

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**Tesis previa a la obtención del Título de
INGENIERA AGROPECUARIA**

TEMA: COLECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE EFICACIA *IN VITRO* DE (*Trichoderma sp.*) EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE (*Botrytis cinerea*) EN LA FINCA FLORÍCOLA PICASSO ROSES.

**AUTORA:
VIVIANA ELIZABETH CAIZA CHIMARRO**

**DIRECTOR/A:
MSc. LAURA HUACHI**

Quito, Julio del 2013

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente documento, son de exclusiva responsabilidad del autor.

No se permite la reproducción total o parcial de este documento, así como la traducción o distribución, sin la debida autorización del autor.

Quito, Julio del 2013

.....
(f): Viviana Elizabeth Caiza Chimarro

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, a mis padres María Olimpia Chimarro y Juan Felipe Caiza y a mi abuelita Delia Chimarro, que siempre estuvieron pendientes e incansablemente me brindaron su apoyo incondicional.

A mis queridos hermanos Oswaldo, Juan Carlos, Dieguito, Rocío, Sandra, Doris, que con sus anhelos de superación supieron guiarme.

A mis hermosos sobrinos Andrés, Alex, Mateo, Jayr, Stiven, Nico, Valeria, Emily, Valentina, Dany y Monserrate, que con su sonrisa e inocencia reflejan las ganas de vivir y seguir luchando incesantemente por los retos de la vida.

A mi querido y jamás olvidado Juan Carlos quien me brindó su apoyo en el instante exacto que lo necesité.

Viviana Elizabeth Caiza Chimarro

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la oportunidad de seguir descubriendo la vida plasmando los sueños en realidad.

A la Universidad Politécnica Salesiana por concederme una gran oportunidad de ser una profesional de su querida institución y de la cual jamás olvidaré el apoyo brindado, especialmente en una época en la cual creí que nada tendría sentido.

A mis profesores Ing. Laurita Huachi, Ing. Charles Cachipundo, Ing. Valdano Tafur, Ing. Janss Beltrán y todos quienes compartieron la docencia que con sus conocimientos supieron guiarme en el camino de la vida profesional.

A mis amigos, María Christina Pilicita, Renato Rivera, Ángel Páez, por ser un gran apoyo en el camino universitario, con quienes compartimos muchos momentos de conocimiento, alegría y tristeza.

A la finca florícola Picasso Roses, al Ing. Diego Naranjo e Ing. Alex Acosta que me permitieron realizar el presente trabajo y a su búsqueda constante de una mejora en el programa de control sanitario en bien de la institución.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo general	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1 Cultivo de rosas	15
3.1.1 Importancia económica	15
3.1.2 Descripción botánica de la rosa	16
3.1.3 Multiplicación	16
3.1.4 Requerimientos climáticos	17
3.1.5 Fertirrigación	18
3.1.6 Formación de la planta	18
3.1.7 Plagas y enfermedades	19
3.1.8 Recolección	22
3.1.9 Postcosecha	22
3.1.10 Comercialización	22
3.2 Suelo	22
3.2.1 Fertilidad del suelo	23
3.2.2 Microorganismos del suelo	23
3.2.3 Microorganismos antagonicos	23
3.2.4 Factores que afectan el crecimiento y esporulación de los hongos	25
3.3 Patógeno <i>Botrytis cinerea</i>	27
3.3.1 Clasificación taxonómica	27
3.3.2 Generalidades morfológicas	27
3.3.3 Ciclo de vida	28
3.3.4 Síntomas de <i>Botrytis cinerea</i>	29
3.3.5 Control fitosanitario de <i>Botrytis cinerea</i>	30
3.4 Antagonista <i>Trichoderma sp.</i>	33

3.4.1	Generalidades.....	33
3.4.2	Clasificación taxonómica.....	34
3.4.3	Morfología	34
3.4.4	Condiciones de crecimiento.....	35
3.4.5	Características microscópicas	35
3.4.6	Características macroscópicas	37
3.4.7	Modo de acción de <i>Trichoderma sp.</i> frente a un patógeno.....	37
4.	UBICACIÓN	39
4.1	Ubicación Política Territorial.....	39
4.2	Ubicación Geográfica:	39
4.3	Condiciones agroecológicas.....	40
4.4	Suelos	40
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1	Material experimental	41
5.1.1	Campo.....	41
5.1.2	Laboratorio.....	41
5.2	Métodos.....	42
5.2.1	Diseño experimental	44
6.	MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO	49
6.1	Colección de <i>Trichoderma sp.</i>	49
6.1.1	Fase de campo.....	49
6.1.2	Identificación	51
6.1.3	Colección del hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i>	54
6.1.4	Pruebas de eficacia <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> 55	
6.1.5	Cinética de los microorganismos.....	61
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
7.1	Colección de <i>Trichoderma sp.</i>	62
7.2	Identificación.....	64

7.2.1 Identificación morfológica de la cepa <i>Trichoderma sp.</i> en medio de cultivo PDA.	64
7.2.2 Identificación microscópica de la cepa <i>Trichoderma sp.</i>	65
7.3 Pruebas de eficacia in vitro de <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i>	67
7.3.1 Enfrentamiento dual representado según la Escala de Bell	67
7.3.2 Enfrentamiento dual representado en PIC (porcentaje de inhibición de crecimiento)	69
7.3.3 Antagonismo PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento) por el método de concentraciones C1 (10^{-4}), C2 (10^{-5}) y C3 (10^{-6})	71
7.4 Cinética de crecimiento	75
7.4.1 Día de contacto antagonista-patógeno	77
8. CONCLUSIONES	79
9. RECOMENDACIONES.....	80
10. RESUMEN	81
11. SUMMARY	82
12. BIBLIOGRAFÍA	83
13. ANEXOS	90

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 Porcentaje de antagonismo según la Escala de Bell	43
CUADRO 2 Porcentaje de antagonismo PIC/Tratamiento	44
CUADRO 3 Porcentaje de antagonismo PIC/Tratamiento	45
CUADRO 4 Porcentaje de presencia de <i>Trichoderma sp.</i> por sitio de colección	62
CUADRO 5 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i> por el método dual medido según la Escala de Bell.	67
CUADRO 6 Análisis de varianza DCA para porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> por el método dual	69
CUADRO 7 Prueba de Tukey al 0,5% para porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> por el método dual	70
CUADRO 8 Análisis de varianza DCA para porcentaje de inhibición del crecimiento por el método de concentraciones.	71
CUADRO 9 Prueba de Tukey al 0,5% para sitios de colecta de <i>Trichoderma sp.</i> en el porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i>	71
CUADRO 10 Prueba de Tukey al 0,5% para concentración de conidias de <i>Trichoderma sp.</i> en suspensión	72
CUADRO 11 Prueba de Tukey al 0,5% para la interacción entre sitio de colecta y la concentración de conidios	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 Antagonismo <i>in vitro</i> por el método dual	68
GRÁFICO 2 Concentración de <i>Trichoderma sp.</i> y la influencia en el porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i>	73
GRÁFICO 3 Cinética de crecimiento radial de <i>Trichoderma sp.</i> vs Enfrentamiento dual	75
GRÁFICO 4 Cinética de crecimiento radial de <i>Botrytis cinerea</i> vs Enfrentamientos	76
GRÁFICO 5 Día de contacto del antagonista-patógeno en el enfrentamiento dual y por concentraciones	77

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i>	29
FIGURA 2	<i>Trichoderma sp.</i> colonizando raices	38
FIGURA 3	Mycoparasitismo	38
FIGURA 4	Ubicación geográfica de la Finca Florícola Picasso Roses y Universidad Politécnica Salesiana (laboratorio).	39
FIGURA 5	Método de lectura de las pruebas antagónicas según la Escala de Bell	43
FIGURA 6	Plano de muestreo de suelos Picasso Roses.	48
FIGURA 7	Método de lectura de las pruebas antagónicas según la escala de Bell	58

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA 1	Expresión del patógeno <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de rosas	30
FOTOGRAFÍA 2	<i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i>	38
FOTOGRAFÍA 3	Medición de eficacia de <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i>	57
FOTOGRAFÍA 4	Medición del PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento) de <i>Botrytis cinerea</i> frente a las concentraciones de crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i>	59
FOTOGRAFÍA 5	Cepas de <i>Trichoderma sp.</i> por sitio de colección.	64
FOTOGRAFÍA 6	Identificación de estructuras microscópicas de <i>Trichoderma sp.</i> vistas al microscopio con el lente de 40x	66

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Número de florícolas por tamaños y superficie cultivada según tipo de flores.	90
ANEXO 2 Análisis de suelos	91
ANEXO 3 Toma de muestras de suelo	92
ANEXO 4 Proceso de aislamiento de cepas de <i>Trichoderma sp.</i>	93
ANEXO 5 Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en cajas petri con medio PDA.	94
ANEXO 6 Identificación de <i>Trichoderma sp.</i> por dos técnicas.	95
ANEXO 7 Colección de <i>Botrytis cinerea</i>	96
ANEXO 8 Antagonismo in vitro de <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Botrytis cinerea</i>	97
ANEXO 9 Aplicación de la escala de Bell para los tratamientos duales.	98
ANEXO 10 Crecimiento de <i>Trichoderma sp.</i> en mm/día. y su crecimiento total	99
ANEXO 11 TESTIGO: Crecimiento de la colonia de <i>Botrytis cinerea</i>	99
ANEXO 12 Conteo de conidias de <i>Trichoderma sp.</i> en cámara neubauer.	100

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de rosas en Ecuador acapara el 72% del área plantada de entre los tipos de flores que se siembran en el país, en este contexto el Cantón Pedro Moncayo tiene una importancia primordial en la economía local, ya que es uno de los mayores productores con el 31.9% de hectáreas a nivel de la provincia de Pichincha, en donde la productividad eficiente depende en gran medida de las condiciones de sanidad y manejo que se aplique a la planta.

Uno de los riesgos económicos y con altas pérdidas productivas a nivel de este cultivo son las enfermedades, registrándose como la más delicada en monocultivos extensivos a *Botrytis cinerea* que a través del tiempo se ha implantado y formado parte de las enfermedades más combatidas por crear resistencias y mutaciones que ocasiona el uso prolongado de productos químicos para el control, además, la dependencia, el abuso y mal uso de los agroquímicos está originando trastornos indirectos al ser humano como mutaciones genéticas, problemas de fertilidad y enfermedades neurológicas. (Restrepo, 2011)

En la finca Florícola Picasso Roses, durante los últimos años, la incidencia de *Botrytis cinerea* ha sido alta, es por eso que del total de flor de desecho o nacional que sale a diario, en promedio el 16% de ello es causada por esta enfermedad.

El presente trabajo tiene como finalidad, probar alternativas de control de *Botrytis cinerea*, investigando una de las opciones de control biológico reconocido por sus múltiples beneficios y gran eficacia en cultivos como es el hongo antagonista *Trichoderma sp.* el mismo que es capaz de bajar incidencias del ataque de la enfermedad, aportando beneficios directos para la diversificación de la vida microbiana, acelerando la disponibilidad de nutrientes del suelo a la planta, disminuyendo los impactos ambientales y evitando trastornos de salud al ser humano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Colectar, identificar y realizar pruebas de eficacia *in vitro* de *Trichoderma sp.* en el control biológico de *Botrytis cinerea* del cultivo de rosas.

2.2 Objetivos específicos

- Muestrear, aislar y purificar las cepas de *Trichoderma sp.* de los suelos de la finca florícola Picasso Roses para el control de *Botrytis cinerea*
- Caracterizar la cepa de *Trichoderma sp.* aislada de los suelos de la florícola Picasso Roses para el control de *Botrytis cinerea*
- Evaluar la eficiencia de control de *Botrytis cinerea* con *Trichoderma sp.*

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Cultivo de rosas

La rosa se ha cultivado desde la antigüedad en los jardines de prácticamente todo el mundo en especial en los países de Asia Central y Europa, hoy en día la floricultura en Ecuador ha tomado un lugar muy importante en los sectores económicos del país y actualmente se encuentran en el mercado entre 1000 a 1500 variedades que son el resultado de cruces hereditarios con la rosa híbrida de té. (Aguilera, 2012)

Actualmente las rosas comerciales tienen una diversidad de nombres varietales debido a las cualidades genéticas que poseen, en variedades rojas, las más conocidas son Freedom y Forever young, en blancas Vendela y en bicolor Carrousel, etc. (Acosta, 2012)

3.1.1 Importancia económica

Las flores más vendidas en el mundo en primer lugar son las rosas, ninguna flor ornamental ha sido y es tan estimada como la rosa. A partir de la década de los 90 su liderazgo se ha consolidado debido principalmente a una mejora de las variedades, ampliación de la oferta durante todo el año y a su creciente demanda. (Flores, Leyva, & Mariaka, 2012).

Los principales mercados y destinos de las rosas Ecuatorianas son Europa con el 21%, de donde Alemania es el país que más acoge las flores, Estados Unidos 41% y Rusia 23% y otros países 15%. (Gino, 2012)

Los países Sudamericanos han incrementado en los últimos años su producción, destacando, México, Colombia con cerca de 1000 ha (Flores, Leyva, & Mariaka, 2012) y Ecuador con 2517,2 ha (Gino, 2012).

Además, las rosas al ser un cultivo de demanda progresiva y de cuidados exigentes, tiene como punto principal la vinculación de la mano de obra directa e indirecta,

teniendo a 420 mil personas relacionadas con estas actividades. (Gino, 2012)

3.1.2 Descripción botánica de la rosa

- Raíz: Pivotante cuando es propagada sexualmente y llegan hasta un metro de profundidad, si la propagación es asexual su sistema radicular es proporcional entre el 5 al 10% del peso total de la planta. (Fainstein, 1997)
- Tallo: Leñoso y de una conformación sencilla, brota yemas laterales con una serie de hojas, las cuales al ápice forman flores, el corte de estos volverán a formar tallos florales. (Heussler, 1991)
- Hojas: Compuestas, imparipinadas de color verde oscuro y brillantes, generalmente con tres, cinco o siete folíolos de forma ovalada, con los bordes dentados y con estípulas. (Boffelli, 1991)
- Flores: Hermafrodita, pentámero, de varios pétalos y variados colores, ubicados en la parte apical del tallo sostenidas por el pedúnculo. (Fainstein, 1997)
- Frutos: Son pequeños aquenios envueltos y reducidos en el abultamiento de una baya. (Boffelli, 1991)

3.1.3 Multiplicación

“La propagación de las rosas generalmente usadas a nivel comercial son las estacas injertas de yema y porta injertos para cambio de variedades con mayor demanda”. (Botanicaonline, 2012)

Pueden utilizarse estacas con 1 a 3 yemas, dependiendo de la disponibilidad de material vegetal, son preferibles las de 3 yemas, ya que presentan mayor longitud y más tejido nodal en la base, disminuyendo así las pérdidas debidas a enfermedades. (Botanicaonline, 2012)

Durante el desarrollo deben mantenerse a una humedad promedio del 50% y a una temperatura entre 18 a 21°C. En estas condiciones el enraizamiento tiene lugar a las

5-6 semanas, dependiendo de la época del año y de la naturaleza del vástago”.
(Botanicaonline, 2012)

3.1.4 Requerimientos climáticos

3.1.4.1 Temperatura

Las rosas se adaptan a un amplio espectro de condiciones agroclimáticas variando con una mínima de 15°C durante la noche y una máxima de 28°C durante el día.

Pueden mantenerse valores ligeramente inferiores o superiores durante períodos relativamente cortos sin que se produzcan serios daños, pero una temperatura nocturna continuamente por debajo de 12°C retrasa el crecimiento de la planta, la formación de tallos ciegos y flores con gran número de pétalos deformes. Las temperaturas excesivamente elevadas dañan la producción, aumentan la proliferación de plagas, además los cambios bruscos de temperaturas con humedades relativas altas causan la proliferación de enfermedades como la *Botrytis cinerea*.
(Fainstein, 1997)

3.1.4.2 Iluminación

El índice de crecimiento para la mayoría de los cultivares de rosa sigue la curva total de luz a lo largo del año. Así, en los meses soleados, cuando prevalecen elevadas intensidades luminosas y larga duración del día, la producción de flores es más alta
(Fainstein, 1997)

3.1.4.3 Ventilación

Las rosas requieren una humedad ambiental relativamente elevada por su fisiología y por el control de plagas, la humedad se debe regular mediante la ventilación y la nebulización o el humedecimiento de los pasillos durante las horas más cálidas del día.

La aireación debe regularse, de forma manual o automática, abriendo los laterales y las cumbres, apoyándose en ocasiones con ventiladores interiores o incluso con extractores (de presión o sobrepresión), produciéndose una disminución del grado higrométrico y con él, el control indirecto de ciertas enfermedades como *Botrytis cinerea*. (Fainstein, 1997)

3.1.4.4 Plantación

La distancia de plantación entre planta y planta es de 10cm y 80cm entre hileras una densidad de 8 a 10 plantas/m². (Acosta, 2012)

3.1.5 Fertirrigación

La fertilización se realiza a través de riego por goteo, controlando muchos parámetros como, pH y conductividad eléctrica. (Acosta, 2012)

3.1.6 Formación de la planta

Para la formación de las plantas hay una diversidad de criterios, lo recomendado es dejar que la planta se llene de follaje hasta las 14 semanas de edad, una vez cumplido este tiempo de vida, se debe acamar todos los brotes para inducir el rebrote de basales, estos basales deben ser seleccionados por grosor en número de acuerdo al manejo, a las 12 semanas de edad de los basales se los debe eliminar desde el pedúnculo el botón floral, eliminando semanalmente las yemas que van saliendo del basal hasta una altura de 40cm. De ahí en adelante se dejan crecer 2 brotes que se los llaman portadores iniciales a los primeros y portadores secundarios a los segundos y sobre estos crecen los tallos productivos. Las podas se las realiza con el fin de estructurar a la planta para futuras brotaciones y sanitaria según los procedimientos de manejo técnico. (Acosta, 2012)

3.1.7 Plagas y enfermedades

3.1.7.1 Plagas

- Araña roja (*Tetranychus urticae*)

Ambiente de desarrollo: Temperaturas elevadas y humedad ambiental baja.

Síntomas: Inicialmente las plantas afectadas presentan un punteado o manchas finas blanco-amarillentas en las hojas, posteriormente aparecen telarañas en el envés y finalmente se produce la caída de las hojas.

Diseminación: Son prolíficos y su ciclo puede transcurrir entre 15 a 21 días dependiendo de la temperatura y humedad. (Fainstein, 2003)

- Pulgón verde (*Macrosiphum rosae*)

Ambiente de desarrollo: Seco y no excesivamente caluroso.

Síntomas: Ataca a los brotes de yemas florales, tallos tiernos, hojas jóvenes, produciendo amarillamiento y estancamiento del desarrollo. Estos Áfidos excretan una miel sobre la cual se establecen hongos como la Fumagina.

Diseminación: Son insectos alados, por lo que se diseminan por el vuelo internamente. (Fainstein, 2003)

- Nemátodos (*Meloidogyne sp.*)

Ambiente de desarrollo: Se encuentra en el suelo.

Síntomas: Atacan la parte subterránea provocando frecuentemente agallas sobre las raíces, que posteriormente se pudren.

Diseminación: Por el agua de riego, implementos de trabajo y por movilización de material vegetal infectado. (Fainstein, 2003)

- Trips (*Frankliniella occidentalis*)

Ambiente de desarrollo: Clima cálido con humedades menores al 50% en el ambiente.

Síntomas: El trips se introduce en los botones florales cerrados y se desarrollan entre los pétalos y en los ápices de los vástagos. Esto da lugar a deformaciones en los tejidos de crecimiento.

Diseminación: Las poblaciones adultas se diseminan por el vuelo hacia material vegetal tierno para reproducirse y alimentarse. (Fainstein, 2003)

3.1.7.2 Enfermedades

- Mildiu veloso o tizón (*Peronospora sparsa*)

Ambiente de desarrollo: Se desarrolla favorablemente bajo condiciones de humedades mayores al 50% y temperaturas entre 25 a 30°C. .

Síntomas: Aparición de manchas irregulares de color marrón o púrpura sobre el haz de las hojas, pecíolos y tallos ocasionando una rápida defoliación, en las zonas de crecimiento activo. En el envés de las hojas pueden verse los cuerpos fructíferos del hongo, apareciendo pequeñas áreas con esporas grisáceas.

Diseminación: Como esporangios, transportados por el viento y por trasplante de plántulas enfermas. (Fainstein, 2003)

- Oídio (*Sphaerotheca pannosa*) var. *rosae*.

Ambiente de desarrollo: Humedades edáficas menores al 30%

Síntomas: Manchas blancas y pulverulentas, se manifiestan sobre tejidos tiernos como: brotes, hojas, botón floral y base de las espinas. Las hojas también se deforman apareciendo retorcidas o curvadas.

Diseminación: Por medio de conidios que se diseminan por el viento. (Fainstein, 2003)

- Roya (*Phragmidium rosae*)

Ambiente de desarrollo: Suele aparecer en zonas donde se localiza la humedad y fertilización nitrogenada excesiva. La sequía y la fertilización potásica frenan su desarrollo.

Síntomas: Aparición de pústulas uredospóricas de color naranja en el envés de las hojas.

Diseminación: Las esporas se diseminan por el viento. (Fainstein, 2003)

- Moho gris o *Botrytis (Botrytis cinerea)*

Ambiente de desarrollo: Temperaturas de entre 15 a 20°C y humedad relativa ambiental mayor al 50%.

Síntomas: Aparición de un crecimiento fúngico gris sobre cualquier zona de crecimiento pétalos y tallos por posibles heridas originadas en las operaciones de poda.

Diseminación: Por conidias que son transportadas por el viento. (Fainstein, 2003)

- Agallas o tumores (*Agrobacterium tumefaciens*)

Ambiente de desarrollo: Suelo infectado

Síntomas: Tumores formados en raíces, tronco o ramillas hasta una altura de 50cm sobre el suelo. Acorta la vida de la planta y la calidad de la flor.

Diseminación: Por el agua de riego, plantas asintomáticas y posiblemente por labores culturales. (Fainstein, 2003)

3.1.7.3 Virus

Virus (*Rose Mosaic Virus*) RMV:

Ambiente de desarrollo: Aparece por disturbios nutricionales en la planta.

Síntomas: Líneas cloróticas discontinuas en zig-zag generalmente dispuestas asimétricamente con relación al nervio medio en hojas tiernas. No aparece nunca sobre el total del follaje.

Diseminación: A través de propagación de plantas enfermas y por insectos. (Fainstein, 2003)

3.1.8 Recolección

Se lo realiza a primera hora de la mañana, el punto de corte lo asigna el mercado. Se colocan en mallas plásticas diferenciándose por el mercado con mallas de color verde o azul. (Acosta, 2012)

3.1.9 Postcosecha

Los tallos cortados se van colocando en cubos con solución hidratante, Se sumergen en una solución (Botrycida – insecticida) caliente. Se almacena en una cámara frigorífica a 2 - 4°C para evitar la proliferación de plagas y enfermedades.

En la elaboración de los ramos se realizan actividades como: clasificado según longitudes y puntos de corte de la flor, desespinado, deshojado hasta cierto nivel del tallo, desechando aquellos curvados, deformados y los que tienen botones florales dañados. (Acosta, 2012)

3.1.10 Comercialización

Los despachos de las rosas se realizan en contenedores vía marítima, Hampers (agua) y en seco (cajas), alcanzando los principales puertos Estadounidenses y Europeos. Llegando de esta manera a ser parte de los sentimientos de los clientes. (Acosta, 2012).

3.2 Suelo

El suelo es un sistema vivo y dinámico en donde interaccionan componentes físicos, químicos y biológicos modificados por el clima y la acción de los organismos vivos, capaz de proporcionar los recursos necesarios para el crecimiento de las plantas; este es habitado por una enorme variedad de microorganismos vegetales (microflora del suelo) y animales (micro fauna del suelo) y aun por organismos animales que van desde dimensiones sub-microscópicas a dimensiones medias e inclusive

relativamente grandes (macro fauna). (Morales, 2010)

3.2.1 Fertilidad del suelo

Para que el suelo produzca plantas debe tener ciertas condiciones, que se conocen como fertilidad, que depende de varios factores como:

- La disponibilidad de agua
- El espesor del suelo útil
- La cantidad de materia orgánica presente
- Los organismos vivos del suelo
- La capacidad de almacenar las sustancias nutritivas contenidas en el agua
- La reacción química del suelo o el pH

(Brack & Mendiola, 2012)

3.2.2 Microorganismos del suelo

Los organismos vivos del suelo juegan un rol muy importante en la transformación de la materia orgánica, participando también en los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza (N, P, K, S, Na), mineralización, inmovilización, capacidad de intercambio catiónico, retención de humedad y agregación a través de los exudados microbianos; así mismo, la presencia de microorganismos es indispensable cuando el suelo se contamina, por exceso de pesticidas y fertilizantes químicos. (Brack & Mendiola, 2012)

3.2.3 Microorganismos antagonicos

“Se ha observado que numerosos microorganismos antagonicos prosperan en los suelos, sin embargo, también se ha observado con más frecuencia que la supresión tanto del patógeno, como de la enfermedad, se debe a hongos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporodesmium*”. (Agrios, 1999)

El hongo antagonico más común es *Trichoderma harzianum*, que ha demostrado

que parasita el micelio de *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, inhibe el crecimiento de muchos otros hongos como *Fusarium* y *Fomes*, reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de estos patógenos y sirve como bioestimulante de las plantas. (Agrios, 1999)

3.2.3.1 Mecanismos de acción

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos.

- Parasitismo directo y muerte del patógeno o antibiosis
- Competencia por espacio o por nutrimentos
- Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por sustancias antibióticas liberadas por el antagonista o interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática)
- Efectos tóxicos indirectos por sustancias volátiles como el etileno liberada por las actividades metabólicas del antagonista

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico.

Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción. (Agrios, 1999)

3.2.3.2 Interacción directa con el patógeno

Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo.

El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser

definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, β 1,3 – glucanasa y proteasa, que rompen las paredes celulares de los hongos parasitados. El ejemplo más conocido de hongo hiperparásito son los del género *Trichoderma viride*, *harzianum*, *hamatum* .y han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolsfii*, *Sclerotium cepivorum* y *Botrytis cinerea*. (Agrios, 1999)

3.2.4 Factores que afectan el crecimiento y esporulación de los hongos

3.2.4.1 Temperatura

De acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento, los hongos se pueden clasificar en tres categorías: psicrófilos, mesófilos termófilos. La mayoría de los hongos conocidos son mesófilos y el rango de temperaturas en las que pueden crecer está entre 10°C y 35°C, con un óptimo entre 20°C y 30°C. (Barnett & Hunter, 1998). De acuerdo al rango de temperaturas en las que son capaces de crecer, los hongos mesófilos, se pueden clasificar en psicrotolerantes o termotolerantes, si toleran temperaturas bajas o altas respectivamente. En realidad pocos hongos pueden crecer a 37°C y el límite máximo de temperatura para crecimiento fúngico es alrededor de 65°C. (Sierra & Castro, 2012)

3.2.4.2 Humedad

Muchas especies de hongos imperfectos no pueden crecer o germinar sus esporas sin agua o un ambiente saturado, lo óptimo está entre 30% y 80%. (Barnett & Hunter, 1998)

Botrytis cinerea por ejemplo, si no tiene condiciones de humedad, la obtiene de la descomposición de las células vegetales. (Barnett & Hunter, 1998)

3.2.4.3 Luz

Durante la etapa de colonización del sustrato se debe trabajar bajo completa oscuridad, sin embargo, durante la fructificación es necesario alternar los períodos de luz y oscuridad a pesar de no ser fotosintéticas (Barnett & Hunter, 1998).

No obstante, cuando los cultivos fúngicos reciben iluminación unilateral, los conidióforos crecen hacia la luz blanca, con independencia de la posición de inicio, al igual que su esporulación es abundante. (Barnett & Hunter, 1998)

La luz ultravioleta en cambio afectan la esporulación fúngica ya que tienen un efecto inhibitorio, aunque, de manera muy diferente entre los diferentes organismos. (Barnett & Hunter, 1998)

3.2.4.4 Carbohidratos

Todos los hongos son incapaces de reducir los hidratos de carbono a través de la radiación y si este se encuentra en abundancia, hay inhibición en el crecimiento de la parte fructífera. (Chuc, 2010)

3.2.4.5 Concentración de iones hidrógeno (pH)

La mayoría de los hongos crecen óptimamente cuando el sustrato es ligeramente ácido entre pH 5,0 y 6,0. Sin embargo, generalmente se logra un buen crecimiento en un rango mucho más amplio, de aproximadamente pH 3,0 a 8,0. Ciertas especies son capaces de tolerar rangos aún mayores: *Botrytis cinerea* por ejemplo tolera un pH de 2,8 a 7,4 (Barnett & Hunter, 1998)

3.2.4.6 Fuentes de oxígeno, carbono y nitrógeno

Como la mayoría de los hongos son organismos aerobios, su respiración se produce cuando existe presencia de oxígeno. (Barnett & Hunter, 1998)

Los hongos necesitan el carbono en mayor cantidad que cualquier otro nutriente, sin embargo, una fuente de nitrógeno también debe ser proporcionado. En la naturaleza la mayoría de Deuteromycetes poseen en su genética síntesis de enzimas para utilizar el carbón, entre estas fuentes la celulosa es la más utilizada.

Los hongos imperfectos como fuente de nitrógeno utilizan nitrato, amonio y aminoácidos como fuentes de nitrógeno. (Barnett & Hunter, 1998)

3.3 Patógeno *Botrytis cinerea*

3.3.1 Clasificación taxonómica

Reino:	Mycetae
Subdivisión 4:	DEUTEROMYCOTINA
Clase 2:	HYPHOMYCETES
Orden:	Hyphales (Moniliales)
Géneros:	<i>Botrytis</i>
Especie:	<i>Botrytis cinerea</i>

Fuente. (Agrios, 1999)

3.3.2 Generalidades morfológicas

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno muy extendido como parásito facultativo y polífago actúa como saprófito en tejidos necróticos o en descomposición o también como parásito en tejidos suculentos o tiernos, se encuentra distribuida a nivel mundial. (Agrios, 1999)

El hongo causante del moho gris. *B. cinerea* es un hifomiceto que produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios multinucleados, heterocaríoticos, hialinos o levemente coloreados, unicelulares, ovoides o esféricos, sobre pequeños esterigmas en el extremo de conidióforos ramificados que aparecen

como una masa grisácea. (Agrios, 1999)

El patógeno posee hifas septadas ramificadas y forma una variedad de estructuras de penetración, incluyendo apresorios, con los cuales invade la epidermis del tejido vegetal (Salinas, 1986), son de fácil liberación cuando el clima es húmedo y se diseminan por el viento; a menudo produce esclerocios irregulares planos, duros y de color negro. El telemorfo para *Botrytis cinerea* es *Botryotinia fuckeliana* forman apotecios en esclerocios. (Agrios, 1999)

Se ha reportado que las conidias germinan a una humedad relativa de más de un 90% y a un rango de temperatura entre 1 a 30°C, con un óptimo entre 18 y 23°C. para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas produciendo la infección. *Botrytis cinerea* inverna en el suelo en forma de esclerocios, estos son negros, duros, irregulares en tamaño y forma, y de 1-15 mm de longitud, germinan produciendo filamento miceliales e infectan directamente a los tejidos del hospedante. Esta flexibilidad extrema conlleva a que un cierto nivel de inóculo exista en casi todas partes y a que la extensión epidemiológica de la enfermedad pueda ser inhibida sólo cuando prevalecen condiciones secas. (Agrios, 1999)

Las especies del género *Botrytis* producen esclerocios, que actúan como estructuras de resistencia para proteger al patógeno de condiciones climáticas desfavorables o adversas. (Zolezzi, Fariños, Gonzales, & Rojas, 2010)

3.3.3 Ciclo de vida (Fonseca, 1993)

- a. Ocurre la adherencia de las conidias a la superficie vegetal.
- b. Comienza el proceso de germinación, en el que las conidias dormantes producen el tubo germinativo, el cual al entrar en contacto con el tejido hospedero forma la hifa de infección.
- c. Los tubos germinativos penetran el tejido de la planta hospedera generalmente a través de heridas o por aperturas naturales (estomas y/o lenticelas). (Jarvis, 1977) Sin embargo, al ser un microorganismo necrotrófico, este patógeno además es capaz de inducir la muerte de la célula

vegetal para facilitar la colonización del tejido hospedero mediante la secreción de enzimas hidrolíticas.

- d. Se produce la invasión de las células adyacentes hasta abarcar la totalidad del tejido.

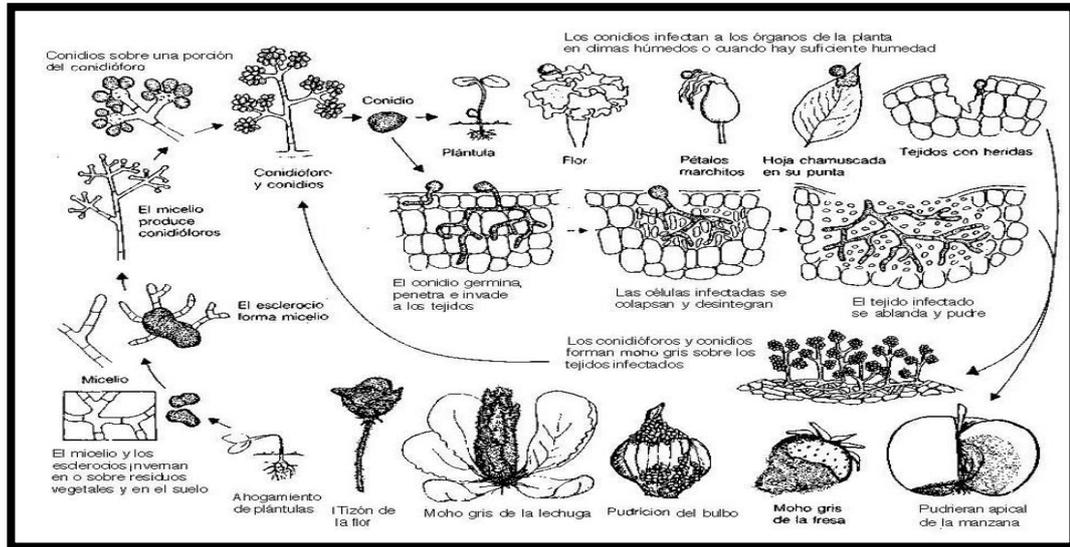
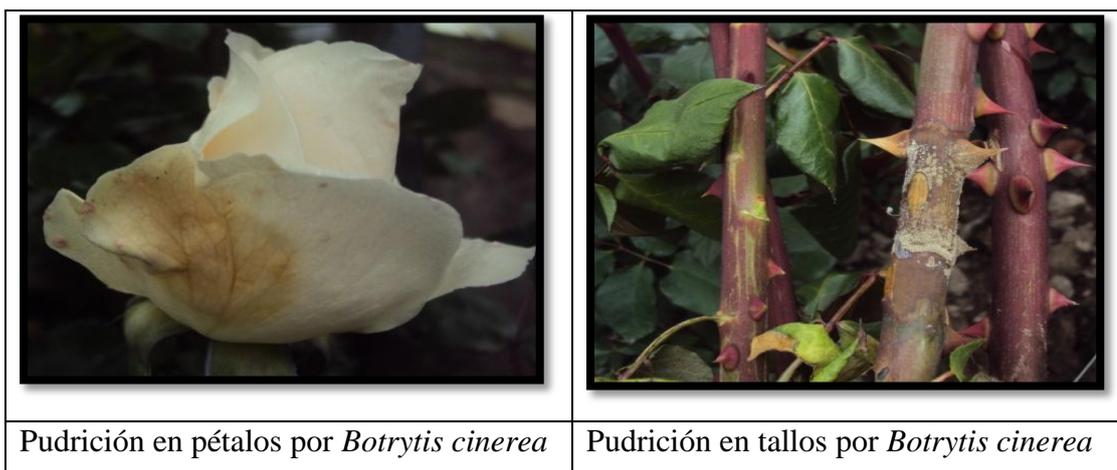


FIGURA 1 Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*

Fuente: (Agrios, 1999)

3.3.4 Síntomas de *Botrytis cinerea*

Pudrición en pétalos y tallos, marchitez del tejido, pústulas, manchas foliares, caída de plántulas, canchales en los tallos, y tizones en inflorescencia. *B. cinerea* produce un micelio blanquecino y de aspecto lanoso en el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación, lo que puede ocurrir dentro de unos pocos días luego de que la infección se ha iniciado, debido a esto, las enfermedades causadas por este hongo son comúnmente denominadas “pudrición gris”(Agrios, 1999). En la fotografía 1, se muestran algunos de los síntomas y signos causados por *Botrytis cinerea*.



FOTOGRAFÍA 1 Expresión del patógeno *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas

Realizado por: (Caiza, 2012)

3.3.5 Control fitosanitario de *Botrytis cinerea*

3.3.5.1 Control químico sintético

Es el método tradicional en grandes extensiones de cultivos como las rosas, ayudan a proteger a las plantas contra el inoculo y a curar una infección que ya está en desarrollo.

Durante los últimos 50 años el control de este patógeno se ha basado fundamentalmente en el uso de fungicidas químicos sintéticos (Rosslembroich & Stuebler, 2000) siendo los más comúnmente usados, Benzimidazol (División celular), Dicarboximida (Síntesis de lípidos) (Flores, Latorre, & Roco, 1994) Sulfamidas (Multisitio), Carboximidazoles (Respiración) con poco éxito especialmente en climas húmedos y fríos.

Los usos y aplicaciones constantes con estos productos para combatir a la enfermedad *Botrytis cinerea* ya ha causado resistencia y para esto cada vez se va creando fórmulas químicas más severas que nos afecta a la salud al estar en contacto directo con el ambiente infectado.

Actualmente, el uso de varios agroquímicos sintéticos se ha restringido y está siendo regulado gubernamentalmente.

3.3.5.2 Control cultural y mecánico

Es un método que sirve para evitar que las plantas entren en contacto con el patógeno causante de la enfermedad, permitiendo erradicar ó disminuir las incidencias en el suelo y la planta, así mismo, este control se logra mediante actividades como: (Bustos, 2010)

- Reducir la HR, mediante ventilación de invernaderos, cambio de frecuencias y caudales de riego.
- Limpieza en el campo de hojas secas, tocones y flor abierta.
- En variedades muy susceptibles usar fundas de papel para cubrir los botones en campo durante su desarrollo. (Quishpe, 2010)
- Desalojar la basura diariamente
- Barrido de los bloques semanal
- Arreglo de goteras en los invernaderos.

3.3.5.3 Control biológico.

Es un método que conjuntamente con prácticas culturales, ayudan a mejorar la resistencia del hospedante, a la vez, favorecen el desarrollo de micro-organismos que aportan a la nutrición de la planta. (Baker & Cook, 1982).

Para el control biológico de moho *Botrytis cinerea* se han descrito diversas clases de hongos, bacterias y levaduras, entre estos se encuentran: *Gliocladium* que en un ensayo realizado por (Berto, Haissam, & Lepoivre, 2001) resultó reducir la esporulación de *Botrytis cinerea* en hojas de fresa previamente asperjadas con el patógeno, *Cladosporium*, en un estudio realizado por Eden et al 1996, obtuvo en tallos de tomate, reducción de hasta el 100% de infección, *Bacillus*, (Guizzardy, Brunelli, & Folchi, 1996), identificó 13 cepas de *Bacillus amyloliquefasciens* que

presentaron actividad en contra de (*B cinerea*), experimentó en frutos de tomate en almacenamiento, reduciéndose la infestación en un 50% menos, con efectividad de 7 días.

Uno de los microorganismos más estudiados y que ha causado mayores resultados en controles de patógenos es del género *Trichoderma sp*, Según Zimand et al. (1996) *Trichoderma harzianum* inhibe la germinación de los conidios y la elongación del tubo germinativo de *Botrytis cinerea*, utilizando como principal mecanismo la competencia por nutrientes y espacio, y en menor proporción secreción de enzimas que degradan la pared celular. Silva et al. (2001) describe también a este microorganismo como fungicida y fungistático.

Otro tipo de control biológico también se le denomina a que algunas plantas contienen principios activos fúngicos o antimicrobianos como el realizado por (Ribera, 2007) con *Quillaja saponaria* mol, para el control de *Botrytis cinerea*.

La actividad antimicrobial, como mecanismo de defensa de las plantas es producir metabolitos secundarios. (Rice, 1987)

Estos compuestos antimicrobiales preformados, denominados “fitoanticipinas”, están presentes constitutivamente en plantas sanas y presentan barreras químicas a la infección de potenciales patógenos (Morrissey & Osbourn, 1999). Tales metabolitos son secuestrados en vacuolas u organelos de tejido sano, principalmente a nivel de células epidérmicas (Grayer & Harborne, 1994), ya sea en sus formas biológicamente activas o como precursores inactivos, los cuales pueden ser rápidamente liberados y/o activados en respuesta al ataque fúngico (Melton et al (Morrissey & Osbourn, 1999) (Dixon, 1991)

Entre las fitoanticipinas tenemos: Flavonoides, isoflavonoides, diterpenos, saponinas, glucósidos cianogénicos, ácidos hidroxámicos. (Morrissey & Osbourn, 1999)

Las “fitoalexinas” en cambio, son metabolitos antimicrobiales inducidos, no se encuentran presentes en el tejido sano (Vann Etten, Sandrock, Wasmann, Soby,

McCluskey, & Wang., 1995), siendo sintetizado en respuesta al ataque por patógenos o condiciones de estrés (Morrissey & Osbourn, 1999) (Dixon, 1991)

Mecanismos de acción de las fitoalexinas y fitoanticipinas:

Producen, ruptura de la membrana plasmática, lisis de la pared celular y daño en el citoesqueleto (Jeandet, Douillet, Bessis, Debord, Sbaghi, & Adrian, 2002), inactivación e inhibición en la síntesis de proteínas (Bar-Nun, Tal Lev, Harel, & Mayer, 1988), inhibición de la síntesis de lípidos, ácidos grasos y ergosterol (Ramírez-Chavez, Lucas-Valdés, Virgen-Calleros, & Molina-Torres, 2000), alteración en el proceso de respiración celular (Lambers, Chapin, & Pons, 2000), inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Izahaki, 2002) y alteraciones a nivel del ADN (Domingo & López-Brea, 2003).

3.4 Antagonista *Trichoderma sp.*

3.4.1 Generalidades

Trichoderma sp. es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios.

Pertenece a la subdivisión Deuteromycetes que se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, entre ellos los más estudiados por su eficacia se encuentran (*viride*, *harzianum*, *koningii*, *hamatum*, *polysporum*, *pseudokoningii*, *aureoviride*, *longibrachiatum*, *piluliferum*) (Castro, 2007) todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente aquellos que son atacados por otros hongos (Páez, 2012).

3.4.2 Clasificación taxonómica

División 1	MIXOMICOTINA
Subdivisión 4	DEUTEROMYCOTINA
Clase 2	HYPHOMYCETES
Orden	<i>Hyphales</i> (Moniliales)
Familia	<i>Monilacae</i>
Géneros	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>Trichoderma sp.</i>

Fuente. (Agrios, 1999)

3.4.3 Morfología

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

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

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

Las cepas de *Trichoderma* a menudo son rápidamente identificadas en su género por sus características morfológicas distintivas, que incluye rápido crecimiento, el color

de las conidias es verde intenso o blanco y una gran cantidad de ramificaciones, pero de manera diferente una pobre estructura de conidioforos (Gams & Bissett, 1998).

3.4.4 Condiciones de crecimiento

Es un hongo de distribución cosmopolita muy común en suelos, aunque también se encuentra en el agua, crece muy bien en temperaturas que oscilan entre 20°C y 28 °C; se puede obtener un crecimiento dentro de un rango de pH de 2,5 a 9,5, pero preferiblemente se desarrolla a un pH neutro o ácido (5,5). Cuando se encuentra en sitios de buena luz esporula rápidamente y en la obscuridad pierde paulatinamente esta capacidad. Es capaz de utilizar un amplio espectro de fuentes de CO₂ y N y su resistencia a inhibidores microbianos le permiten colonizar casi todos los tipos de suelo, inclusive ácidos y ricos en M.O (Benítez & González, 2003).

Trichoderma es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la diversidad de enzimas que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio citado por (Cholango, 2009)

Adicionalmente, se ha demostrado que la adición de nitrógeno en forma de sulfato de amonio al medio estimula e incrementa el crecimiento de este hongo, mientras que la adición de nitrógeno como nitrato de calcio genera un efecto supresivo en el crecimiento de *Trichoderma koningii*. citado por (Cholango, 2009).

3.4.5 Características microscópicas

Las características microscópicas por las que se identifica a *Trichoderma sp.* son: (Gams & Bissett, 1998).

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

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

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

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

3.4.6 Características macroscópicas

Trichoderma harzianum posee colonias de rápido crecimiento en PDA, 7-9 cm diámetro después de 3 días, micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o claramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8mm en diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas. (Claro, 2006).

Pocos aislados producen abundantes cristales amarillos. Exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso (Claro, 2006).

3.4.7 Modo de acción de *Trichoderma sp.* frente a un patógeno

En el suelo, el *Trichoderma* se multiplica y coloniza las raíces de las plantas, frente a un patógeno, actúa rompiendo las paredes hifales del hongo parásito mediante la enzima de tipo lítico (Blandón, 2007) y endoquitinasa que causan la destrucción de las paredes celulares y de resistencia del hongo, aprovechando los nutrientes de éste y matándolo, además, el antagonista *Trichoderma* compite por la dominancia de la zona radicular de los cultivos y paralelamente produce toxinas (trichodermin y harzianopiridona) evitando el desarrollo de otros hongos alrededor de la rizosfera, En este proceso se producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan el desarrollo vegetal. (Todorquidea, 2012)

Método de acción (Agrios, 1999)

- Competencia: Compite por sustrato en la rizosfera y filosfera con los patógenos de las plantas. (Ver fotografía 2)
- Antibiosis: Produce una gran cantidad de antibióticos que son fungotóxicos.

- Inducción a resistencia: Al instalarse en las raíces y hojas induce a la planta a producir fitoalexinas que le dan resistencia a las plantas al ataque de hongos patógenos.
- Simbiótico. Ayuda a la proliferación de micorrizas y bacterias fijadoras de nitrógeno, con lo que la planta requiere hasta un 20% menos de nutrientes químicos. (Ver figura 2)
- Mycoparasitismo: *Trichoderma sp.* es capaz de parasitar micelios de hongos. (Ver figura 3)



FOTOGRAFÍA 2 *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea*

Fuente: La investigación.

Realizado por: (Caiza, 2012)



FIGURA 2 *Trichoderma sp.* colonizando raíces

Fuente: (Obregón, 2007)

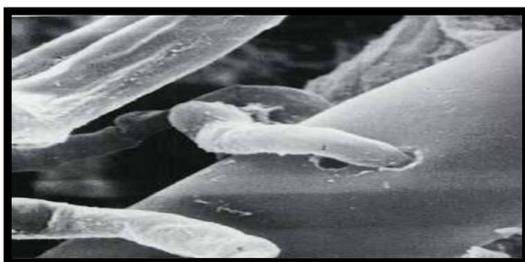


FIGURA 3 Mycoparasitismo

Fuente: (Obregón, 2007)

4. UBICACIÓN

4.1 Ubicación Política Territorial

País:	Ecuador
Provincia:	Pichincha
Cantón:	Pedro Moncayo
Parroquia:	Tabacundo
Comunidad:	Tupigachi
Lugar:	Rosas de los Andes S/N
Empresa:	Picasso Roses

4.2 Ubicación Geográfica:

Altitud:	2894 m.s.n.m.
Longitud:	78°13'53"N
Latitud:	0°02'2" W

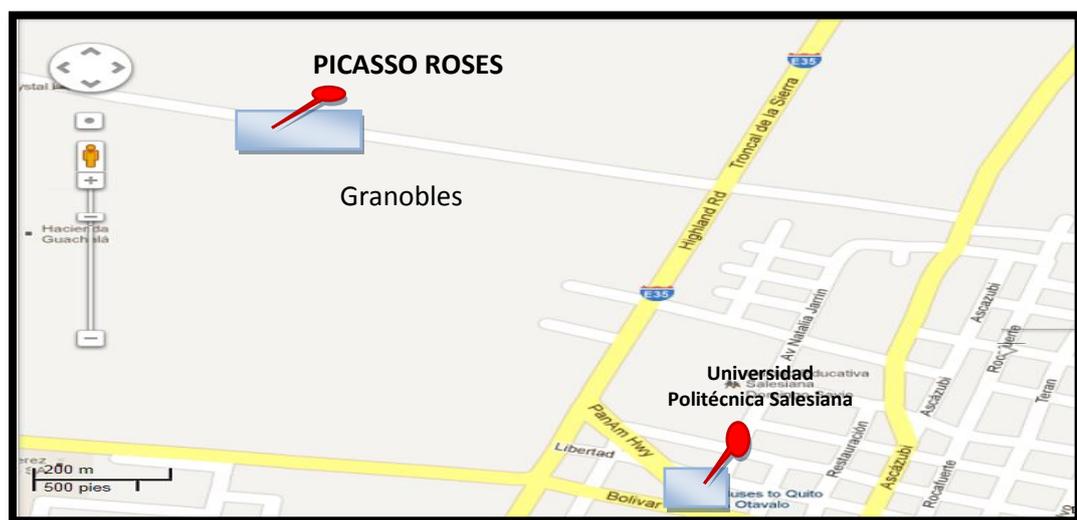


FIGURA 4 Ubicación geográfica de la Finca Florícola Picasso Roses y Universidad Politécnica Salesiana (laboratorio).

Fuente: (Google, 2012)

4.3 Condiciones agroecológicas

Clima:	16° C
Precipitación:	42.22 mm
Heliofonía:	181,7h/sol/mes
Vientos:	40.99 km/h NNE

Fuente: (Picasso Roses, 2012)

4.4 Suelos

Características Físico-químico:

pH:	5.5 a 6.8
Conductividad:	0.2 a 0.4dS/m
Materia orgánica:	2.6 a 7,5%
Textura:	Franco a franco arenoso
C.I.C.	11.5 a 34.2cmol/kg

Fuente: Laboratorio de suelos y agua UPS, 2012

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material experimental

5.1.1 Campo

- GPS
- Palas
- Azadón
- Cinta métrica
- Fundas plásticas polifán
- Etiquetas
- Marcador permanente

5.1.2 Laboratorio

- Medio PDA
- Suelo
- Ácido tartárico
- Jeringuillas
- Guantes quirúrgicos
- Cuaderno de campo
- Computadora
- Cámara fotográfica
- Laboratorio
- Balanza analítica
- Microscopio
- Autoclave
- Cámara de flujo
- Refrigerador
- Cooler
- Estufa
- Cajas Petri de plástico

- Tubos de ensayo de vidrio
- Asas de inoculación
- Agua destilada
- Agua

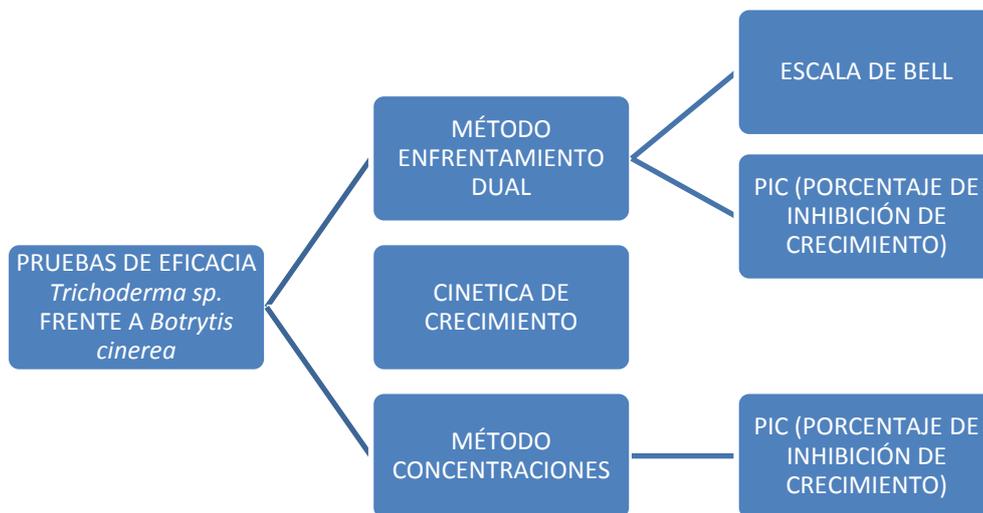
5.2 Métodos

➤ Fase de campo

La toma de muestras se realizó en cuatro sitios dentro de la finca florícola Picasso Roses.

➤ Fase de laboratorio

- Colección
- Identificación
- Pruebas de eficacia *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea*
 - Método por enfrentamiento dual
 - Método por concentraciones



Escala de Bell

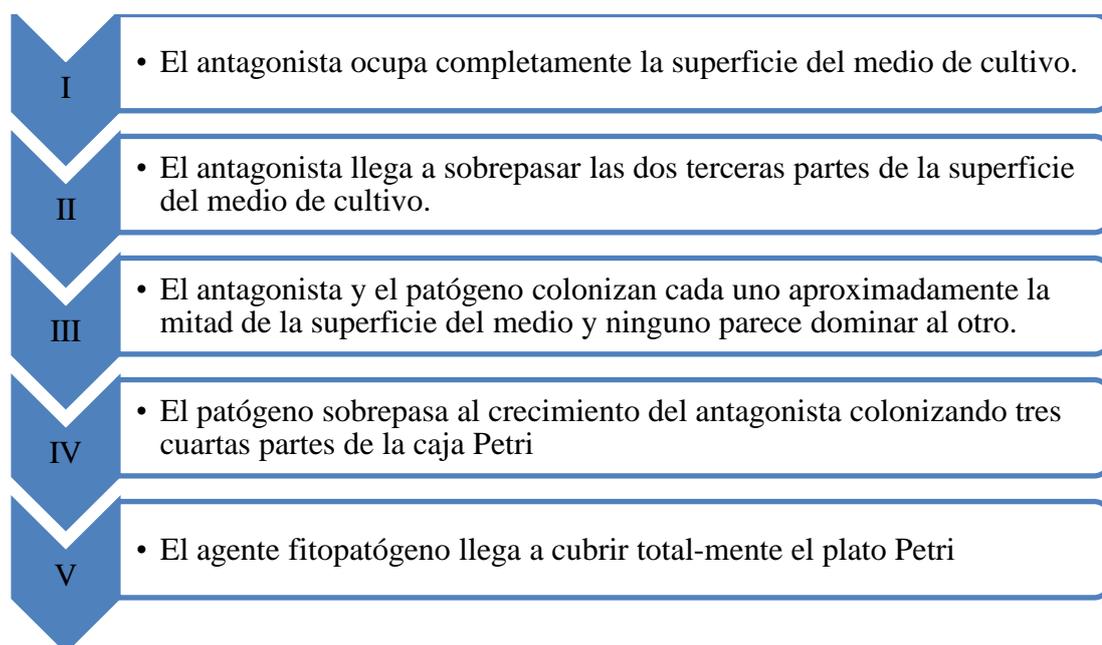


FIGURA 5 Método de lectura de las pruebas antagonicas según la Escala de Bell

Fuente: (Bell, 1982)

CUADRO 1 Porcentaje de antagonismo según la Escala de Bell

TRATAMIENTO	ESCALA DE BELL	% DE ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma sp.</i>
T-SITIO 1	I	
	II	
	III	
	IV	
T-SITIO 2	I	
	II	
	III	
	IV	
T-SITIO 3	I	
	II	
	III	
	IV	
T-SITIO 4	I	
	II	
	III	
	IV	

Fuente :La investigación

Elaborado por: (Caiza, 2012)

5.2.1 Diseño experimental

Método por enfrentamiento dual: Se utilizó un diseño completamente al azar DCA con cuatro tratamientos (sitios de colecta) y diez repeticiones, y se comparó con un testigo absoluto (Caja petri con cultivo de *Botrytis cinerea*) de diez repeticiones.

Método por concentraciones: Se utilizó un diseño completamente al azar DCA con arreglo factorial 4x3 y diez repeticiones por tratamiento en comparación con un testigo absoluto (Caja petri con cultivo de *Botrytis cinerea*) de diez repeticiones.

5.2.1.1 Tratamientos

Método por enfrentamiento dual:

T-Sitio 1: *Trichoderma sp.* del sitio uno.

T-Sitio 2: *Trichoderma sp.* del sitio dos.

T-Sitio 3: *Trichoderma sp.* del sitio tres.

T-Sitio 4: *Trichoderma sp.* del sitio cuatro.

CUADRO 2 Porcentaje de antagonismo PIC/Tratamiento

PORCENTAJE DE ANTAGONISMO DE <i>Botrytis cinerea</i> CON <i>Trichoderma sp.</i> ENFRENTAMIENTO DUAL			
TRATAMIENTO	CRECIMIENTO DE BOTRYTIS ENFRENTAMIENTO DUAL mm	PIC (Porcentaje de inhibición del crecimiento)	PROMEDIO PIC /Tratamiento
T-SITIO 1			
T-SITIO 2			
T-SITIO 3			
T-SITIO 4			

Fuente: La investigación

Elaborado por: (Caiza, 2012)

Método por concentraciones:

CUADRO 3 Porcentaje de antagonismo PIC/Tratamiento

PORCENTAJE DE ANTAGONISMO DE <i>Botrytis cinerea</i> CON <i>Trichoderma sp.</i> MÉTODO CONCENTRACIONES				
TRATAMIENTO		CRECIMIENTO DE BOTRYTIS MÉTODO CONCENTRACIONES mm	PIC (Porcentaje de inhibición del crecimiento)	PROMEDIO PIC /Tratamiento
SITIO 1	C1			
	C2			
	C3			
SITIO 2	C1			
	C2			
	C3			
SITIO 3	C1			
	C2			
	C3			
SITIO 4	C1			
	C2			
	C3			

Fuente: La investigación

Elaborado por (Caiza, 2012)

5.2.1.2 Unidad experimental

Método por enfrentamiento dual: Una caja de petri con el antagonista-patógeno en enfrentamiento cultivado en medio PDA

Método por concentraciones: Una caja de petri con el cultivo antagonista-patógeno en diferentes concentraciones de *Trichoderma sp.* en medio PDA

Testigo

Una caja de petri con el cultivo *Botrytis cinerea* en medio PDA

5.2.1.3 Variables y métodos de evaluación

Cada variable fue evaluada en el laboratorio.

- Porcentaje de control de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de *Trichoderma sp.*
- Tiempo de crecimiento o inhibición del *Trichoderma sp.*
- Tiempo de la cinética del microorganismo

➤ MÉTODO DUAL: Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)

Para evaluar la eficacia de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea* se midió el crecimiento radial del patógeno como testigo y el patógeno como tratamiento cada 24 horas durante 8 días.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) se calculó mediante la fórmula utilizada por (Skidmore & Dickinson, 1976). Esto se realizó para los 4 tratamientos de *Trichoderma sp.* en estudio.

$$\text{PIC} = [(C1 - C2) / C1] \times 100.$$

Donde:

C1= Es el crecimiento radial del testigo (fitopatógeno sin antagonista)

C2= El crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos

Unidad de medida

% de inhibición antagonista-patógeno

➤ **MÉTODO CONCENTRACIONES: porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC)**

Para evaluar la eficacia de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea* se midió el crecimiento radial del patógeno como testigo y el patógeno como tratamiento cada 24 horas durante 8 días.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) se calculó mediante la fórmula utilizada por (Skidmore & Dickinson, 1976). Esto se realizó para los 4 tratamientos de *Trichoderma sp.* en estudio.

$$\text{PIC} = [(C1 - C2) / C1] \times 100.$$

Donde:

C1= Es el crecimiento radial del testigo (fitopatógeno sin antagonista)

C2= El crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos

Unidad de medida

% de inhibición antagonista-patógeno

5.2.1.4 Pruebas de significancia

Los resultados de PIC y crecimiento radial se analizaron mediante un (ADEVA) y la prueba de Tukey al 0.5% para determinar diferencias significativas entre tratamientos.

5.2.1.5 Croquis del experimento

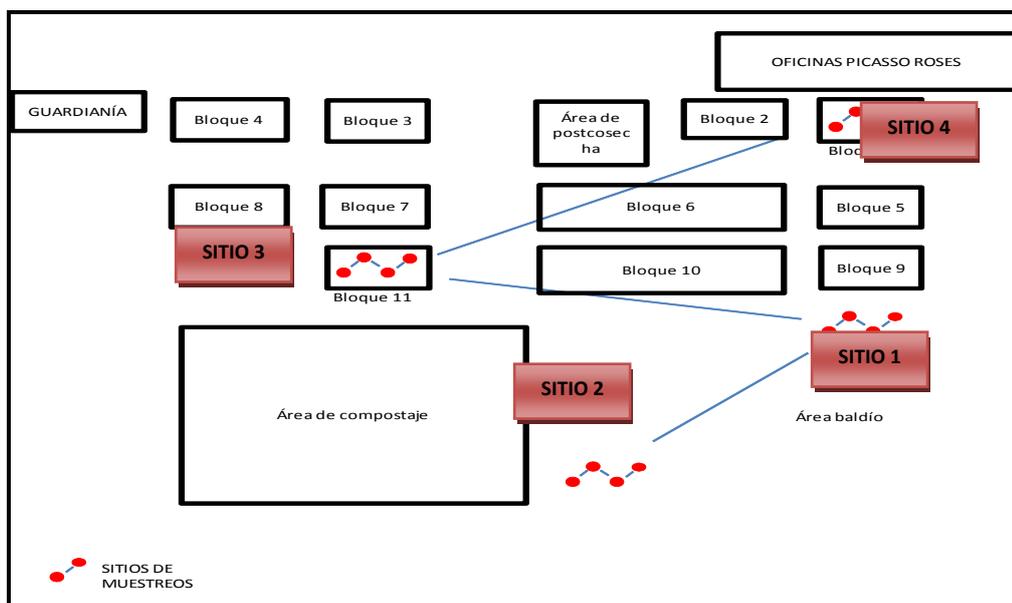


FIGURA 6 Plano de muestreo de suelos Picasso Roses.

Realizado por: (Caiza, 2012)

Sitio 1: Suelo de un área baldío.

Sitio 2: Suelo de un área de compostaje.

Sitio 3: Suelo de un área con plantas de patrones de rosas recién plantadas bajo invernadero.

Sitio 4: Suelo de 5 años de cultivo de rosas con la variedad más susceptible a la enfermedad *Botrytis cinerea*.

6. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

6.1 Colección de *Trichoderma sp.*

6.1.1 Fase de campo

- Determinación de puntos de muestreo en el área de estudio

Se delimitó cuatro puntos de muestreo de los suelos, dentro de la Finca Florícola Picasso Roses, (Ver Figura. 6).

Con la ayuda del barreno y azadón se procedió a tomar las muestras para el análisis respectivo en el laboratorio.

- Muestreo de suelos

En los puntos seleccionados, se limpió la superficie y se procedió a tomar las muestras de suelo con la ayuda de un azadón y barreno a una profundidad entre 10 a 20 cm de profundidad desde la superficie. Se tomaron un total de cuatro muestras de 500 gramos por punto muestreado, las mismas fueron colocadas en fundas polifán, debidamente etiquetadas y clasificadas.

- Transporte de las muestras

Las muestras de suelos etiquetadas por sitio de colecta fueron transportadas en un *cooler* para su conservación, las mismas que fueron llevadas al laboratorio de suelos y aguas de la Universidad Politécnica Salesiana – Cayambe para la realización de los análisis correspondientes según las descripciones de la investigación.

6.1.1.1 Fase de laboratorio

En la fase de laboratorio se utilizó las muestras de suelo recolectadas en la Finca Florícola Picasso Roses.

➤ Preparación de medios

El medio que se utilizó para la siembra del suelo fue un producto comercial PDA (Difco™ Potato Dextrose Agar), se pesaron 19.5g, se añadió 500ml de agua destilada, se auto-clavó durante 45 minutos a 15 PSI. Una vez terminado el proceso de esterilización se colocó 7ml de ácido tartárico al 10% en el medio para obtener un pH de solución de 4, se agitó y se colocó aproximadamente 25ml en las cajas Petri plásticas correspondientes para el ensayo.

➤ Diluciones

- Se pesó 10g de muestra de suelo por cada sitio recolectado y se añadió esta cantidad a un Erlenmeyer que contuvo 90 ml de agua destilada, siendo rotulada como la solución madre.
- Se agitó adecuadamente por 10 minutos.
- Se pasó 20ml de esta solución madre a un tubo de ensayo, uno por cada sitio de recolección.
- Se llenaron 24 tubos de ensayo con 18 ml de agua destilada y se los esterilizó y etiquetó adecuadamente.
- De la preparación anterior se tomó 2 ml y se lo colocó en el primer tubo de ensayo.
- Se cerró y se agitó, de esta manera se obtuvo la dilución 10^{-1} .
- Se tomó 2 ml de la dilución de 10^{-1} y se colocó en el siguiente tubo de ensayo, obteniéndose así, la dilución 10^{-2} .
- Se repitió este procedimiento hasta obtener la dilución 10^{-6} .
- Este procedimiento se aplicó para las muestras de suelo de los 4 sitios de recolección.

- Siembra de superficie en caja petri
 - Se tomó 1 ml de la solución de los tubos de ensayo que contenían las diferentes diluciones y se colocó el contenido en la caja petri con medio PDA previamente puesto en la misma.
 - Con un asa digralski se diseminó la solución por toda la caja uniformemente.
 - Se selló las cajas con cinta para film para evitar contaminación, y se llevó a incubación por 7 días.
 - Se sembraron 3 cajas de cada dilución.

- Aislamiento y purificación
 - Con la ayuda de un asa estéril se tomó una muestra de cada hongo crecido en la solución madre y de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}
 - Se sembró cada muestra en medio PDA, preparado previamente.
 - Se esterilizó el asa, para cada siembra.
 - Se incubaron las cajas por 8 días a una temperatura de 25°C con una humedad relativa de 50% durante las 24 horas.
 - Luego del tiempo de incubación se seleccionaron cultivos de hongos de color verde característica visible del género *Trichoderma* (Rodríguez, 2002).
 - De cada colonia identificada como *Trichoderma*, se extrajo cuidadosamente una pequeña porción y se sembró en cajas petri que contenían PDA, este procedimiento se repitió por 3 ocasiones cada 8 días hasta obtener cepas puras.

6.1.2 Identificación

6.1.2.1 Clave de identificación de características microscópicas de *Trichoderma sp.*

Para la identificación microscópica de *Trichoderma* se siguió la descripción sugerida por (Barnett & Hunter, 1998), de la siguiente manera:

El *Trichoderma* tiene conidióforos hialinos y muy ramificados, fiálides solos o en grupos, conidios (phialospores) hialinas, unicelulares y ovoides que se presentan en pequeños racimos terminales, por lo general fácilmente reconocido por su rápido crecimiento y conidios verdes; es muy común encontrarlos como saprofitas en el suelo o en la madera, *T. viride*, muestra grandes conidióforos y extensa ramificación, las fiálides producen conidios, y son reportadas como parásitos de otros hongos.

Los cultivos de la cepa *Trichoderma harzianum* según (Kubicek & Harman, 1998), que crecen en papa dextrosa agar presentan áreas blancas en donde no contienen esporas, mientras que las zonas verdes se cubren con densas masas de esporas (conidios).

6.1.2.2 Técnicas para la identificación de hongos en laboratorio

A. Técnica de M. Scotch

- En un portaobjetos limpio se colocó una gota de azul de metileno.
- Se colocó un pedazo de cinta adhesiva encima del cultivo sembrado. Se retiró con cuidado el adhesivo.
- Se colocó el pedazo de cinta scotch sobre la placa preparada con la gota de azul de metileno.
- Se pegó bien y se observó al microscopio con lentes 4X, 10X, 40X.
- Una vez identificadas al microscopio las estructuras de las colonias de cada muestra, estas fueron comparadas con ilustraciones presentes en la bibliografía de (Barnett & Hunter, 1998).

B. Técnica de Micro cultivo

- Dentro de una caja petri se colocaron 2 portaobjetos apilados.
- Se cortó en cubos de 1cm³ de agar utilizando una paleta de acero y se lo colocó sobre el segundo portaobjeto de la pila.

- Con un asa estéril se tomó una muestra de tejido de la cepa pura, se sembró a los lados y sobre el cubo de agar, esto se realizó para los 4 aislados.
- Se colocó un cubreobjetos en la parte superior del cubo de agar, se presionó con cuidado.
- Se vertió 2 ml de agua destilada en la caja petri, sin alcanzar el cubo con medio PDA inoculado.
- Se tapó y se llevó a incubación por 4 días.
- Después de 4 días se observó al microscopio, con lentes 4X, 10X, y 40X, colocando el cubreobjetos en un portaobjetos con una gota de azul de metileno.
- Una vez identificadas al microscopio las estructuras de las colonias de cada muestra, estas fueron comparadas con ilustraciones presentes en la bibliografía de (Barnett & Hunter, 1998).

C. Técnicas de descripción de colonias

Se observó las colonias tomando en cuenta las siguientes características:

En la superficie y al reverso se tomó en cuenta: Forma, Color, Textura, Topografía y Crecimiento.

D. Descripción de características morfológicas

Las observaciones se realizaron con la ayuda del microscopio con los lentes 4X, 10X y 40X. Se examinó y determinó las características morfológicas, como: Tipo de hifa, micelio, conidias.

6.1.2.3 Reproducción de *Trichoderma sp.*

Una vez obtenidos los resultados de identificación y comprobado que se obtuvo las cepas en estudio se procedió a su reproducción en cajas petri con PDA, para así conservar la capacidad fenotípica vigente y seguir con el estudio de las mismas.

6.1.2.4 Conservación de las cepas

Para la conservación de los hongos obtenidos en la fase de aislamiento y purificación, se aplicó la técnica de crioviales. Detallada a continuación:

- Se colocó 1 ml de glicerina, en tubos *eppendorf*, con el fin de conservar las estructuras de los hongos.
- Se comprobó que los tubos estén bien cerrados y se esterilizó en la autoclave a 120 °C y 15 PSI, junto con los instrumentos de laboratorios necesarios para la ejecución de la técnica.
- Con la ayuda de una pipeta *pasteur*, se retiró un pedazo del hongo y se lo colocó dentro del tubo *eppendorf*.
- Se repitió el procedimiento 5 veces para cada una de las cepas aisladas.
- Se identificaron los tubos *eppendorf*, y se los colocó en un refrigerador a 5°C.

6.1.3 Colección del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

6.1.3.1 Muestreo de material vegetal infectado

Las muestras que se tomaron fueron flores y tallos que presentaban signos de la enfermedad *Botrytis cinerea*, se depositaron en fundas polifán, se colocaron en un cooler e inmediatamente se trasladaron al laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana para su proceso de reproducción.

6.1.3.2 Fase de laboratorio para *Botrytis cinerea*

En la fase de laboratorio se utilizó las muestras de signos de la enfermedad *Botrytis cinerea* recolectadas en la Finca Florícola Picasso Roses.

- Preparación de medios para *Botrytis cinerea*

Para la siembra se preparó medio PDA según las especificaciones de la etiqueta comercial, se vertió aproximadamente 25ml en cada caja Petri.

- Preparación del material vegetal infectado por *Botrytis cinerea* y su aislamiento
- Se realizó una solución de hipoclorito de sodio al 10% en un vaso de precipitación.
 - Se cortó en trozos pequeños las muestras del material vegetal infectado
 - Estos trozos se depositaron en el vaso de precipitación agitando suavemente las muestras por 10 segundos.
 - Luego de este tiempo transcurrido de lavado, las muestras se colocaron en servilletas estériles tal que absorban el agua retenida en los exteriores de las muestras.
 - Con una pinza, estas muestras fueron colocadas en otro vaso con agua destilada estéril.
 - Se volvió a colocar en las servilletas estériles para seguidamente proceder con la siembra.
 - Con una pinza estéril se tomó la muestra y se sembró cada muestra en cajas con medio PDA, preparados previamente.
 - Las cajas con la siembra fueron selladas en los bordes para evitar la contaminación externa.
 - Terminado el proceso de siembra, se identificó cada caja y se colocó en una estufa con ambiente controlado.
 - Se incubaron las cajas por 8 días a una temperatura que osciló entre 25 a 30°C, con una humedad relativa del 50% y con luz constante durante las 24 horas.
 - Para su purificación se tomó esporas del hongo característico, se identificó y se aisló, hasta obtener la cepa completamente pura.

6.1.4 Pruebas de eficacia *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea*

6.1.4.1 Pruebas de eficacia *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea* por el método de enfrentamiento dual.

Cada uno de los aislamientos de *Trichoderma sp.* y el fitopatógeno se evaluó según

la metodología citado por (Jiménez, 2008), detallada a continuación.

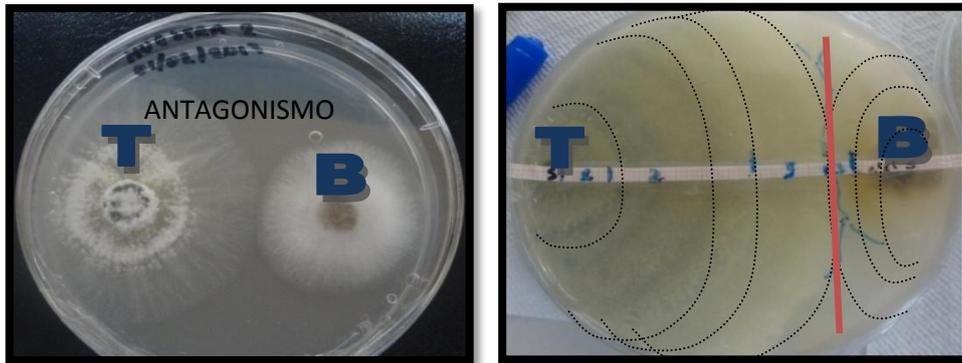
Las cepas, tanto de *Trichoderma sp.* y *Botrytis cinerea* fueron sembradas en cajas petri individuales con medio PDA. El *Trichoderma sp.* fue incubado por 5 días y *Botrytis cinerea* por 8 días en condiciones ambientales controladas de temperatura de 25 °C, con una humedad relativa del 50% hasta que los hongos presentaron crecimiento micelial.

Una vez obtenidas las cepas y por el método de enfrentamiento dual, en una caja petri con PDA se colocó un disco de 5mm de diámetro del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* de 8 días de crecimiento y al lado opuesto, un disco de 5mm de diámetro del antagonista *Trichoderma sp.*, de 5 días de crecimiento, este procedimiento se realizó para las cuatro muestras aisladas. Se prepararon 10 repeticiones con cada muestra y se dejaron en incubación hasta la toma de datos, con una temperatura de 25°C, una humedad relativa del 50%, y como testigo se utilizó 10 cajas del micelio del patógeno sin el antagonista.

➤ Lectura del ensayo

Los resultados se evaluaron por dos métodos: el primero se representó en función de la escala de (Bell, 1982), (ver fotografía 3) a los 8 días de incubación y el otro método se midió únicamente hasta que el antagonista cesó el crecimiento y se representó en porcentaje de inhibición PIC, durante este tiempo, se midió el crecimiento radial cada 24 horas, tanto del antagonista como del patógeno (radio de la colonia expresado en milímetros), así también, se verifica el día en que antagonista-patógeno entran en contacto y se expresa en día de contacto.

MÉTODO ENFRENTAMIENTO DUAL



FOTOGRAFÍA 3 Medición de eficacia de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea*

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Escala de Bell

Para la representación de los resultados en la escala de Bell, se analizaron cada una de las placas petri con cultivo antagonista-patógeno como unidad experimental, todos se leyeron al octavo día de enfrentamiento y crecimiento, según los parámetros que se muestran en la figura 7 y se representó como la cantidad de unidades experimentales por tratamiento que se ubicaron en cada escala.

I	El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo.	
----------	--	--

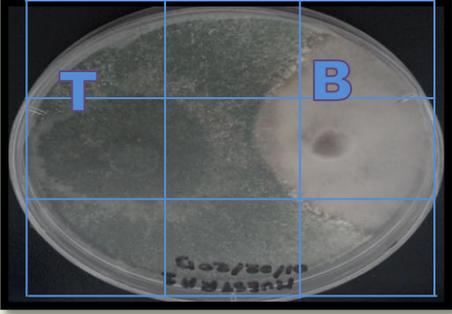
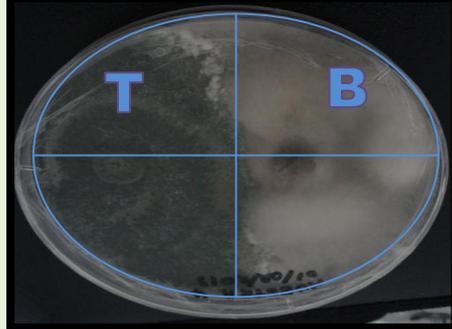
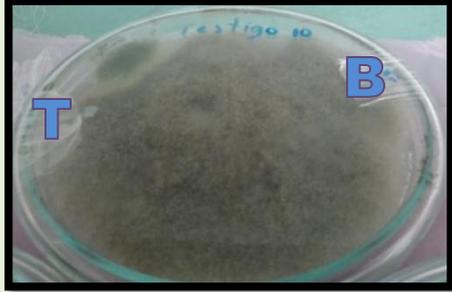
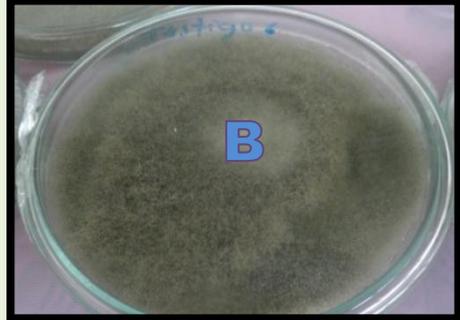
<p>II</p>	<p>El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.</p>	
<p>III</p>	<p>El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.</p>	
<p>IV</p>	<p>El patógeno sobrepasa al crecimiento del antagonista colonizando tres cuartas partes de la caja petri</p>	
<p>V</p>	<p>El agente fitopatológico llega a cubrir totalmente el plato petri</p>	

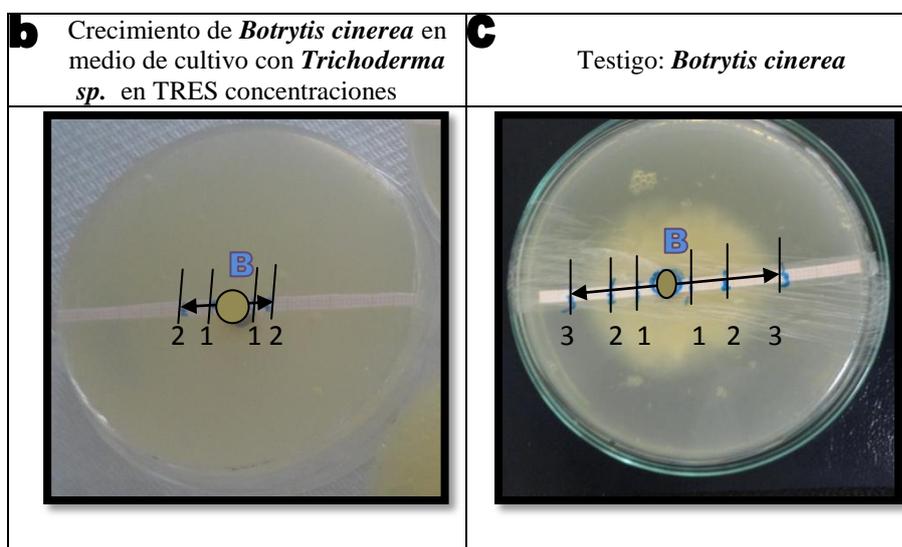
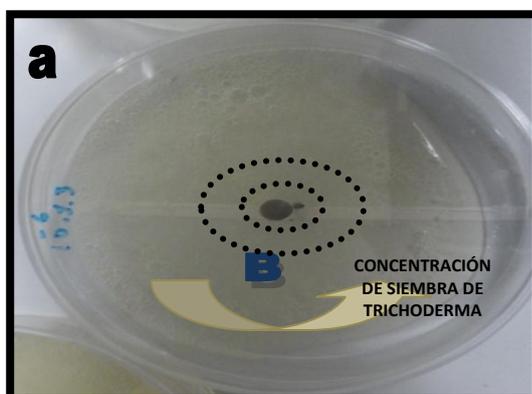
FIGURA 7 Método de lectura de las pruebas antagonicas según la escala de Bell

Fuente: (Bell, 1982)

Elaborado por: (Caiza, 2012)

6.1.4.2 Pruebas de eficacia in vitro de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea* en tres concentraciones 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} .

MÉTODO CONCENTRACIONES



FOTOGRAFÍA 4 Medición del PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento) de *Botrytis cinerea* frente a las concentraciones de crecimiento de *Trichoderma sp.*

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Cada uno de los aislamientos de *Trichoderma sp.* y el fitopatógeno se evaluó según la metodología descrita a continuación.

Para esta prueba de eficacia, se realizó las diluciones por el método serial o del número más probable.

Se pesó un gramo de la cepa de *Trichoderma sp*, se añadió en un tubo de ensayo con 9ml de agua destilada esterilizada, se agitó suavemente hasta obtener una solución sin grumos, llamándola solución madre. Esta actividad se realizó para las cuatro muestras de *Trichoderma sp*.

Con una pipeta se tomó una muestra de 1 ml de esta solución y se colocó en otro tubo de ensayo con 9ml de agua destilada esterilizada, etiquetándola como solución 10^{-1} . Esta actividad se realizó para las cuatro muestras de *Trichoderma sp*. hasta llegar a la concentración 10^{-6} . Los tubos de ensayo etiquetados como dilución 10^{-4} ; 10^{-5} y 10^{-6} de cada tratamiento se tomaron en cuenta para los siguientes aislamientos.

Una vez realizadas las diluciones, se preparó 241ml de medio PDA en frascos de 250ml, según instrucciones del fabricante, se esterilizó y se reguló el pH a 4.5. Una vez obtenido el medio estéril y a una temperatura de 40°C, se completó con 9ml de la dilución, así C1 es 10^{-4} , C2 es 10^{-5} , C3 es 10^{-6} , seguidamente se le agitó suavemente hasta obtener una solución homogénea y se procedió a verter en las cajas petri, 25ml por caja. Este procedimiento se realizó para cada concentración por cada muestra de *Trichoderma sp*.

Una vez solidificado el medio de cultivo en mezcla con el antagonista a su dilución correspondiente, en la parte media de la caja petri, se procedió a la siembra de una muestra cilíndrica de 5mm de diámetro de *Botrytis cinerea* en esporulación, y se repitió 10 por tratamiento de dilución. (Ver. Fotografía 4 a y b)

A parte de estas muestras también se sembró el testigo absoluto en PDA sin ningún tratamiento, el cual consta de una muestra cilíndrica de 5mm del patógeno en estudio en la fase de esporulación en la parte media de la caja petri. (Ver. Fotografía 11c)

Todas las muestras descritas anteriormente, fueron selladas por sus bordes, para evitar variantes de contaminación por el contacto con agentes externos, así también, se los identificó adecuadamente según la muestra y dilución correspondiente.

Una vez listas, se llevó a la estufa con ambiente controlado de 25°C y humedad de 50% para el crecimiento durante la medición.

6.1.5 Cinética de los microorganismos

Para medir la cinética (velocidad) de crecimiento, con un sacabocados estéril (sorbete estéril) se tomó una muestra del antagonista de 8 días de crecimiento *in vitro* y se recortó un diámetro de 5 mm.

Esta muestra se inoculó en la mitad de la caja petri con PDA sólido preparado previamente según la etiqueta comercial. Luego de la siembra, se etiquetó la caja y se selló los bordes para evitar el contacto con patógenos externos.

Estas muestras fueron incubadas en un ambiente controlado hasta que el micelio detuvo su crecimiento por contacto con los bordes de la caja petri.

Lectura del ensayo

La medición que se realizó fue el crecimiento radial del micelio vista al reverso de la placa petri conteniendo el cultivo antagónico (Ertola & Yantorno), desde el borde del inóculo hasta la punta del micelio crecido cada 24 horas, se registró a diario en una regla milimétrica adherida en la cara posterior de la caja y en la libreta de apuntes.

Unidad de medida:

mm/día de crecimiento

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Colección de *Trichoderma sp.*

Para el primer objetivo de la investigación se obtuvo:

CUADRO 4 Porcentaje de presencia de *Trichoderma sp.* por sitio de colección

CONCENTRACIÓN TRATAMIENTO	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	% TOTAL DE PRESENCIA/SITIO
T-SITIO 4 (Suelo baldío)	9,5%	4,8%	4,8%	4,8%	0,0%	9,5%	4,8%	38,1%
T-SITIO 3 (Suelo compostaje)	9,5%	4,8%	4,8%	4,8%	4,8%	0,0%	0,0%	28,6%
T-SITIO 2 (Suelo con plantas nuevas)	9,5%	0,0%	4,8%	4,8%	0,0%	4,8%	0,0%	23,8%
T-SITIO 1 (Suelo cultivo de rosas)	4,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	14,3%	19,0%

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Como se observa en el cuadro 1, en los muestreos de suelos realizados para los 4 sitios, hubo presencia de cepas de *Trichoderma sp.*, mostrándose en distintos porcentajes cuando los tratamientos fueron aislados a diferentes diluciones originados desde una solución madre de suelo, en este proceso, el antagonista se presentó mayormente en el sitio 4 con un 38.1% de las unidades experimentales, seguidos por el sitio 3 con el 28.6% de presencia y el sitio que menos representación obtuvo, fue el sitio 1 con el 19%, estos resultados posiblemente se debieron a varios factores como: La dilución de siembra, según afirma (Rodríguez, 20012) que en una dilución seriada hay la probabilidad del 5% de encontrar al microorganismo que se espera, así también pudo influir la microbiota presente en la muestra, que según afirma (Papavizas, 1981), las altas poblaciones de saprofitos compiten por espacio y alimento a pesar de que las especies de *Trichoderma* son generalmente considerados competidores agresivos, también supo intervenir la materia orgánica, que como se observa en el anexo 2, son diferentes y comparados a los resultados no precisamente el que mayor cantidad de materia orgánica tiene es el mejor, coincidiendo con (Hoper & Alabouvette, 1996), que asevera que en la ecología microbiana es probable que la composición de la materia orgánica tenga mayor influencia en el

balance de los suelos, sin embargo, estudios realizados por (Jensen & Wolffhechel, 1995) reportan concentraciones de hasta 8×10^5 conidios/g en suelos ricos de MO, de la misma manera, la acidez, para todos los tratamientos se trabajó con un estándar porque según indica (Benítez & González, 2003), la acidez, afecta la presencia, densidad y longevidad de *Trichoderma sp.*, inclusive, algunas especies prefieren determinado pH y prevalecen en suelos ácidos y en suelos forestales contaminados, a pesar de que este antagonista tiene un amplio rango de crecimiento (pH 2.5 a pH 9.5), otro factor que pudo influir fue la humedad de colecta, este parámetro es una de las variantes más importantes y supo reflejar en los resultados ya que el sitio 4 y 3 se encontraban a capacidad de campo al momento de la colecta y el sitio 1 y 2 fueron recolectados en suelos secos y según (Wakelin, 1999) reporta altas poblaciones de *Trichoderma* en suelos húmedos en comparación con suelos secos, así mismo, mayor densidad en suelos húmedos con 70% de capacidad de campo que en suelos secos con 20% de humedad y el estudio de (Eastburn & Butler, 1988), encuentran en un cultivar de alfalfa correlación positiva entre la humedad del suelo y las poblaciones de *Trichoderma*, finalmente, la textura del suelo, según el análisis de suelos realizado para los sitios de colecta fueron francos y el estudio realizado por (Fritze & Baath, 1993) destaca que en un suelo con textura arcillosa y arcillo arenosa el 62.9% de los aislados presentó *Trichoderma*, mientras que aquellos suelos con bajo contenidos de arcilla (franco, migajón arenoso y migajón limoso, sólo se obtuvo en el 15.2% de ellos, con lo que se puede decir que la textura influye en el resultado que presenta el cuadro 4.

Las muestras que se destacaron para la selección de cepas y posteriores análisis fueron tomados de las concentraciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} porque tuvieron mejores rasgos fenotípicos de abundancia, tiempo de crecimiento y coloración, también menos impurezas con microorganismos de otro género.

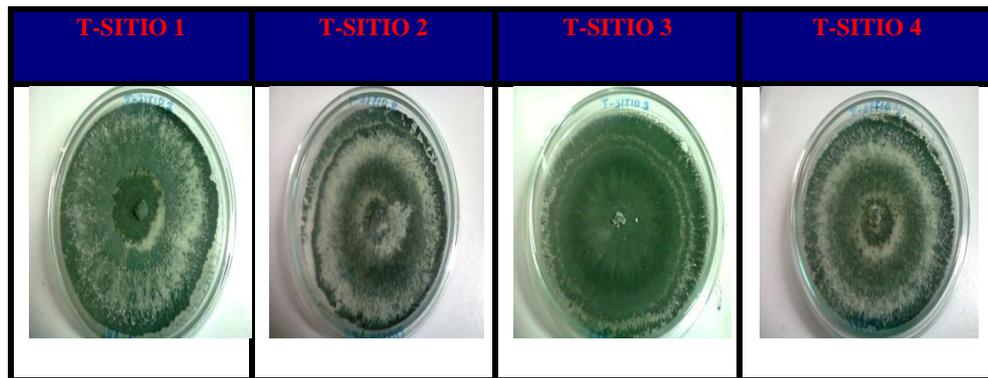
Una vez seleccionada la cepa y perfectamente purificada fue conservada en tubos *ependorf* en refrigeración a 5°C.

Por tanto, el *Trichoderma sp.* que se aisló es nativo y adaptado a las condiciones ambientales del lugar y tiene un gran potencial para utilizarse como agente de

control biológico contra *Botrytis cinerea*, según (Jensen & Wolffhechel, 1995) este organismo es considerado un hongo habitante natural en los suelos.

7.2 Identificación

7.2.1 Identificación morfológica de la cepa *Trichoderma sp.* en medio de cultivo PDA.



FOTOGRAFÍA 5 Cepas de *Trichoderma sp.* por sitio de colección.

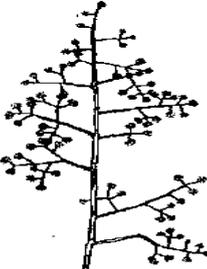
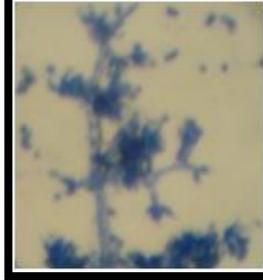
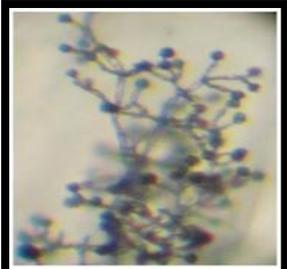
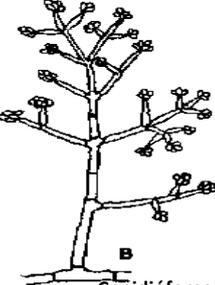
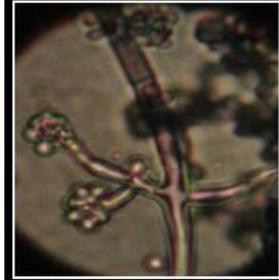
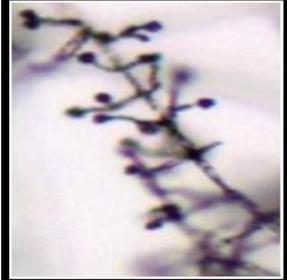
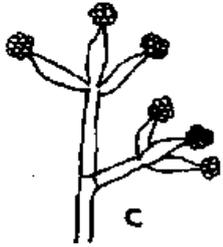
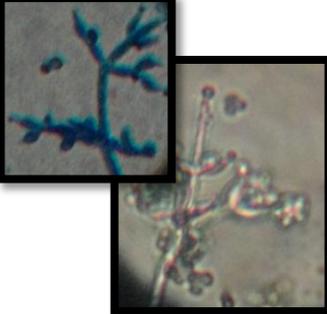
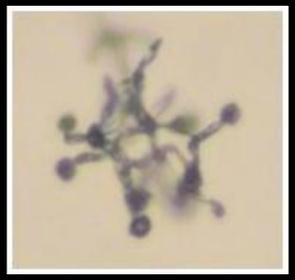
Fuente: La investigación

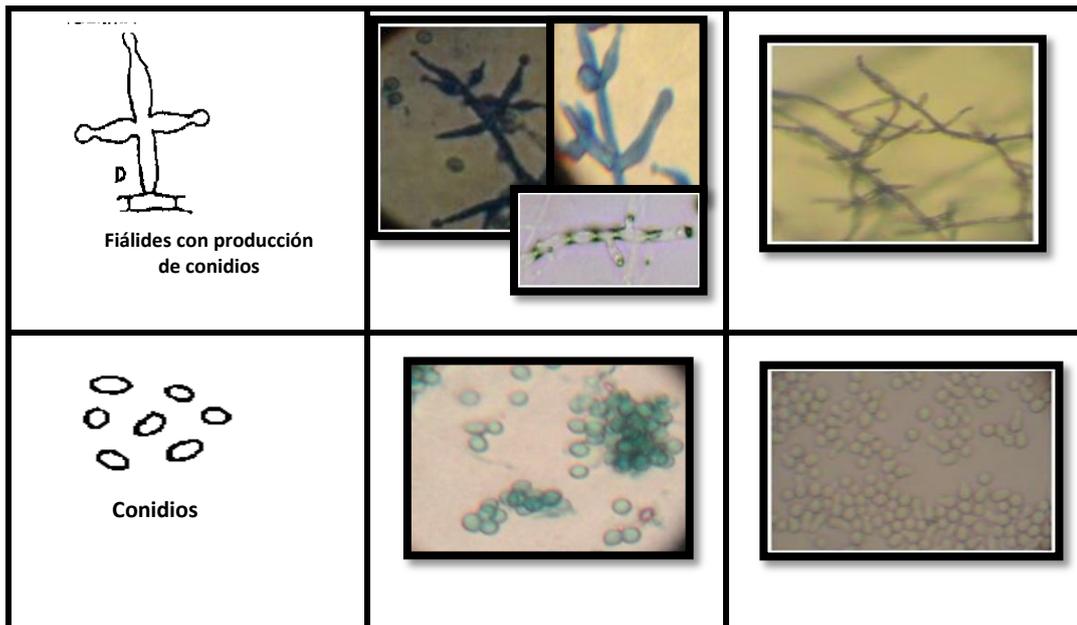
Realizado por: (Caiza, 2012)

En la fotografía 5 se representa las estructuras macroscópicas, el crecimiento empieza por formar una callosidad en la muestra sembrada, el primer día crece en promedio 12, 68mm de diámetro formando un anillo y es de color hialino, el día 2, presenta una capa blanca esponjosa en el anillo y el día 3 se torna verde, posteriormente, el primer anillo limita con otro de color blanquecino que aparenta tener menor cantidad de conidias y seguido a él se encuentra el crecimiento del segundo día que es de color blanco-hialino, así mismo al siguiente día se torna verde, esto ocurre hasta que el crecimiento diario limite con las paredes del plato petri que generalmente se presenta desde el quinto a octavo día. La colonia va tomando la tonalidad por partes hasta llegar a ser uniforme de color verde oscuro, permaneciendo bien definidos los anillos establecidos y pasando a un proceso de maduración de los conidios que son abundantes, muy sensibles al despliegue del medio de cultivo y volátiles, la colonia se presenta visiblemente áspera y polvosa, al palparla se siente aguada por el abundante micelio que ésta presenta, coincidiendo

con la descripción hecha por (Claro, 2006), *Trichoderma* es polvoriento o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril y al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas.

7.2.2 Identificación microscópica de la cepa *Trichoderma* sp.

IDENTIFICACIÓN POR (Barnett & Hunter, 1998)	IDENTIFICACIÓN POR LA TÉCNICA DE LA CINTA SCOTCH	IDENTIFICACIÓN POR LA TÉCNICA DEL MICROCULTIVO
 <p data-bbox="406 1030 526 1052"><i>Trichoderma</i></p>		
 <p data-bbox="406 1400 630 1444">Conidióforos con extensa ramificación</p>		
 <p data-bbox="399 1792 614 1836">Fiálides con producción de conidios</p>		



FOTOGRAFÍA 6 Identificación de estructuras microscópicas de *Trichoderma sp.* vistas al microscopio con el lente de 40x

Fuente: (Barnett & Hunter, 1998) y fotografías la investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Como se muestra en la fotografía 5 y 6, las cepas identificadas de cada sitio mostraron ser semejantes entre ellas.

En la fotografía 6 se observa las estructuras microscópicas de *Trichoderma sp.*, en el primer día de crecimiento, las hifas se muestran septadas, unicelulares, con una elongación y un núcleo en su interior, estas se extendieron rápidamente y coparon el sitio en donde se encontraban al quinto día, el color que presentan es hialino, los conidióforos se presentan al segundo día y se observa que salen de las hifas, son cortas, abundantes y muy ramificadas y la parte apical es impar y de color hialino, las fiálides se observan al tercer día y son globosas, hialinas, aparentan ser delicadas, alargadas en forma de cono piramidal y se insertan dos en cada ápice del conidióforo en donde se asientan los conidios y finalmente se observan los conidios que se presentan en formas ovales, teñidas de un color verde claro y lisas con una cobertura aparentemente resistente y gruesa además, las conidias se presentan incrustadas en las fiálidea a manera de un racimo globoso de umbelas bien definidas y según (Fernández, Larrea, & Ceja, 1997), los conidios son muy resistentes y se producen en mayor cantidad.

Al realizar las observaciones de la cepa al microscopio se apreció que efectivamente se obtuvo el hongo antagonico *Trichoderma sp.* porque las características coinciden con la descripción de (Barnett & Hunter, 1998).

7.3 Pruebas de eficacia in vitro de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea*

7.3.1 Enfrentamiento dual representado según la Escala de Bell

CUADRO 5 Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea* por el método dual medido según la Escala de Bell.

TRATAMIENTOS	ESCALA	ESCALA	ESCALA
	I	II	III
T-SITIO 2	90%	10%	0%
T-SITIO 3	90%	0%	10%
T-SITIO 4	70%	30%	0%
T-SITIO 1	70%	10%	20%

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Parámetro Escala de Bell

I: El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo.

II: El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.

III: El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.

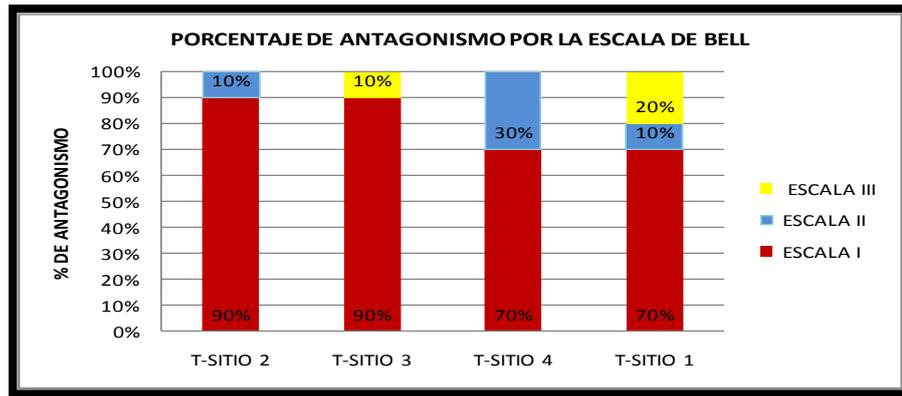


GRÁFICO 1 Antagonismo *in vitro* por el método dual

Realizado por: (Caiza, 2012)

Según se observa en la tabla 4 y gráfico 1, el resultado del enfrentamiento dual antagonista-patógeno se presentó de la siguiente manera: Las cepas de *Trichoderma sp.* lograron ubicarse en la escala I de Bell, el 90% de los tratamientos de las cepas provenientes de los sitios de colecta 2 y 3 ocuparon completamente la superficie del medio de cultivo, inhibiendo y cubriendo el crecimiento del hongo patógeno *Botrytis cinerea* y las cepas del sitio 4 y 1 presentaron el 70% de los tratamientos, de la misma manera, los demás tratamientos que no tuvieron éxito en la primera escala, se ubicaron en el nivel II y III. Ninguno de los tratamientos alcanzó a cubrir más de la mitad del medio de cultivo.

Lo anterior demuestra que las cepas de *Trichoderma sp.* tuvieron porcentajes aceptables de antagonismo *in vitro*, a pesar que el patógeno en algunos tratamientos, se resistió al antagonismo de hongo en estudio, y para que haya un verdadero control de la enfermedad no necesariamente debería llegar al 100% de efectividad. Estos resultados pudieron deberse a la incidencia de algunos factores, entre ellos, la adaptabilidad de la cepa al medio impuesto para la evaluación, debido a las condiciones ambientales de procedencia de los organismos colectados ya que según (Barro, Lara, & Castillo, 2011), no siempre las observaciones realizadas en laboratorio en condiciones *in vitro* se corresponden a lo que sucede en condiciones de campo, donde interaccionan muchos más factores (planta, suelo, actividad de otros microorganismos, supervivencia, capacidad de colonización etc.), de la misma manera, la cantidad de inóculo antagónico existente en el suelo, que según (Howell & Harman, 2002), es el causante de la competencia que se produce por recursos

esenciales como carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico, incrementando la esporulación cuando *Trichoderma* crece sobre la colonia del patógeno degradándolo y alimentándose de él. Otro factor puede ser la muestra de microorganismo en sí, ya que a pesar que se identificaron como semejantes, estos pueden ser diferente en especies y genética, lo que impidió que el antagonismo sea totalmente favorable, variando en el tiempo de crecimiento y agresividad ante el patógeno al respecto, (Web, 2013) señala que los hongos son muy adaptables y evolucionan rápidamente en condiciones *in vitro*. Existe una gran diversidad en el genotipo y el fenotipo de las cepas silvestres.

Por lo tanto, la mejor cepa antagónica fue el *Trichoderma sp.* proveniente del sitio 2 de colecta por presentarse en la primera y segunda Escala de Bell obteniendo un control efectivo y la cepa que menor antagonismo obtuvo fue la colectada en el sitio 1, quedando como menos influyente pero no descartada para una inclusión en el control de la enfermedad.

7.3.2 Enfrentamiento dual representado en PIC (porcentaje de inhibición de crecimiento)

CUADRO 6 Análisis de varianza DCA para porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por el método dual

ANÁLISIS DE VARIANZA			
FV	GL	SC	CM
TRATAMIENTOS	3	269,00	89,67 NS
ERROR EXPERIMENTAL	36	1632,00	45,35
TOTAL	39	1901,60	

CV=8,64%

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

CUADRO 7 Prueba de Tukey al 0,5% para porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* por el método dual

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN	RANQUEO
T-SITIO 3	80,6%	A
T-SITIO 2	80,3%	A
T-SITIO 4	76,0%	A
T-SITIO 1	74,7%	A

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Como se observa en la cuadro 5 y 6, el análisis de varianza para el porcentaje de inhibición muestra que, a pesar de ser cepas independientes por haber sido colectadas en sitios diferentes, el promedio en el porcentaje de inhibición de crecimiento PIC por el método de enfrentamiento dual no tuvo significancia estadística en el antagonismo frente a *Botrytis cinerea*, presentando comportamientos de control semejantes, ubicándose todos los tratamientos en el rango A y dando a conocer que cualquiera de estas cepas serían favorables para antagonizar un patógeno; el resultado de efectuar similar antagonismo *in vitro* posiblemente fue favorecido por la zona de colecta de las muestras, ya que debió ser efectivo encontrar el microorganismo en el suelo que por otros medios y según (Agrios, 1999), los microorganismos antagónicos existen naturalmente en los suelos de los campos de cultivos y ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos fito patógenos uno de ellos *Botrytis cinerea*. De cualquier forma, si se observa en el cuadro 6, se nota una diferencia numérica del porcentaje de inhibición entre las 4 cepas, destacando las cepas de los sitios 3 y 2 como los más efectivos, seguidos por las cepas obtenidas en los sitios 4 y 1, obteniéndose una similitud en los resultados con la Escala de Bell.

7.3.3 Antagonismo PIC (Porcentaje de inhibición de crecimiento) por el método de concentraciones C1 (10^{-4}), C2 (10^{-5}) y C3 (10^{-6})

CUADRO 8 Análisis de varianza DCA para porcentaje de inhibición del crecimiento por el método de concentraciones.

ANÁLISIS DE VARIANZA				
F.V.	GL	SC	CM	F
T-SITIO	3	590,89	196,96	6,61**
CONCENTRACIONES	2	1386,45	693,23	23,27**
T-SITIO+ CONCENTRACIONES	6	596,08	99,35	3,34**
ERROR EXPERIMENTAL	108	3216,90	29,79	
TOTAL	119	5790,33		

CV = 6,27%

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

Según se aprecia en el cuadro 7, el análisis de varianza realizado para los sitios de colecta de *Trichodermas sp.* ensayados en diferentes concentraciones frente al patógeno *Botrytis cinerea*, obtuvieron alta significancia estadística.

CUADRO 9 Prueba de Tukey al 0,5% para sitios de colecta de *Trichoderma sp.* en el porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea*

T-SITIO	% DE INHIBICIÓN	RANQUEO
T-SITIO 3	91	A
T-SITIO 2	87	A B
T-SITIO 4	86	B
T-SITIO 1	85	B

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

En el cuadro 8, para la variante sitios, según la prueba de Tukey al 0.5%, se obtuvo resultados heterogéneos y la mejor cepa que inhibió *Botrytis cinerea* fue la cepa de *Trichoderma* proveniente del sitio 3, ubicándose en el rango A con el 90,50% de inhibición, seguido por el sitio 2 el cual se encuentra en el rango AB con el 87,43% de inhibición, y las cepas de los sitios 4 y 1, tuvieron resultados inferiores con 85,77% y 84,60% respectivamente localizándose en el rango B, este resultado pudo

deberse a los mismos factores propuestos para el PIC efectuado en el enfrentamiento dual, como son, la adaptabilidad de la cepa al medio impuesto para la evaluación, el inóculo antagónico existente en el suelo y la muestra del microorganismo en sí, considerando que numéricamente se asemejan en el orden de los sitios resultantes a los del enfrentamiento dual, destacándose nuevamente las cepas de los sitios 3 y 2 como efectivos y el 4 y 1 como poco eficientes.

CUADRO 10 Prueba de Tukey al 0,5% para concentración de conidias de *Trichoderma sp.* en suspensión

CONCENTRACIÓN	% DE INHIBICIÓN	RANQUEO
C1	89,7	A
C2	89,25	A
C3	82,28	B

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

En el cuadro 9, el método de concentraciones fue una variante primordial en el estudio, la misma que mediante la prueba de Tukey al 0.5% nos mostró que las mejores diluciones para tener una alta probabilidad de control de *Botrytis cinerea*, son las presentes en la C1 y C2, esto es 3.7×10^5 y 7.2×10^4 conidias por cada ml de solución que fueron reportadas en el conteo con la cámara neubauer de una solución madre en relación 1:1 de 1 gramo de *Trichoderma sp.* por 1ml de agua destilada, a pesar que C1 y C2 obtuvieron resultados similares, se puede decir que entre estas, se recomendaría la concentración 2 ya que es probable que no difiera en los controles sanitarios, con esto se bajaría las cantidades de preparación y por lo tanto los costos de producción también serían más bajos; en este análisis, la concentración menos eficiente fue la C3 con la cantidad de conidias presentes en la dilución de 4.5×10^4 .

Estos resultados pudieron deberse a la cantidad y tamaño de conidias que se presentaron en la solución, así también de la viabilidad de las mismas.

En la evaluación realizada por (Barro, Lara, & Castillo, 2011) la capacidad de inhibición de una cepa de *Trichoderma lignorum* en concentración 10^5 esporas/ml, se observó una inhibición completa del crecimiento del patógeno.

Según experimentos realizados por (Ciancas, 2006), la utilización de *Trichoderma hamatum* para el control de *Botrytis cinerea in vitro* obtuvo una inhibición del 80%

y se determinó que el filtrado de *Trichoderma hamatum* igualmente reduce el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* con la dilución 10^{-2} en condiciones *in vitro*, correspondiendo a una inhibición del 67,5%.

CUADRO 11 Prueba de Tukey al 0,5% para la interacción entre sitio de colecta y la concentración de conidios

TRATAMIENTOS		% DE INHIBICIÓN	RANQUEO
T-SITIO 3	C1	93,90%	A
T-SITIO 3	C2	91,70%	A B
T-SITIO 4	C1	91,50%	A B
T-SITIO 1	C2	91,20%	A B
T-SITIO 2	C2	90,10%	A B C
T-SITIO 2	C1	89,40%	A B C
T-SITIO 3	C3	85,90%	A B C D
T-SITIO 1	C1	84,00%	B C D
T-SITIO 4	C2	84,00%	B C D
T-SITIO 2	C3	82,80%	B C D
T-SITIO 4	C3	81,80%	C D
T-SITIO 1	C3	78,60%	D

Fuente: La investigación
Realizado por: (Caiza, 2012)

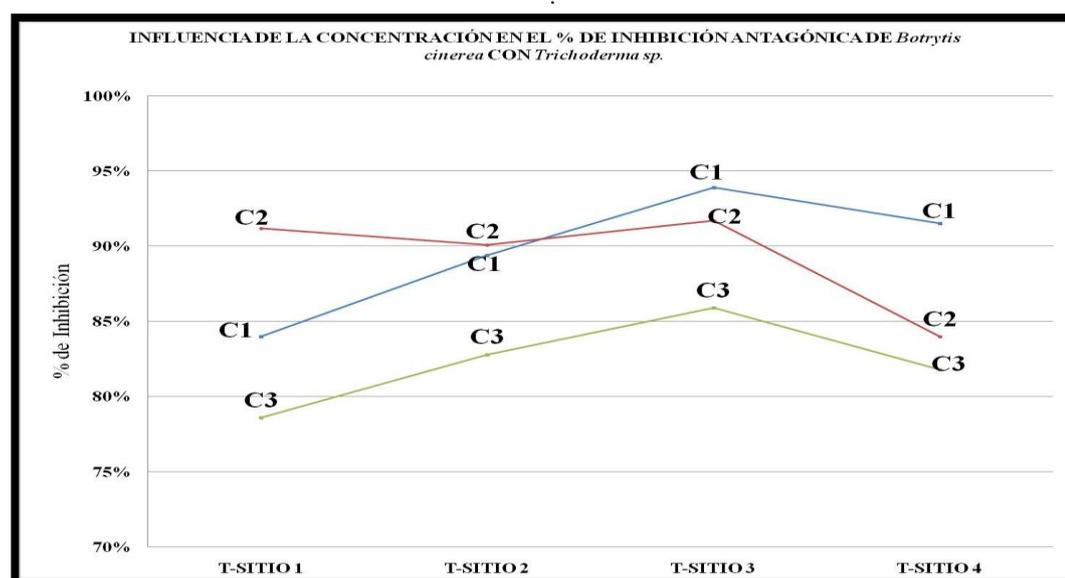


GRÁFICO 2 Concentración de *Trichoderma sp.* y la influencia en el porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea*

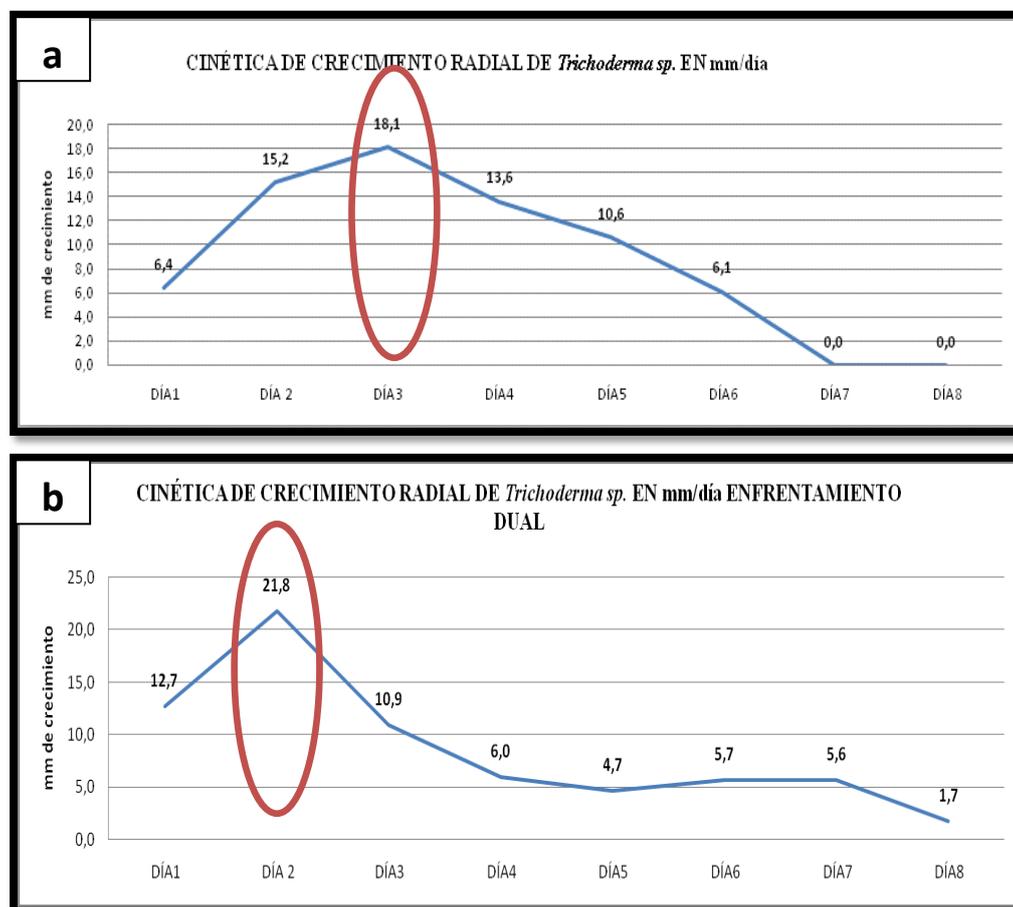
Fuente: La investigación
Realizado por: (Caiza, 2012)

Según se aprecia en el cuadro 10 y gráfico 2 la mejor cepa de *Trichoderma sp.* en interacción sitio-concentración fue la proveniente del sitio 3 con la concentración C1 el cual obtuvo el 93,90%, de inhibición de *Botrytis cinerea*, de la misma manera, fue eficaz con la concentración C2, esto pudo deberse a que específicamente en este lugar al momento de recolección de la muestra, pasaba de tener un cultivo silvestre diverso, para entrar a un monocultivo de rosas en donde el suelo se encontraba recién preparado y adicionado alta cantidad de material orgánico óptimo para el desarrollo de plantines y microorganismos benéficos, en el cual, la cepa ya estaba en actividad virulenta frente a patógenos. El tratamiento con menor antagonismo fue la cepa de *Trichoderma sp.* proveniente del sitio 1 cuando se combinó con una concentración C3, esto pudo deberse a que la cepa del sitio 1 provino de un lugar en condiciones secas y suelo compactado en donde posiblemente las esporas de *Trichoderma sp.* se encontraban inactivas y poco virulentas ante patógenos por tener baja diversidad microbiana en el sustrato.

La concentración del antagonista y el patógeno en un mismo medio es un factor muy importante para realizar un control efectivo y según citó (Guigón & Gonzáles, 2004), uno de los principios de control biológico es el empleo del agente de control en los momentos en que los niveles poblacionales de la plaga no sean elevados. Al igual que otros agentes biológicos de control, *Trichoderma* puede ser abrumado por una fuerte presión de la enfermedad, por lo tanto, estos antagonistas deberán utilizarse estrictamente como una medida preventiva, así también el estudio realizado por (Hernández, Sánchez, & Otros), detectó que la concentración de esporas de 1×10^4 conidias/ml, incrementó la altura de las plantas y la biomasa. En el caso de usar concentración de esporas más elevada se observó una disminución en el desarrollo de las plantas, lo cual, según (Harman, 2006) puede ser ocasionado por fitotoxinas que producen algunas cepas de *Trichoderma sp.*

7.4 Cinética de crecimiento

GRÁFICO 3 Cinética de crecimiento radial de *Trichoderma sp.* vs Enfrentamiento dual

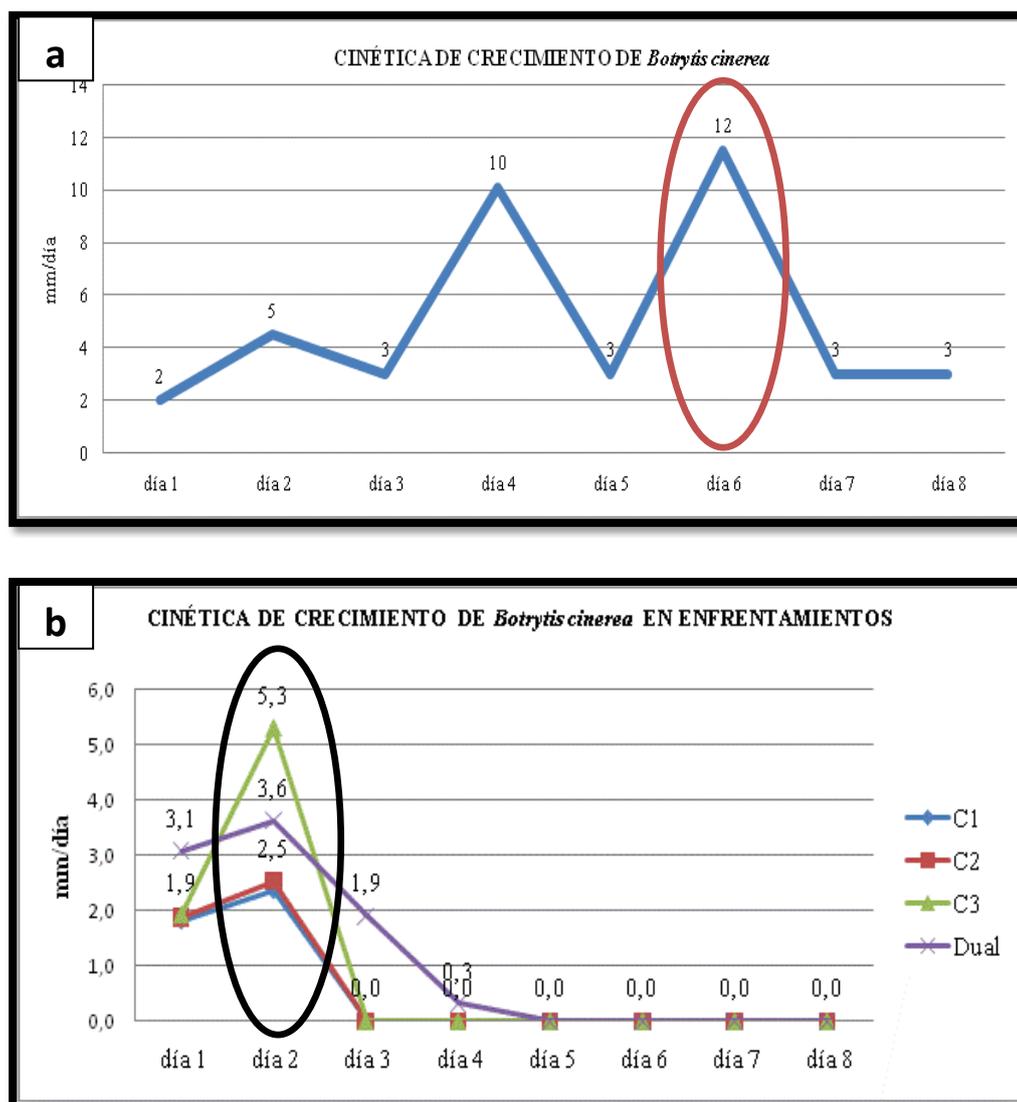


Fuente: La investigación
Realizado por: (Caiza, 2012)

Según indica la el gráfico 3, *Trichoderma sp.* presentó mayor crecimiento radial al tercer día (ver gráfico 3a) cuando se encontraba solo sin el patógeno, llegando a cubrir el medio de cultivo al sexto día; de la misma manera, cuando se presentó en enfrentamiento con *Botrytis cinerea* (ver gráfico 3b), en el segundo día fue cuando más crecimiento obtuvo desarrollándose paulatinamente hasta el día 8, estas cepas, de igual manera formaron anillos de 2 colores debido al alargamiento de las hifas, uno de color blanco y otro de color verde, en este se agrupa abundante micelio y hay la producción de fiálides y conidios característicos del género, estos resultados pudieron deberse a la presencia de actividad metabólica por la cantidad de nutrientes del sustrato, bajando paulatinamente la intensidad de crecimiento en función del

tiempo y la cantidad de nutrientes por absorber, otro factor pudo ser la genética de la cepa, a pesar de que (Harman, 2006) afirma que la velocidad de crecimiento presentadas por las especies de *Trichoderma* son motivos para la utilización de este microorganismo como antagonista para el control de fitopatógenos.

GRÁFICO 4 Cinética de crecimiento radial de *Botrytis cinerea* vs Enfrentamientos



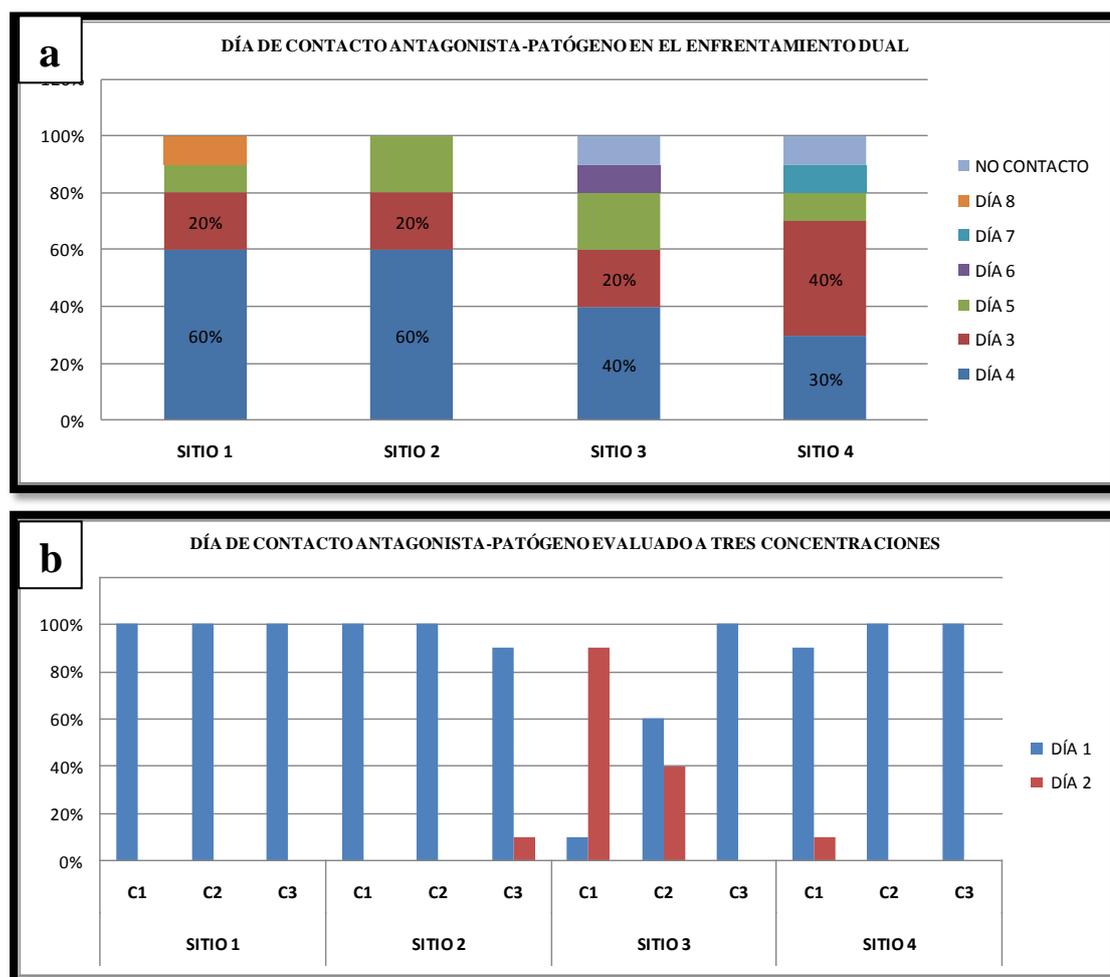
Fuente: La investigación
Realizado por: (Caiza, 2012)

Según indica el gráfico 4, *Botrytis cinerea* tuvo mayor crecimiento al día 6, cuando se encontraba sin el antagonista, (ver gráfico 4a), mientras que, cuando se enfrentó a *Trichoderma sp.*, éste creció mayormente en todos los casos de evaluación al

segundo día, cesando el desarrollo desde el tercero a cuarto día, (ver gráfico 4b). Este resultado pudo deberse a los factores de enfrentamiento como la competencia por nutrientes o algún tipo de antibiosis, ya que el antagonista también presentó este evento mayormente al segundo día y según cita (Coto, Orozco, & Calvo, 2012), la capacidad antibiótica desarrollada por el género *Trichoderma* se debe principalmente a la producción de los antibióticos peptaibol, trichozianinas A1 y B1. Mediante la producción de estas sustancias *Trichoderma* sp. logra inhibir la germinación de las esporas y la elongación de las hifas de *B. cinerea*.

7.4.1 Día de contacto antagonista-patógeno

GRÁFICO 5 Día de contacto del antagonista-patógeno en el enfrentamiento dual y por concentraciones



Fuente: La investigación
Realizado por: (Caiza, 2012)

Como se muestra en el gráfico 5a, los tratamientos del método dual tuvieron contacto antagonista-patógeno mayormente al día 4 y específicamente el tratamiento del el sitio 2 presentó un contacto desde el día 3 al día 5 siendo la cepa más efectiva para entrar en contacto, mientras que por el método de concentraciones, como se observa en el gráfico 5b, el día en que la mayor cantidad de tratamientos entraron en contacto fue al día 1, en este día, el porcentaje más alto de contacto se obtuvo cuando estos fueron evaluados con la C3 (Concentración 3), seguidos por la C2 y finalmente la C1 mostró menos enfrentamiento al día 1. Este hecho pudo deberse a la agresividad de cada cepa frente al patógeno y de acuerdo a (Michel, 2001), un tiempo de contacto corto es una característica deseable en un antagonista, ya que entre menor sea este, implicará una mayor agresividad y según cita (Coto, Orozco, & Calvo, 2012), en todos los casos el antagonista y patógeno hicieron contacto a los tres días. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, quienes han determinado que *Trichoderma* y diversos patógenos (*M. fijiensis*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc.) entran en contacto entre uno y tres días después de establecida la prueba de cultivos duales.

8. CONCLUSIONES

Se logró obtener una cepa nativa de *Trichoderma sp.* por cada sitio muestreado, mismos que exitosamente se presentaron en el sustrato colectado.

Las cepas colectadas fueron identificadas por dos métodos, la cinta scotch y el micro cultivo, y según las estructuras macroscópicas y microscópicas que se visibilizaron y compararon con varios autores, las cepas fueron similares.

Las cepas de *Trichoderma sp.* colectas mostraron capacidades antagónicas mediante las pruebas de eficacia *in vitro* que se realizó frente al patógeno *Botrytis cinerea*.

Las cepas de *Trichoderma sp.* colectadas del sitio 3 y 2 fueron las más efectivas, presentando mayor capacidad inhibitoria frente al patógeno y cuando se evaluó en diferentes concentraciones la que mayor efectividad presentó fue la concentración C1 de 3.7×10^5 conidias/ml y con similar efectividad la C2 con 7.2×10^4 conidias/ml, así mismo se pudo observar que el *Trichoderma sp.* del sitio 3 mostró mayor efectividad con las 3 concentraciones evaluadas en relación a los demás tratamientos.

El comportamiento cinético de *Trichoderma sp.* presentó mayor crecimiento al tercer día, mientras que frente al patógeno, este creció mayormente al segundo día; en el caso de *Botrytis cinerea*, como testigo y como tratamiento, presentó un crecimiento similar, dejando de desarrollarse únicamente en el momento que entró en contacto antagonista-patógeno que fue al cuarto día por el método del enfrentamiento dual y al primero y segundo día cuando se evaluó a diferentes concentraciones.

El microorganismo *Trichoderma sp.* logró ser antagónico, aportando al control biológico de *Botrytis cinerea*.

9. RECOMENDACIONES

Realizar muestreos de suelo en sitios o ambientes con características generales como humedades a capacidad de campo, pH neutros a ácidos y diversidad vegetal, ya que estas condiciones presentó el sitio 3 al momento del muestreo y resultó ser el mejor tratamiento que se obtuvo en la investigación.

En el caso de realizar posteriores colecciones de cepas de *Trichoderma sp.* dentro de la finca, se recomienda, colectarlo del sitio 3 y hacer pruebas de eficacia frente al patógeno para verificar la vigencia antagónica del hongo y para tener certeza de que la cepa sigue activa.

La cepa de *Trichoderma sp.* efectivas en este ensayo deben ser analizadas a nivel de campo, ya que su efecto en el control de *Botrytis cinerea* por las distintas variables que puede ocasionar el entorno ambiental existente, pese a que la cepa fue nativa.

Se deben establecer calendarios de colecta de *Trichoderma sp.* que ya entró en contacto con el patógeno en condiciones de campo, ya que la constante replicación del microorganismo en condiciones *in vitro* puede causar adaptabilidad a situaciones adecuadas de laboratorio, degenerando, bajando o hasta perdiendo la capacidad antagónica que resultó en esta evaluación. De la misma manera, para medir la incidencia de la enfermedad, luego de aplicar *Trichoderma sp.* se debe evaluar en condiciones adecuadas para el crecimiento *Botrytis cinerea*.

10. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue coleccionar, identificar y realizar pruebas de eficacia *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea* establecido en el cultivo de rosas de la Finca Florícola Picasso Roses. Para esto, la colección se realizó en 4 sitios de muestreo dentro de la finca, en los cuales se aislaron e identificaron cepas del hongo antagonico *Trichoderma sp.* para luego realizar las pruebas de eficacia frente a *Botrytis cinerea*, las técnicas por las que se evaluaron fueron los cultivos duales y la evaluación a tres concentraciones del antagonista. En esta investigación se determinó la competencia de los microorganismos por el sustrato y fue medido por dos métodos, la primera fue la Escala de Bell y la segunda fue la medición del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIC), así también, en la evaluación de las tres concentraciones se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento radial por sitio de colección y concentración. Las cepas evaluadas denominadas T-SITIOS 1,2,3 y 4. Para el primer método, el 80% alcanzó el grado de I en la Escala de Bell, donde el antagonista sobrepasó y creció sobre el patógeno cubriendo el 100% del medio de cultivo, dejando oculto a *Botrytis cinerea*, los restantes alcanzaron el grado II y III de antagonismo, señalando de esta manera, las mejores cepas antagónicas las provenientes de los sitios 2 y 3. En cuanto al porcentaje de inhibición PIC en el enfrentamiento dual y según el análisis de varianza no tuvieron diferencia significativa como ocurrió en las pruebas de eficacia evaluadas a tres concentraciones, aquí, el sitio 3 presentó el 93.9% de antagonismo frente al patógeno cuando se aplica a una concentración C1, no obstante, la C2 también fue eficiente con un control de 91.7% con la misma cepa, de la misma manera, C2 fue eficiente en combinación con cepas de *Trichoderma sp.* provenientes de los sitios 1, 2 o 3, por lo tanto, la cepa de *Trichoderma sp.* más efectiva fue la colectada en el sitio 3 en combinación con C1 y C2, presentando mayor capacidad inhibitoria del patógeno.

11. SUMMARY

The objective of this study was to collect, identify and efficacy testing *in vitro* the *Trichoderma sp.* against *Botrytis cinerea* established in growing roses to floriculture farm Picasso Roses. For this, the collection was performed in 4 sampling sites within the estate, in which were isolated and identified strains of antagonistic fungus *Trichoderma sp.* and then make testing efficacy against *Botrytis cinerea*, techniques for which were evaluated dual cultures and evaluation at three concentrations of the antagonist. In this study we investigated the competition of microorganisms for the substrate and was measured by two methods, the first was the Bell scale and the second was the measurement of the percentage of inhibition of radial growth (PIG), well, in the evaluation of the three concentrations was measured the percentage of radial growth inhibition by site collection and concentration. The strains tested denominated T-SITES, 1,2,3 and 4. For the first method, 80% attained the rank of I in the Scale of Bell, wherein the antagonist exceeded and grew on the pathogen covering 100% of the culture medium, hidden leaving *Botrytis cinerea*, the other reached the grade II and III of antagonism, indicating in this way, the best strains antagonistic those from sites 2 and 3. In terms of percentage inhibition in the confrontation dual PIC and by analysis of variance had no significant difference as in the proof of efficacy assessed at three concentrations, here, Site 3 had 93.9% of antagonism against the pathogen when applied to a concentration C1, however, C2 was also efficient with a 91.7% control with the same strain, in the same way, C2 was efficient in combination with strains of *Trichoderma sp.* from sites 1, 2 or 3, thus, the *Trichoderma sp.* Most effective was collected in the site 3 in combination with C1 and C2, presenting greater inhibitory capacity of the pathogen.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A. (2012). (V. Caiza, Entrevistador)
- Agrios, G. (1999). *Fitopatología* (Vol. 2da ed.). Limusa.
- Aguilera, M. (2012). Cultivo de la rosa:
<http://es.scribd.com/doc/104207389/Cultivo-de-La-Rosa>
- Arenas, O., & Otros. (2009). Características de *Trichoderma harzianum* como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Tesis*.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *"Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental"*. Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Baker, F., & Cook, J. (1982). Biological control of plant pathogens. 433p.
- Barnett, H., & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfecti fungi*. APS. Minesota: APS Press St Paul.
- Bar-Nun, N., Tal Lev, A., Harel, E., & Mayer, A. M. (1988). Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. *Phytochemistry*, 2505-2509.
- Barro, S., Lara, J., & Castillo, C. (2011). *Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de trichoderma lignorum FEPP TL0601 frente a fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Obtenido de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3767510>
- Benítez, S., & González, L. (2003). Aceleración de procesos de compostaje utilizando *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Trichoderma harzianum*. *Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología Clínica y aplicada*. Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Berto, P., Haissam, M., & Lepoivre, P. (2001). Possible role of colonization and cell walldegrading enzymes in the diferencial ability of three *Ullocladium atum* strains to control *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. *Phytopatology*. 1030-1036.
- Blandón, A. (2007). *Prácticas alternativas para el manejo integrado de plagas y enfermedaes*. PROMIPAC: http://arnolongo.wikispaces.com/file/view/Pr%C3%A1cticas_alternativas_para_manejo_de_plagas_y_enfermedades_MIP08-HN.pdf#page=1&zoom=auto,0,849

- Boffelli, G. (1991). Como cultivar rosas. Barcelona, España: Editorial de Vecchi S.A.
- Botanicaonline. (2012). *Cultivo de rosas*. FERNANDA; <http://www.articulos.es/jardineria/el-cultivo-de-las-rosas-para-corte.html>
- Brack, A., & Mendiola, C. (2012). *Fertilidad del suelo*. Ecología del Perú: http://www.peruecologico.com.pe/lib_c18_t07.htm
- Bustos, A. (2010). Niveles de acción por Blanco Biológico. *Procedimientos MIPE*. Cayambe, Pichincha, Ecuador.
- Caiza, V. (2012). Representación de Botrytis cinerea en rosas. *Botrytis*. Cayambe, Pichincha, Ecuador.
- Calvo-Araya, J. A. (2012). Tesis. Agronomía Mesoamericana.
- Campbell, R. (1987). *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press. New York., USA.
- Cano, S. R. (2006). Métodos de análisis microbiológico. Analiza Calidad.
- Castro, R. (2007). Unidad de producción de microorganismos antagonistas y entomopatógenos. *Departamento de Sanidad Vegetal*. Riobamba, Ecuador: ESPOCH.
- Cholango, L. (2009). Selección de cepas de trichoderma sp. in vitro, para el control de problemas radiculares en flores de verano. *Tesis*. Quito, Pichincha, Ecuador: ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO IASA I.
- Chuc, J. A. (2010). *Hongos y su importancia en la Medicina Veterinaria*. Hongos: <http://www.slideshare.net/paviruchi/hongos-4628608>
- Ciancas. (2006).
- Claro, O. (2006). *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)*. de Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. partir de hongos entomopatógenos y antagonistas.: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>
- Coto, G., Orozco, S., & Calvo, J. (2012). *Aislamiento y evaluación in vitro de antagonistas de Botrytis cinerea en mora*. Agronomía mesoamericana.
- Descalzi, G. (2012). Lunes 13 de febrero del 2012 Economía.
- Dixon, R. A. (1991). Natural products and plant disease resistance. 843-847. Nature.

- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. 385-393. *Revista esp. Quimioterap.*
- Eastburn, & Butler. (1988).
- Elad, & Chet, I. (1987). *Phytopathology, Possible role of competition for nutrients in biocontrol of Pythium damping-off by bacteria.*
- Ertola, R., & Yantorno, O. (s.f.). *Crecimiento microbiano.* www.biologia.edu.ar/microind/crecimiento%20bacteriano.htm
- Fainstein. (2003). Manual para el control de plagas y enfermedades en cultivos florales. *Manual para el control de plagas y enfermedades en cultivos florales*.
- Fainstein. (1997). *Manual para el cultivo de rosas en Latinoamérica.* Ecuador: Ecuaoffset Cia ltda.
- Fernández, Larrea, & Ceja. (1997). Normas de especificaciones 1993.
- Flores, T., Leyva, M., & Mariaka, F. (2012). *Cultivo de flores exóticas.* Global Plant: <http://www.acmor.org.mx/cuamweb/reportescongreso/2010/admon/410-%20CUAM%20Mor-%20Global%20Plant%20S.%20A..pdf>
- Flores, V., Latorre, B. A., & Roco, A. (1994). Dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: survey and characterization. 990-994. *Plant Dis.*
- Fonseca, A. E. (1993). “Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. Cultivada in vitro en *Botrytis cinerea* pers” 1993). “*Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie Quillaja saponaria Mol. Cultivada in vitro en Botrytis cinerea pers*”.
- Fritze, & Baath. (1993).
- Gams, & Bissett. (1998). *Morphology and identification of Trichoderma in: Trichoderma and Gliocladium* (Vol. 1).
- Gino, D. (2012). EXPOFLORES. *Diario el HOY*.
- Google. (2012). *Ubicación geográfica Ecuador.* Datos de mapa 2012: https://maps.google.com.ec/maps?hl=es&q=mapas%20google%20pichincha%20y%20sus%20parroquias&psj=1&bav=on.2,or.r_qf.&biw=1024&bih=485&um=1&ie=UTF-8&sa=N&tab=wl
- Grayer, R. J., & Harborne, J. J. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants. 1982-1993. 19-42. *Phytochemistry.*

- Guigón, C., & Gonzáles, P. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora Capsici* leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum Annuum*). (R. M. Fitopatología, Ed.) *Redalica* , 22 (001), 117-124.
- Guizzardy, M., Brunelli, M., & Folchi, A. (1996). Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* pers. : Fr.) on fresh – market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. 699- 705. *Crop Protection*.
- Harman, G. (2000). *Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on Trichoderma harzianum T-22*.
- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. En *Phytopatology* (págs. 190-194).
- Hernández, J. L., Sánchez, M. I., & Otros. (s.f.). *Caracterización molecular y agronómica de aislados de Trichoderma spp. nativos del noreste de México*. Obtenido de www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download
- Heussler, P. (1991). Cultivo del rosal. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Hoper, & Alabouvette. (1996). Tesis.
- Howell, C., & Harman, G. (2002). *Trichoderma species opportunistic avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology*.
- Izahaki, I. (2002). Emodin a secondary metabolites with multiple ecological functions in higher plants-Research review. 205-217. *New Physiologist*.
- Jarvis, W. (1977). *Botryotinia and Botrytis Species: taxonomy, physiology*.
- Jeandet, P., Douillet, A., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., & Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. 2731-2741. *J. Agric. Food Chem*.
- Jensen, & Wolffhechel. (1995). Tesis.
- Jiménez, C. 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, Ecuador: ESPE-IASA.
- Kubicek, C., & Harman, G. (1998). "*Trichoderma and Gliocladium*" *Basic Biology taxonomy and genetics* (Vol. 1). (" a. Francis", Ed.) London.

- Lambers, H., Chapin, F. S., & Pons, T. L. (2000). *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag. 539. New York.
- López, A. (2007). "Pruebas de eficiencia in vitro y bajo invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. para control de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa *Solanum tuberosum* para establecer un banco de microorganismos". *Tesis de Ingeniería Agropecuaria, IASA- ESPE*. Sangolquí, Ecuador.
- Luis. (2012). *¿Que relacion habra entre la luz y la humedad y el desarrollo de los hongos?¿Que relacion habra entre la luz y la humedad y el desarrollo de los hongos?:* <http://espanol.answers.yahoo.com/question/index?qid=20110420144450AAKXugX>
- Michel, A. (2001). Cepas nativas de *Trichoderma* spp., (Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). *Tesis de Doctorado en Ciencias* . Tecomán, Colima: Universidad de Colima.
- Morales, P. (2010). *Los microrrganismos del suelo*. La guía de la biología: <http://biologia.laguia2000.com/biologia/los-microorganismos-del-suelo>
- Morrissey, J., & Osbourn, A. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics and a mechanisms of phatogenesis. *Microbiol* , 708-724. *Mol. Biol. Rev.* 63.
- Naranjo, D. (2012). Localización Finca Florícola Picasso Roses. Pichincha, Ecuador: Picasso Roses.
- Páez, O. (2012). *Uso agrícola del Trichoderma*. <http://www.soilfertility.com/trichoderma /espanol/index.html>
- Papavizas. (1981).
- Picasso Roses, R. (2012). *Clima in situ*. Pichincha, Ecuador: Picasso Roses.
- Quishpe, V. (2010). "Control de *Botrytis cinerea* con fundas". *Tesis* . Cayambe, Pichincha, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Ramírez-Chavez, E., Lucas-Valdés, L., Virgen-Calleros, G., & Molina-Torres, J. (2000). Actividad fúngica de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotinium*. 207-215. *Agrociencia*.
- Restrepo, J. (2011). *Para los que no quieren ver*. <http://www.youtube.com/watch?v=dT0zXwQgaI0>

- Ribera. (2007). "Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* mol. cultivada in vitro en *Botrytis cinerea* pers. *Tesis Doctorado* , 27-28. Temuco, Chile de la Frontera: Universidad.
- Rice, E. L. (1987). Allelopathy: an overview. En: Waller, G.E. Allelochemicals: role in agriculture and forestry. *Tesis* , 8-22. Washington, Oklahoma: Oklahoma state university.
- Roberts, R. (1990). *Phytopathology. Postharvest biological control of gray mold of apple by Cryptococcus laurentii*.
- Rodríguez, D. B. (2001). *Teoría y bases ecológicas del control Biológico*. XII Concurso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de control Biológico, México, Chiguagua.
- Rodríguez, P. S. (20012). *Microbiología, Tercer curso de biología*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Rodríguez, V. (2002). *Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra Rhizoctonia solani un fitopatógeno causante del damping off en plantas de tomate*. (F. d. Bioquímica, Ed.) Lima, Perú: Unidad de postgrados.
- Rosslembroich, H., & Stuebler, D. (2000). History and chemical control and novel fungicides for its, management. *Botrytis Cinerea* , 557 - 561. Crop Prot.
- Salinas, J. W. (1986). *Phytopathology*.
- Sierra, S. G., & Castro, S. S. (2012). *Biología de los hongos*. Efectos de la temperatura en el crecimiento de hongos (*Stemphylium* Sp.): <http://www.buenastareas.com/ensayos/Efectos-d-e-La-Temperatura-En/4202301.html>
- Skidmore, A. M., & Dickinson, C. H. (1976). *Colony interactions and hyphal interference between Septoria nodorum and phylloplane fungi*. Transactions of the British Mycological Society.
- suelos, L. d. (2012). ANÁLISIS DE SUELOS. Cayambe.
- Todorquidea. (2012). *TODORQUIDEA*. <http://www.todorquidea.com/pt/fungicidas/45-trichoderma.html>
- Vann Etten, H. D., Sandrock, R. W., Wasmann, C., Soby, S. D., McCluskey, K., & Wang., P. (1995). Detoxificación of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. 518-525. Can. J.
- Wakelin. (1999).

Web. (2013). *Trichoderma harzianum*, *Taxonomía y genética*, *Micoparasitismo*.

Web Academia: http://centrodeartigos.com/articulos-utiles/article_101516.html

Zolezzi, Fariños, Gonzales, & Rojas. (2010). *Principales problemas producidos por hongos en Pinus radiata*.

13. ANEXOS

ANEXO 1 Número de florícolas por tamaños y superficie cultivada según tipo de flores.

NÚMERO DE FLORÍCOLAS POR TAMAÑOS Y SUPERFICIE CULTIVADA SEGÚN TIPO DE FLORES									
Tipo	Total			Tamaño del Cultivo					
	Nº florícolas	Hectáreas	Porcentaje de área cultivada	Menos de 3ha		De 3 a menos de 20		De 20 y más ha	
				Nº de florícolas	Hectáreas	Nº de florícolas	Hectáreas	Nº de florícolas	Hectáreas
Total	447	3503,8	100%	134	184,0	288	2551,3	25	768,5
Rosas	275	2517,2	72%	53	79	203	1868,1	19	570,1
Claveles	16	88,6	3%	10	14,9	5	49,8	1	23,9
Gypsophila	29	316,4	9%	2	3	25	242,8	2	70,6
Calla	8	31,8	1%	4	3,8	4	28	0	0
Hypericum	19	163,1	5%	5	7,3	12	78,9	2	76,9
Astromelia	3	12,5	0%	1	0,7	2	11,8	0	0
Limonium	13	28,3	1%	9	7,2	4	21,1	0	0
Gerbera	3	3,4	0%	3	3,4	0	0	0	0
Aster	4	5,2	0%	4	5,2	0	0	0	0
Delphinium	12	29,6	1%	7	7,1	5	22,5	0	0
Flores de verano	45	188,2	5%	27	40,2	18	148	0	0
Flores tropicales	7	76,3	2%	1	2,9	5	46,4	1	27
Follaje	10	41,5	1%	5	7,6	5	33,9	0	0
Otras Flores	3	1,7	0%	3	1,7	0	0	0	0

Fuente: MAGAP/SIGAGRO – SENACYT

Elaborado por: Mat. Víctor Bucheli “PROYECTO SIGFLORES 2009-2010”

ANEXO 2 Análisis de suelos

PARÁMETROS	UNIDAD	SITIO 1	SITIO 2	SITIO 3	SITIO 4
Ph	NA	6,4	6,8	6,7	5,5
Conductividad	dS/m	0,3	0,2	0,4	4,0
Clase textural	NA	55-33-12 FRANCO	52-34-14 FRANCO	54-32-14 FRANCO	66-28-6 FRANCO ARENOSO
Materia orgánica	%	6,2	2,6	4,8	7,5
Nitrógeno	%	0,3	0,1	0,2	0,4
Fósforo asimilable	ppm	1,0	3,4	35,7	36,3
Potasio intercambiable	cmol K/kg	0,1	0,1	0,3	0,3
Calcio intercambiable	cmol Ca/kg	8,0	7,2	10,2	23,3
Magnesio intercambiable	cmol Mg/kg	3,7	3,9	4,8	6,6
Capacidad de intercambio catiónico C.I.C.	cmol/kg	12,2	11,5	15,7	34,2
Ca/Mg	NA	2,2	1,8	2,1	3,6
Mg/K	NA	25,8	49,1	18,7	19,5
Ca+Mg/K	NA	81,6	139,3	58,4	88,8

Fuente: Laboratorio de suelos y agua UPS, 2012

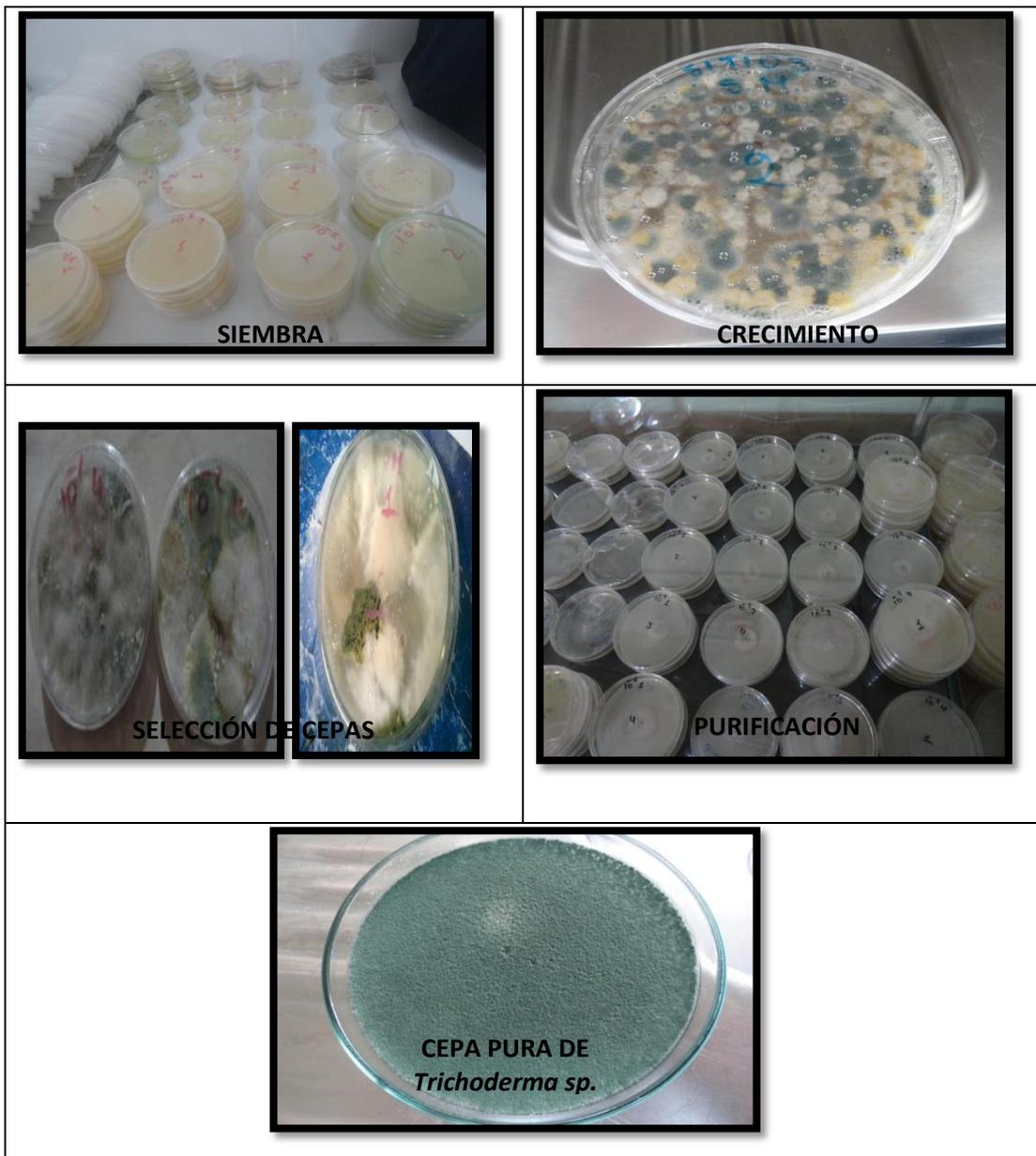
ANEXO 3 Toma de muestras de suelo



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

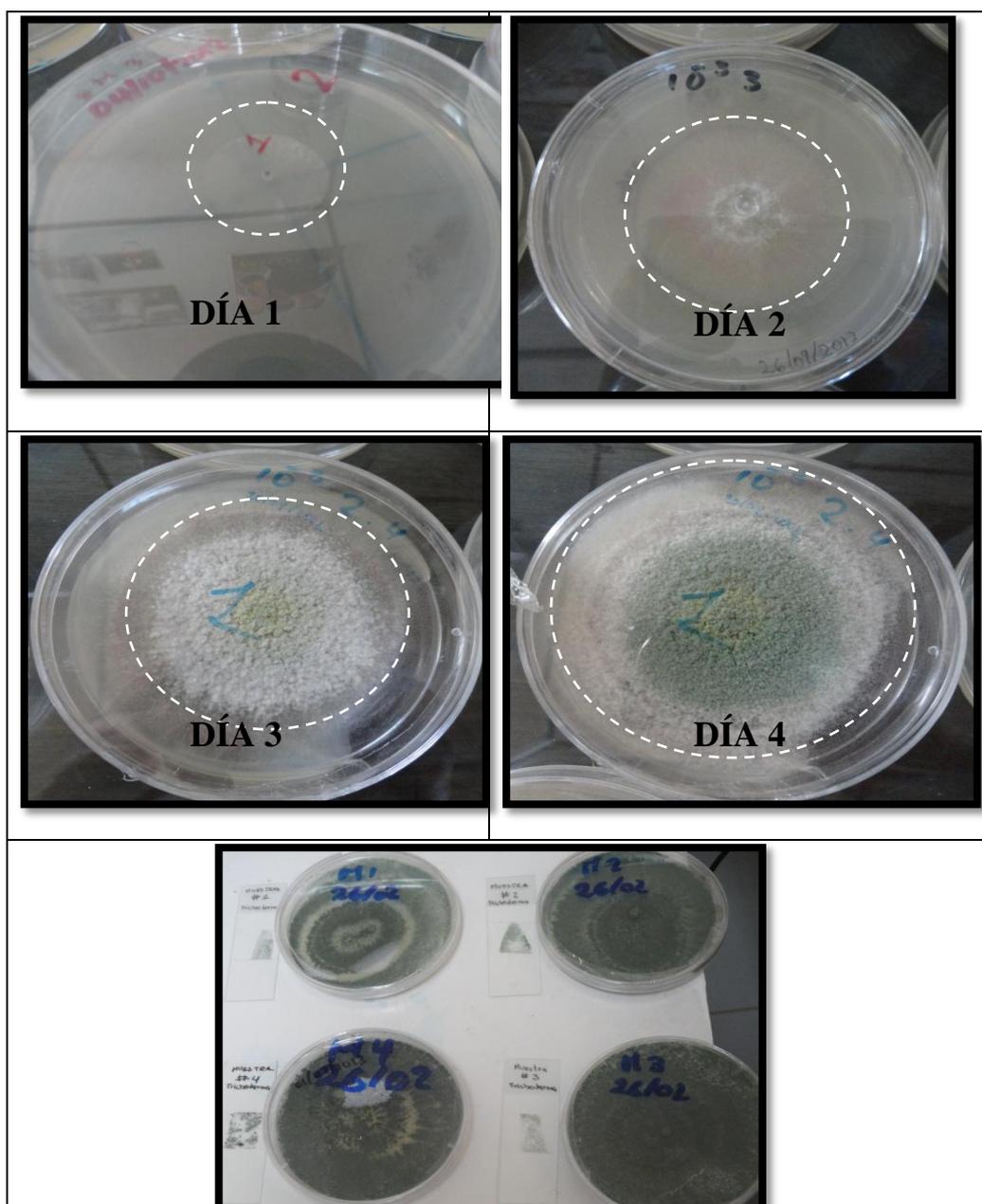
ANEXO 4 Proceso de aislamiento de cepas de *Trichoderma sp.*



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

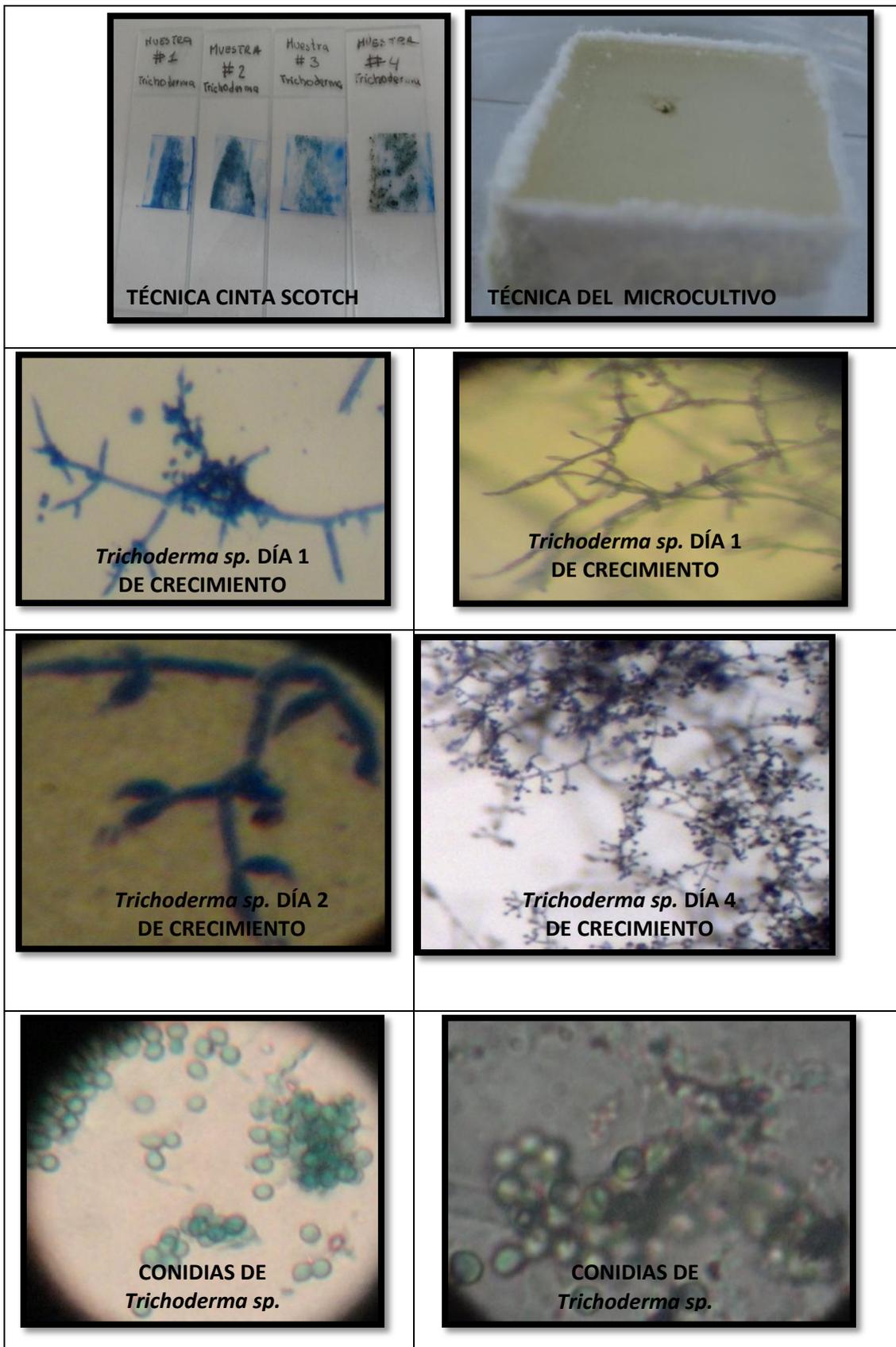
ANEXO 5 Crecimiento de *Trichoderma sp.* en cajas petri con medio PDA.



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

ANEXO 6 Identificación de *Trichoderma sp.* por dos técnicas.



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

ANEXO 7 Colección de *Botrytis cinerea*



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

ANEXO 8 Antagonismo in vitro de *Trichoderma sp.* frente a *Botrytis cinerea*



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

ANEXO 9 Aplicación de la escala de Bell para los tratamientos duales.

REPETICIÓN POR MUESTRA	T-SITIO 1	T-SITIO 2	T-SITIO3	T-SITIO 4
	ESCALAS DE BELL			
1	I	I	I	I
2	I	I	III	I
3	III	I	I	II
4	I	I	I	I
5	II	I	I	I
6	I	I	I	II
7	I	I	I	I
8	III	I	I	I
9	I	I	I	I
10	I	II	I	II

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

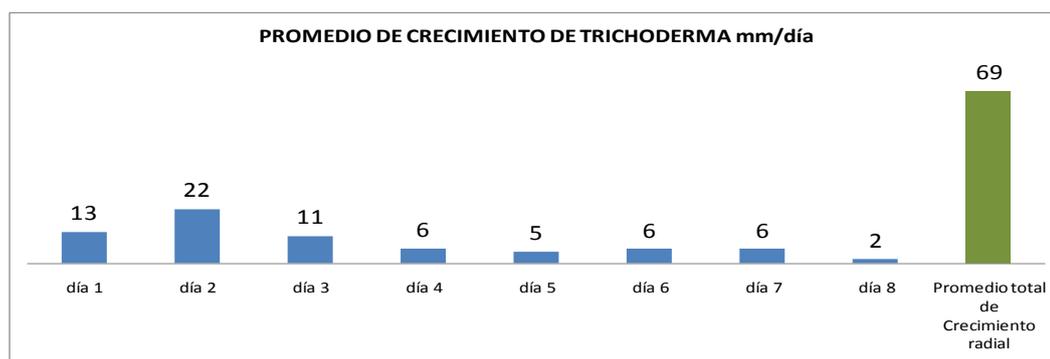
Nota:

I.- El antagonista ocupa completamente la superficie del medio de cultivo cubriendo totalmente al patógeno

II.- El antagonista llega a sobrepasar las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo

III.- El antagonista y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio y ninguno parece dominar al otro.

ANEXO 10 Crecimiento de *Trichoderma sp.* en mm/día. y su crecimiento total



Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

ANEXO 11 TESTIGO: Crecimiento de la colonia de *Botrytis cinerea*

TESTIGO: CRECIMIENTO DE BOTRYTIS EN (mm)	PROMEDIO DE CRECIMIENTO DEL TESTIGO mm
42	40,1
37	
38	
35	
39	
39	
45	
39	
48	
39	

Fuente: La investigación

Realizado por: (Caiza, 2012)

$$PIC = [(C1 - C2) / C1] \times 100.$$

40,1 - 42

Donde:

C1= Es el crecimiento radial del testigo (fitopatógeno sin antagonista)

C2= El crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos en cultivo dual.

ANEXO 12 Conteo de conidias de *Trichoderma sp.* en cámara neubauer.

Concentración	Resolución del lente	Concentración de conidias/ml²	Número de conidias/ml²
0,0001	250000	3,7E+10	370000
0,00001	250000	7,2E+10	72000
0,000001	250000	4,5E+11	45000