fue la variedad Amelia, la cual es considerada como una variedad susceptible a *Botrytis cinerea*.

**Cuadro 5.23.: Promedios  $\pm$  error estándar del porcentaje de incidencia de *Botrytis cinerea* en las variedades de rosas evaluadas en la prueba de florero.**

Porcentaje de Incidencia en el Florero (%)					
Variedad	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Día 10
Amelia	40 $\pm$ 2,16 c	49 $\pm$ 6,66 b	61 $\pm$ 6,03 b	72,50 $\pm$ 6,70 b	73 $\pm$ 6,76 b
Dekora	20,50 $\pm$ 5,56 b	21 $\pm$ 6,03 ab	24,50 $\pm$ 8,85 a	25 $\pm$ 9,33 a	26,5 $\pm$ 9,5 a
Freedom	0 a	3 $\pm$ 2,38 a	5 $\pm$ 2,08 a	5 $\pm$ 2,08 a	5 $\pm$ 2,08 a

#### 5.4. Análisis Económico

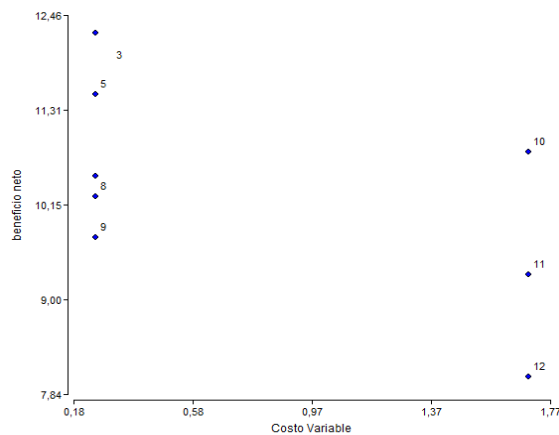
Siguiendo la metodología de análisis de presupuesto parcial según Perrín *et al.* (1976), se procedió a obtener el beneficio bruto que corresponde a la producción de rosa por tratamiento en todo el ciclo multiplicado por el valor de un tallo de rosa. Por otro lado se obtuvo el costo variable que corresponde al precio de los insumos utilizados, de diferencia del beneficio bruto menos el costo variable se obtuvo el beneficio neto.

Colocando los beneficios brutos en orden decreciente acompañado de sus costos variables se procedió a realizar el análisis de dominancia donde el tratamiento dominado es aquel que

a igual o menor beneficio neto presenta un menor costo variable de esta manera se determinó los tratamientos no dominado (Cuadro 5.4.2.)(Figura 5.6.).

**Cuadro 5.24.: Beneficio bruto, beneficio neto y costos variables de cada uno de los tratamientos.**

Tratamientos	BEN BRUT	BEN NET	Costos Variables	
T <sub>1</sub>	12,5	12,25	0,25	N/D
T <sub>2</sub>	12,5	12,25	0,25	N/D
T <sub>3</sub>	12,5	12,25	0,25	N/D
T <sub>4</sub>	11,75	11,5	0,25	DOM
T <sub>5</sub>	11,75	11,5	0,25	DOM
T <sub>6</sub>	10,75	10,5	0,25	DOM
T <sub>7</sub>	10	9,75	0,25	DOM
T <sub>8</sub>	10,5	10,25	0,25	DOM
T <sub>9</sub>	10	9,75	0,25	DOM
Test1	12,5	10,8	1,7	DOM
Test2	11	9,3	1,7	DOM
Test3	9,75	8,05	1,7	DOM



**Figura 5.6.: Costos variables vs. Beneficio neto de los tratamientos evaluados**

Al presentar los mismos valores los tratamientos no dominados ( $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ ) no se pudo realizar el análisis marginal y el cálculo de retorno marginal.

Se determinó en este estudio que todos los tratamientos fueron la alternativa económica más viable que sus respectivos testigos.

## VI. CONCLUSIONES

- Se aislaron y conservaron en suelo estéril y silica gel 21 cepas nativas de *Trichoderma* spp. de la finca. Se evaluó previamente su capacidad antagónica frente a *Botrytis cinerea* aislado a partir de botones florales recolectados en la misma finca.
- De las 21 cepas de *Trichoderma* se seleccionaron 2 cepas nativas que fueron identificadas como *Trichoderma harzianum*; las mismas que mostraron una alta capacidad antagónica *in vitro* frente al patógeno *Botrytis cinerea*.
- Las pruebas de antagonismo ayudó a visualizar a las cepas mas idóneas para utilizarlas como una herramienta de biocontrol de *Botrytis cinerea* y posteriormente se elaboró el bioformulado a base de dos cepas nativas y una cepa exótica.
- Al realizar la aplicación del bioformulado a base de *Trichoderma* spp. a nivel de campo se pudo observar que la infección de *Botrytis cinerea* se da en la última etapa productiva; es decir, dos semanas antes de la cosecha.
- La aplicación del bioformulado si controla la infección del patógeno dentro de la variedad Amelia.
- La aplicación de los bioformulados no mostró diferencias significativas en la variedad susceptible (variedad Amelia) en comparación con su testigo (manejo convencional con fungicidas ejecutados en la finca), mientras que en la variedad moderadamente susceptible (variedad Dekora) y resistente (variedad Freedom) muestra diferencias significativas, presentando sus testigos los mejores resultados.
- Durante la vida en florero la cepa exótica C19 mostró los mejores resultados en cuanto al biocontrol de *Botrytis cinerea*, seguido por la cepa nativa 8a.

- Los tratamientos evaluados constituyeron la mejor alternativa económica durante el desarrollo de la investigación en comparación con sus respectivos testigos.

## VII. RECOMENDACIONES

- Aplicar semanalmente los bioformulados al follaje de las plantas y al suelo con la finalidad de reducir el inóculo del patógeno *Botrytis cinerea* (además de incrementar la actividad microbiana a nivel del suelo); esta aplicación periódica dependerá de la disponibilidad del bioformulado, de la planificación de las fumigaciones y de la incidencia y severidad de la infección.
- Realizar la evaluación de la eficiencia de los bioformulados en una época diferente a la que se realizó este estudio, con la finalidad de monitorear el comportamiento de *Trichoderma*.
- Efectuar un análisis de la viabilidad de las esporas y de la población de *Trichoderma* spp. periódicamente, luego de su liberación en campo.
- Realizar conteos de la concentración de conidias a nivel de campo, con la finalidad de garantizar que se está aplicando la dosis recomendada que es un mínimo de  $10^7$  esporas/ml.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. Noriega editores, traducido por Guzmán M., México, p.271, 281.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. 5 ed. Londres. P. 510-514.
- Aragonés, M. 1989. Control de Plagas de plantas y animales. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México. p. 157.
- Arzate, J., Michel, A., Domínguez, V., Santos, O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis morelet*, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa sp.*) *in vitro* e invernadero.
- Asero, J. 2007. Evaluación de *Trichoderma harzianum* y *Penicillium sp.* en el control de “oidio” (*Sphaeroteca pannosa*) en rosas (*Rosa sp.*) variedad aalsmer gold. Tesis Ing. Agrónomo. Ascázubi, EC. UCE.
- Benzing, A. 2001. Agricultura orgánica, Fundamentos para la región andina. Editorial Neekar-Verlag. Alemania. Pp: 321.
- Bradley, N. 2008. *Trichoderma* spp., Incluyendo *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *hamatum T.* y otras spp (On line). Quito, EC. Consultado 27 nov. 2009. Disponible en: [http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html&prev=/tr%20anslate\\_s%3Fhl%3Des%26q%3DCICLO](http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html&prev=/tr%20anslate_s%3Fhl%3Des%26q%3DCICLO)
- Buestán, C. 1998. Control de *Botrytis cinerea* mediante el uso de botricidas en la postcosecha en rosas. Tesis Ing. Agrónomo. Tambillo, EC. UCE.

- Cornejo Abarca, P. 2005. Evaluación de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control de enfermedades fungosas de postcosecha en zapallo de guarda. Tesis Ing. Agrónomo. Talca, Chile. Universidad de Talca.
- Cholango, P. 2009. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. *in vitro*, para el control de problemas radiculares en flores de verano. Tesis Ing. Agrop. Sangolquí, EC. ESPE-IASA.
- Chavez, M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en el cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis Microbióloga Industrial. Bogota, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana.
- Diario Hoy. 2009. Ecuador prepara sus mejores rosas para San Valentín (On line). Quito, EC. Consultado 27 Oct. 2009. Disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/ecuador-prepara-sus-mejores-rosas-para-san-valentin-333497.html>.
- Estrada, J. 2010. Bioplaguicidas en la agricultura ecológica y sostenible. Instituto de Investigaciones Fundamentales en agricultura tropical.
- Fainstein, R. 1997. Manual para el cultivo de Rosas en Latinoamérica. Ecuaooffset Cía Ltda. Pp: 8-17, 156-160, 190-193, 221-227.
- Falconí, C. 1988. El control Biológico de Plagas y Enfermedades de las plantas. Universidad San Francisco de Quito. Pp: 11-14, 18-20, 51-56.
- Falconí, C. 1998. Fitopatología Práctica. Escuela Politécnica del Ejército. Quito, EC. Pp: 51-54.
- Gallegos, P.; Merino, R.; Orellana, H.; Proaño, G.; Suquilanda, M.; Velastegui, R.; Zurita, G. 1999. Manual Técnico de Fitosanidad en Foricultura. Universidad Central del Ecuador- Expoflores. Quito. Pp: 16-20.

- Gómez Currea, M. 2009. Efecto de una tecnología orgánica Biofit sobre la producción y calidad de un cultivo de rosa variedad Freedom. Tesis Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana.
- Gonzáles Barrientos, V. 2000. Evaluación de la capacidad de biocontrol de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea* en lechugas cultivadas en mesas flotantes. Tesis Ing. Agrónomo. Talca, Chile. Universidad de Talca.
- Guigón, C. González P. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 22, número 001. México. p. 117-124.
- Jiménez Cevallos, A. 2008. Aislamiento, caracterización y formulación artesanal de *Trichoderma* spp. para el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas. Tesis Ing. Agrop. Sangolquí, EC. ESPE-IASA.
- Kenneth, R. 1998. Compendio de Enfermedades de Rosas. Graficas Universal – APS Press. Ecuador. Pp: 18-19.
- Kubicek, C., Harman, G. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis. Volumen 1.
- Martínez, M., Moreno, Z. 2008. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp, en condiciones semicontroladas. Tesis Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana.
- Mozo, J., Calvache, M. 2004. Response of rose crop (*rosae* sp) var. latin lady and papaya to foliar application of bioestimulants. Rumipamba VOL. XXI N° 1. Amaguaña - Pichincha.

- Perrin, R., Anderson, J., Moscardi, E. 1988. La formulación de recomendación a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. CIMMYT. México. Pp.: 79.
- Rodríguez, W. Flórez, V. 2006. Comportamiento fenológico de tres variedades de rosas rojas en función de la acumulación de la temperatura. Agron. colomb. Vol.24 no.2. (On line). Quito, EC. Consultado 27 Enero 2011. Disponible en: [http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120-99652006000200006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120-99652006000200006&script=sci_arttext)
- Obreque, M. 2004. Evaluación de aplicaciones preinfección del fungicida Benomilo y del Biocontrolador *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp. en proteáceas. Tesis Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile. Universidad de Talca.
- Sandón Cantero, C. 2005. Efecto de la limpieza de fuentes de inóculo del “Moho gris” sobre la presencia de conidias aéreas del agente causal de la enfermedad en un cultivo de rosa variedad Classy. Tesis Microbiologa Agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana.
- Stanton, G. David, C. Dutky, E. 2001. Plagas y Enfermedades de los cultivos de Flores – Estrategias Biológicas. Ediciones Hortitecnia. Colombia. P. 201-202.
- Vero, S., Mondino, P. 1999. Control Biológico Postcosecha en Uruguay. Horticultura Internacional. Montevideo, Uruguay.