



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD DE *Trichoderma spp.*
SOBRE *Fusarium spp.* COMO ALTERNATIVA AL USO DE
FUNGICIDAS QUÍMICOS QUE PRODUCEN CONTAMINACIÓN
AMBIENTAL EN LA FLORÍCOLA HAPPINES FLOWERS”**

Trabajo de Titulación presentado para optar el grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: ELITH VIVIANA DÍAZ ALULEMA

DIRECTOR: PHD. SERGIO DAVID BARÓN LÓPEZ

Riobamba - Ecuador

2016

© 2016 Elith Viviana Díaz Alulema

Se utiliza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación: **“EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD DE *Trichoderma spp.* SOBRE *Fusarium spp.* COMO ALTERNATIVA AL USO DE FUNGICIDAS QUÍMICOS QUE PRODUCEN CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN LA FLORÍCOLA HAPPINES FLOWERS”**, de responsabilidad de la Señorita Elith Viviana Díaz Alulema ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizado su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

PhD. Sergio David Barón López
DIRECTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

.....

Dra. Yolanda Dolores Díaz Heredia
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Elith Viviana Díaz Alulema, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 11 de agosto del 2016

.....

Elith Viviana Díaz Alulema

C.I. 1803900941

Yo, Elith Viviana Díaz Alulema soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

ELITH VIVIANA DIAZ ALULEMA

DEDICATORIA

A Dios, a la Virgen María y a Jesús, por llenarme de fe, bendiciones, amor y protección, en cada momento de mi vida estudiantil ya que son mi complemento espiritual para engrandecer mi alma, sin su voluntad muchos de mis anhelos no se alcanzarían; si no es por su gracia.

Dedicado a mis padres Evita y Bernardino por darme la vida, ejemplo, y creer en mí, apoyándome incondicionalmente en cada circunstancia de mi vida.

A Alex mi compañero de la vida quien me ha demostrado ser fuerte, valiente, buen padre, apoyándome al final de esta etapa que se concluye. Te Amo.

A mi niña Hermosa Valery, cada circunstancia atravesada fue por ti, porque en tu tierna edad fuiste fuerte, llegaste a mi vida a llenarme de amor, felicidad y eres la razón por la cual valió luchar.

A mis Hermanos, mis sobrinos, tíos Carlos, Celiano, Celestina y Mamita Mercedes que forman parte importante en mi vida.

Elith Viviana

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento al Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme sus puertas para formarme profesionalmente.

Al departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales en especial a la Dra. Norma Erazo por contribuir con sus conocimientos para el desarrollo de esta investigación.

A mi Tutor PhD. Sergio Barón y a la Dra. Yolanda Díaz, por aportar con sus ideas y conocimientos en la culminación del trabajo Final de Titulación.

A la Floricola Happinnes Flowers, al Ing. Agro. Stalin Moya por colaborarme con la apertura y facilidades para el desarrollo de esta investigación en su empresa.

A mis familiares y amigos Karli, Nelson, Jeimy, mil gracias por compartir estos tiempos juntos.

Elith Viviana

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XIV
SUMMARY	XV
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	6
1.1. Antecedentes de la investigación	6
1.2 Bases Teóricas.....	9
1.2.1. Importancia del cultivo de clavel en el Ecuador	9
1.2.2. Control Biológico Microbiano	10
1.2.3. Antagonismo	10
1.2.4. Aspectos generales del género <i>Trichoderma</i>	11
1.3. Uso de <i>Trichoderma</i> para el control de enfermedades.	13
1.3.1. Micoparasitismo	14
1.3.2. Las enzimas	14
1.3.3. Antibiosis	14
1.3.4. La competencia en la rizosfera.....	15
1.3.5. La producción de sideróforos	15
1.3.6. Transducción de señales.....	15
1.3.7. <i>Trichoderma</i> como un colonizador de compost	16
1.4 Aspectos generales del género <i>Fusarium</i>	16
1.4.1. <i>Fusarium redolens</i>	17
1.4.2. <i>Fusarium oxysporum f.sp. dianthi</i>	18
1.4.3. <i>Fusarium oxysporum f. sp. dianthi</i> y marchitamiento vascular del clavel <i>Dianthus caryophyllus</i>	19
1.5. Contaminación del suelo por uso de productos químicos en Cultivos de Clavel.....	19
1.6. Respuesta a fungicidas	21
1.6.1. Thiodicarb (CARBIN 350 SC).....	21
1.6.2. Acetamiprid (ACETAMIPRID 20 SP)	22
1.6.3. Fipronil (REGENT® 200 SC).....	22
1.6.4. Clorotalonil (DACONIL 720).....	22
1.6.5. Dicofol+ Tetradifom (ACARIN T).....	23
1.6.6. Metamidofos (METHAN 600).....	23
1.6.7. Carbendazim (Arbendazim 50).....	24

1.6.8.	Profenofos (Profenofos 50% EC).....	24
1.6.9.	Mancozeb (Mancozeb 80% WP)	25
1.6.10.	Carboxín + Captan (VITAVAX 400)	25
1.6.11.	Pentacloronitrobenzeno (TERRACLOR® 75 %).....	26

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	27
2.1	Tipo y diseño de la Investigación.....	27
2.1.1.	Por el propósito perseguido.....	27
2.1.2.	Por la clase de medios utilizados para obtener los datos.....	27
2.1.3.	Por el nivel de conocimientos que se adquieren	27
2.1.4	Por el tipo de enfoque	28
2.2.	Materiales.....	28
2.2.1.	Campo	28
2.2.2.	Laboratorio.....	28
2.2	Diseño Experimental.....	29
2.2.1.	Método por enfrentamiento dual:.....	29
2.2.1	Compatibilidad con Fungicidas y Trichoderma spp.	31
2.2.2.	Compatibilidad con Fungicidas y Trichoderma spp.	32
2.3	Unidad de Análisis	32
2.4	Población de estudio	32
2.5	Tamaño de muestra	32
2.6.1.	Material biológico	33
2.7	Técnicas de recolección de datos	33
2.7.1.	Fase de campo.....	33
2.7.1.1	Localización del área de campo.	33
2.7.2.	Fase de laboratorio	33
2.7.2.2.	Medición del pH.....	34
2.7.2.4.	Medición de la Materia Orgánica.....	35
2.7.2.5.	Aislamiento, purificación del Fusarium spp.	36
2.7.2.6.	Identificación del Fusarium spp.	36
2.7.2.7.	Determinación del Ritmo de Crecimiento del Fusarium spp.	36
2.7.2.8.	Aislamiento, purificación del antagonista Trichoderma spp.....	37
2.8.	Pruebas de eficacia in vitro de resistencia de Trichoderma spp. frente a Fusarium spp.....	39
2.8.1	Método 1 enfrentamiento dual	39

2.8.2	Método 2: colocación de discos invertidos	39
2.8.3	Método 1: por compuestos volatilizados.....	39
2.9.	Evaluación de compatibilidad in vitro de resistencia de Trichoderma spp. frente a agroquímicos.....	40
2.10.	Evaluación compatibilidad in vitro de resistencia de Fusarium spp. frente a fungicidas químicos.....	41

CAPÍTULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	42
3.1.	Aislamiento y purificación de Fusarium spp.....	42
3.2	Aislamiento y Purificación De Trichoderma spp.	42
3.5	Identificación Morfológica de la Cepa de Trichoderma spp.....	46
3.6	Identificación morfológica de Fusarium spp.....	47
3.7	Actividad antagonica in Vitro de las cepas de Trichoderma spp. frente a Fusarium redolens y Fusarium oxysporum	49
3.7.1	Determinación Del Tipo De Antagonismo.....	50
3.7.1.1	Método 1: enfrentamiento dual	50
3.7.2	Método 2: Colocaciones de discos invertidos sobre el patógeno.....	52
3.7.3	Método 3: Por compuestos volatilizados.	52
3.8.	Evaluación física de la compatibilidad in Vitro de los aislamientos de Trichoderma spp. frente a productos agrícolas sintéticos utilizados por la Florícola Happiness Flowers	54
3.9.1.1.	Clorotalonil	71
3.9.1.2.	Carbendazim	72
3.9.1.3.	Mancozeb.....	72
3.9.1.4.	Carboxín + captan	73
3.9.1.5.	Pentacloronitrobenzeno.....	74
3.9.2.	Evaluación estadística de la compatibilidad con respecto a la velocidad de crecimiento de Fusarium spp.	74

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía de <i>Trichoderma</i> sp.....	12
Tabla 1-2:	Tabla de medición del porcentaje de inhibición del crecimiento	30
Tabla 2-2:	Productos agroquímicos evaluado frente a <i>Trichoderma</i> spp.....	31
Tabla 3-2	Fungicidas a evaluar sobre <i>Fusarium</i> spp.	32
Tabla 1-3	Análisis de Varianza y Tukey, para el ritmo de.....	44
Tabla 2-3.	Análisis de varianza del ritmo crecimiento.....	45
Tabla 3-3	Datos de medición de conidios y filiales de.....	46
Tabla 4-3:	Datos de medición de macroconidias para la identificación	48
Tabla 5-3:	Cuadro de análisis de la varianza del coeficiente de	51
Tabla 6-3:	Porcentaje de inhibición del crecimiento.....	51
Tabla 7-3:	Porcentaje de inhibición micelial.....	54
Tabla 8-3:	Pesticidas utilizados en la Florícola Happiness Flowers, tipo de pesticida y la dosis aplicada para la evaluación	55
Tabla 9 -3:	Cuadro de Análisis de la Varianza a las 76 h; coeficiente de variación de la velocidad de crecimiento al 33,13%	68
Tabla 10-3:	Cuadro prueba Tukey al 5% las 76 horas, coeficiente de variación al 33,13%	68
Tabla 11-3:	Fungicidas de evaluación de compatibilidad.....	70
Tabla 12-3:	Cuadro de Análisis de la Varianza a las 72 horas de crecimiento <i>F. redolens</i> y <i>F. oxysporum</i> con un coeficiente de variación 1,94%,.....	75
Tabla 13-3:	Prueba de Tukey al 5% de comparación de medias de la velocidad de crecimiento <i>F. Redolens</i> y <i>F. oxysporum</i>	75
Tabla 14-3	Test de Fisher.....	76

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2:	Tamiz con la muestra Suelo.....	34
Fotografía 2-2.	Medición de la muestra de suelo en cilindros.....	35
Fotografía 3-2.	Diluciones del suelo para aislar Trichoderma spp.....	37
Fotografía 4-2.	Inicio del crecimiento radial del antagonista.....	38
Fotografía 5-2.	Agroquímicos a evaluar sobre Trichoderma spp.....	40
Fotografía 6-2.	Inicio de crecimiento de Fusarium spp.sobre fungicida.....	41
Fotografía 1-3.	Aislamiento de Fusarium spp.....	42
Fotografía 2-3.	Aislamiento de Trichoderma spp.....	43
Fotografía 3-3.	a) Aislamiento de Trichoderma harzianum.....	47
Fotografía 4-3.	a) Crecimiento de F. redolens en cajas Petri.....	49
Fotografía 5-3.	a) Aislamiento 1 Fusarium spp Vs Trichoderma spp. a los 120 horas;.....	50
Fotografía 6-3.	Cultivos de discos invertidos sobre el patógeno.....	52
Fotografía 7-3.	Cultivo de Trichoderma spp. Vs Fusarium spp. por compuestos volátiles.....	53
Fotografía 8-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre Thiodicarb.....	56
Fotografía 9-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre Acetamiprid.....	57
Fotografía 10-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre fipronil.....	58
Fotografía 11-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre clorotalonil.....	59
Fotografía 12-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre dicofol + tetradifon.....	60
Fotografía 13-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre metamidofos.....	61
Fotografía 14-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre Carbendazim.....	62
Fotografía 15-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre profenofos.....	63
Fotografía 16-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre mancozeb.....	64
Fotografía 17-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre carboxin+captan.....	65
Fotografía 18-3.	Compatibilidad de Trichoderma sobre pentacloronitrobenceno.....	66
Fotografía 19-3.	Compatibilidad de Fusarium spp. sobre clorotalonil.....	71
Fotografía 20-3.	Compatibilidad de Fusarium spp. sobre carbendzim.....	72
Fotografía 21-3.	Compatibilidad de Fusarium spp. sobre mancozeb.....	73
Fotografía 22-3.	Compatibilidad de Fusarium spp. sobre carboxin+captan.....	73
Fotografía 23-3.	Compatibilidad de Fusarium spp. sobre pentacloronitrobenzeno.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Datos del Crecimiento de *Fusarium spp.* y *Trichoderma spp.* transformados

ANEXO B: Datos de la velocidad de crecimiento de *Trichoderma spp.* sobre agroquímicos

ANEXO 3: Datos de la velocidad de crecimiento de *Fusarium spp.* sobre agroquímicos

RESUMEN

El propósito de esta investigación es evaluar *in vitro* la eficacia del uso de *Trichoderma spp.* como método de control biológico de *Fusarium spp.* en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) de la Florícola Happines. A partir de las muestras de suelo y material vegetal, se logró aislar en medio de cultivo agar Potato Dextrose Agar (PDA) e identificar macroscópica y microscópicamente solo una cepa de *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum*) y dos cepas de *Fusarium* (*Fusarium redolens* y *Fusarium oxysporum*), causantes del marchitamiento vascular en las plantas de clavel. Para el análisis del antagonismo entre ambos géneros se aplicaron tres métodos que determinaron los porcentajes de inhibición de crecimiento. Mediante el método dual *Trichoderma harzianum* produjo porcentajes de inhibición del 20,3% para *Fusarium redolens* y 26,9% para *Fusarium oxysporum*, mientras que por el método de compuestos volatilizados se obtuvo un 35,23% y 27,5% respectivamente. Mediante el método de discos invertidos no hubo crecimiento por lo que no se pudo evaluar el porcentaje de inhibición. En las pruebas de compatibilidad entre *Trichoderma harzianum* y los distintos compuestos químicos utilizados, se observó una fuerte inhibición del crecimiento micelial frente a los fungicidas carbendazim, pentacloronitrobenzeno y acaricida profenofos. Los fungicidas carboxín + captan, mancozeb y clorotalonil, y los insecticidas thiodicarb y dicofol + tetradifom, fueron ligeramente compatibles con esta especie. Los insecticidas y/o acaricidas acetamiprid, metamidofos y Fipronil mostraron mayor compatibilidad con este agente de control biológico, provocando únicamente algunas variaciones en su apariencia. Para *Fusarium spp.* los fungicidas que presentan una mayor actividad inhibitoria son: carbendazim, pentacloronitrobenzeno y carboxín + captan. Debido a que *Trichoderma harzianum* no es capaz por si solo de controlar el crecimiento de *Fusarium spp.* y a que solo el carboxin + captán permite el crecimiento de *Trichoderma harzianum* e inhibe el de *Fusarium spp.*, para el control de estos patógenos se recomienda un tratamiento combinado de carboxín + captan a dosis bajas e inoculación de *Trichoderma harzianum*, para el correcto funcionamiento de este tratamiento combinado se debería eliminar el uso del profenofos, sustituyéndolo por acetamiprid o fipronil.

Palabras claves: <BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL>, <MICROBIOLOGÍA>, < HONGO (*Trichoderma harzianum*)>, < HONGO (*Fusarium redolens*)>, < HONGO (*Fusarium oxysporum*)>, <CRECIMIENTO DE HONGOS>, < PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO>, <AGROQUÍMICOS>

SUMMARY

The purpose of this research is to evaluate *in vitro* the efficacy of *Trichoderma spp.* use as a method of biological control of *Fusarium spp.* in the cultivation of carnation (*Dianthus caryophyllus*) of Happiness Flowers Growing. From soil samples and plant material, it goes to isolate in medium of crop Agar Potato Dextrose (PDA) and identify macroscopic and microscopic only a strain of *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum*) and two strains of *Fusarium* (*Fusarium redolens* and *Fusarium oxysporum*), causing vascular wilting in carnation plants. For the analysis of the antagonism between both genders three methods that determined the percentage of inhibition were applied. By dual method *Trichoderma harzianum* produced inhibition percentages of 20.3% for *Fusarium redolens* and 26.9% *Fusarium oxysporum*, whereas the method of volatilized compounds obtained a 35.23% and 27.5% respectively. By the method of inverted discs there was no growth so it could not assess the percentage of inhibition. In compatibility tests between different *Trichoderma harzianum* and different chemical compounds used, a strong inhibition of mycelial growth was observed compared with fungicides carbendazim, pentachloronitrobenzene and acaricide profenofos. The fungicides carboxin + captan, mancozeb and chlorothalonil, and insecticides thiodicarb and dicofol + tetradifom, were slightly compatible with this species. Insecticides and/or acaricides acetamiprid, methamidofos and fipronil showed greater compatibility and with this biological control agent, causing only some variations in appearance. For *Fusarium spp.* fungicides having a higher inhibitory activity are: carbendazim, pentachloronitrobenzene and carboxin + captan. Because *Trichoderma harzianum* is not able by itself to control the growth of *Fusarium spp.* and that only carboxin + captan let the growth of *Trichoderma harzianum* and inhibits the one of *Fusarium spp.*, for the control of these pathogens recommended a treat combined of carboxin + captan to low doses and inoculation of *Trichoderma harzianum*, for the correct development of this combined treat it should delete the use of profenofos, substituting it by acetamiprid or fipronil.

Keywords: <ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <(Trichoderma harzianum) FUNGUS >, <(Fusarium redolens) FUNGUS >, <(Fusarium oxysporum) FUNGUS>, <FUNGUS GROWTH>, <PERCENTAGE GROWTH INHIBITION>, <AGROCHEMICALS>

INTRODUCCIÓN

Identificación del Problema

La agricultura en el Ecuador es muy significativa para su economía. El control de las plagas que afectan a los cultivos es uno de los problemas más comunes en este sector debido a las pérdidas económicas que acarrear. La fumigación excesiva con productos químicos (Ej: pesticidas, herbicidas, plaguicidas, insecticidas y fungicidas) para el control de estas plagas puede producir problemas de contaminación ambiental de suelo, agua y aire. Para paliar el efecto de esta contaminación, se intentan desarrollar alternativas que disminuyan el uso de estos compuestos tóxicos, pues muchos de ellos pueden acumularse y causar el deterioro de suelo y fuentes de agua natural, e incluso disminuir la actividad biodegradadora de algunos microorganismos. Por ejemplo, se ha prohibido el uso “Mercaptan” para el control de los hongos patógenos en Chile debido a que es tóxico para los peces y puede contaminar fuentes y depósitos de agua naturales al limpiar equipos o vaciando sobrantes del producto. Además, mediante su filtración a través del riego de terrenos fumigados con estos productos, pueden alcanzar fuentes de agua subterráneas que pueden ser usadas para el consumo humano (Cervantes, 2015). Por esta razón es necesario investigar distintas alternativas al uso de los productos químicos cotidianos para el control de estas plagas, ya que en la actualidad se presentan multitud de resistencias a los mismos. Entre estos métodos alternativos estaría la aplicación de productos orgánicos y/o biológicos amigables con el medio ambiente, aunque su uso no está muy extendido entre los agricultores por la falta de conocimiento y los problemas de abastecimiento que presentan.

El suelo presenta un amplio número de distintas especies de microorganismos. La diversidad y abundancia de los mismos dependen en gran medida de la composición y concentración de los nutrientes agregados al sustrato para las plantas. La interacción entre los microorganismos y los cultivos puede ser beneficiosa, dañina o neutral, y en ocasiones esto puede variar en función de las condiciones del suelo. Entre las enfermedades introducidas en el país en los últimos años relacionadas con el cultivo del clavel se encuentra el marchitamiento vascular producido por patógenos que afectan a la producción (Garcés, 2001). Estas enfermedades se vuelven persistentes debido a su fácil propagación a partir de material infectado y por su alta resistencia en el suelo, como es el caso de *Fusarium spp.* La aplicación de vapor al suelo y algunos fumigantes (Metán-sodio, Basamid®, metilsotiocianato, entre otros), son empleados con frecuencia para el manejo

de ésta enfermedad. En muchas ocasiones las plagas causadas por este género se vuelven resistentes a fungicidas químicos que pueden contaminar al suelo y aguas subterráneas, o volatilizarse y permanecer en el aire durante años. A veces el control químico no presenta la suficiente eficiencia frente a este problema debido a que este hongo fitopatógeno tiene una fácil propagación a través de esporas que pueden ser arrastradas por aire o agua. A causa de la dificultad que entraña el control de este patógeno, es necesario potenciar su control biológico mediante la acción de agentes biológicos beneficiosos. (Garcès, 2001).

Las Plantaciones florícolas en el Ecuador combaten plagas que afecta a su producción y dificulta la exportación de sus productos. En el caso de la Finca Florícola Happiness Flowers, el cultivo del clavel (*Dianthus caryophyllus*) se ve frecuentemente afectado por *Fusarium spp.*, por lo que muchas veces la empresa se ve obligada a usar fungicidas químicos sintéticos que son difíciles de biodegradar y que pueden llegar a producir contaminación ambiental. Algunas de las estrategias alternativas usadas por esta empresa se basan en el uso de variedades de clavel más resistentes a *Fusarium spp.*, o rotar los cultivos de clavel. Este tipo de estrategias generan gastos y pérdidas en estas empresas Florícolas, por lo que la búsqueda de procedimientos más rentables constituye una de sus principales preocupaciones. Como alternativa de tratamiento se suelen importar productos biológicos de otros países, lo cual genera gastos excesivos en la producción del Clavel, además de no ser lo suficientemente fiables y efectivos. Además, la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), a través del departamento de coordinación de Sanidad Vegetal, intenta mejorar el estatus fitosanitario del país mediante la prevención y apoyo al manejo de plagas para la producción de plantas a través de productos amigables con el ambiente. En caso de que un determinado cultivo presente problemas a causa de plagas, el producto florícola no puede ser exportado, con las importantes repercusiones económicas que ello conlleva (AGROCALIDAD, 2016).

Justificación de la Investigación

Las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos causan pérdidas severas en la agricultura. Estas mermas consisten en la reducción de la calidad o la cantidad de la cosecha obtenida. La forma tradicional para el control de las enfermedades en cultivos es la aplicación de productos químicos, pero debido a su composición pueden resultar tóxicos e inespecíficos y dañar a la flora. Por ello es necesario la búsqueda de alternativas orientadas al manejo de agentes antagonistas que sean eficientes y compatibles con el ambiente (Hernandez et. al, 2011, p. 2). En la producción agrícola, el uso de plaguicidas biológicos como alternativa a plaguicidas sintéticos está aumentando rápidamente debido a la preocupación que presenta la sociedad en temas de salud pública, de seguridad agroalimentaria de los productos de consumo y de impacto ambiental producido por la actividad humana (Mörner, et al., 2002, pp. 2-3).

El auge de las plantaciones de flores en el país se ha ido incrementando a lo largo de los años. Las empresas floricultoras deben certificar sus productos a través de FlorEcuador® Certified. Esta institución nació en el 2005 y está enfocada al control de la producción de empresas dedicadas al cultivo o exportación de flores en el territorio ecuatoriano. Su misión es controlar que estas empresas cumplan las normas ambientales establecidas en la legislación vigente, tales como: la protección del agua mediante los sistemas de riego, disminuir la contaminación del recurso suelo, y uso seguro y eficaz de plaguicidas. Este último punto no tiene en cuenta la protección ambiental, siendo formas tradicionales de controlar las plagas en el cultivo de clavel (Barberá, 1990). Sin embargo, en determinadas enfermedades de estos cultivos producidas por fitopatógenos como *Fusarium spp.*, ningún método de desinfección del suelo resulta totalmente efectivo, por lo que la tendencia actual está cada vez más dirigida hacia la utilización de sustratos axénicos y hacia los cultivos hidropónicos (Carrasco, 2005, p. 56). La principal enfermedad del clavel es la Fusariosis, provocada por *Fusarium oxysporum fsp dianthi* (Ares, 2000). En muchos cultivos se han visto abocados a cambiar de especies de flor de corte o a alterar los métodos de cultivo, puesto que el patógeno una vez contamina el suelo persiste en él durante años. La enfermedad producida por *Fusarium spp.* no presenta un control químico eficiente, por lo que todas las medidas para su control están enfocadas en prevenir el ingreso de la enfermedad utilizando material sano y/o evitando utilizar suelos con historial de *Fusarium oxysporum* (Ares, Urquijo, Tello, 2000, p. 183). Tal y como se ha mencionado anteriormente, el cultivo del clavel de la Finca Florícola Happiness Flowers se ve afectado frecuentemente por *Fusarium spp.*, por lo que muchas veces la empresa se ve obligada a usar fungicidas químicos sintéticos que son difíciles de biodegradar y que pueden llegar a producir contaminación ambiental. Esto evidencia la necesidad de potenciar el control

mediante métodos biológicos a través de la acción de microorganismos beneficiosos, como es el caso de *Trichoderma spp.*

La utilización de microorganismos como biofungicida para combatir, prevenir, erradicar y controlar a las enfermedades producidas por plagas de hongos fitopatógenos es una práctica natural y efectiva, y resulta beneficiosa para los suelos, la naturaleza y el hombre (Robles, 2016, pp. 34-35). El género *Trichoderma* engloba a una serie de especies de importancia biotecnológica que presentan vida libre en suelos y ecosistemas de raíz, donde se pueden observar interacciones complejas entre la planta huésped, los patógenos y diversos factores del ambiente (Hernandèz, 2010, p. 177). Algunas de estas especies son usadas como agentes de biocontrol contra enfermedades de plantas, para la producción de enzimas y antibióticos, en la biorremediación de ambientes contaminados, y como fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas. En base a algunos estudios morfológicos se han identificado las especies: *T. spirale*, *T. asperellum*, *T. virens*, *T. harzianum* y *T. koningii* (Sanchèz, 2011, pp. 1-6). El uso de las especies de *Trichoderma spp.* es bastante aceptado, estando incluso permitido en las normas de la Agricultura Ecológica de la Unión Europea (Flores, 2015, pp. 7-8). Según la Revista Colombiana de Biotecnología se tienen reportes de que *Trichoderma* induce el crecimiento vegetal al degradar el epispermo de la semilla e interviene en los procesos respiratorios durante la germinación. Además acelera el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan el volumen, la altura, así como el peso de la planta. Este hongo secreta fitohormonas como el ácido Indol Acético que estimula la germinación, el crecimiento y desarrollo radicular, y mejora la asimilación de nutrientes, lo que influye en el crecimiento vegetativo de cultivos como en nuestro caso el clavel (Hernández, et al, 2011, p. 2).

Debido a que ningún método de eliminación de *Fusarium spp.* del suelo resulta totalmente efectivo, a que la fusariosis no tiene control químico eficiente, y a la posibilidad de que *Trichoderma spp.* se pueda presentar como un potencial agente biocontrolador de esta enfermedad, se considera necesario evaluar el posible uso de *Trichoderma spp.* como método de control biológico de *Fusarium spp.* en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Con la identificación de *Trichoderma spp.* y su posible uso en la plantación de clavel para el tratamiento de *Fusarium spp.* se posibilitaría su utilización como una alternativa al uso de los fungicidas químicos que en la actualidad se aplican para el control de este patógeno y que presentan un alto riesgo de producir contaminación ambiental.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar *in vitro* la eficacia del uso de *Trichoderma spp.* como método de control biológico de *Fusarium spp.* en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) de la Florícola Happinnes Flowers como alternativa al uso de fungicidas químicos, y así reducir el riesgo de contaminación ambiental.

Objetivos Específicos

- Comprobar la presencia de *Trichoderma spp.* en el suelo con cultivos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en los que *Fusarium spp.* esté afectando a las plantas, y en suelo de cultivo en los que no se esté produciendo esta afectación.
- Aislar e identificar cepas de *Trichoderma spp.* y de *Fusarium spp.* presentes en los suelos de la Florícola Happiness Flowers.
- Determinar *in vitro* el efecto antifúngico de las cepas de *Trichoderma spp.* obtenidas en la Florícola Happiness Flowers sobre las cepas de *Fusarium spp.* de la misma procedencia mediante la inoculación artificial en Papa Dextrosa Agar (PDA).
- Determinar la compatibilidad del uso simultáneo de *Trichoderma spp.* con compuestos químicos para el control de plagas de uso habitual en la producción floral.
- Comparar la efectividad del uso de *Trichoderma spp.* en el control de *Fusarium spp.* respecto al uso fungicidas químicos que pueden causar contaminación del suelo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Actualmente se intenta proteger al medio ambiente del uso indebido de fungicidas químicos que sirven para combatir a las enfermedades causadas por plagas en los cultivos de diferentes especies de planta como por ejemplo el clavel. Para ello se suelen buscar alternativas que remplacen a estos agroquímicos y así evitar las contaminaciones ambientales severas producidas por su acumulación en el suelo y los efectos negativos asociados a ella. Además, estos compuestos químicos pueden afectar a la población de microorganismos benéficos, pudiendo incluso producir la inhibición de los polinizadores. Según Flores, V:

“El uso de bioproductos o biopesticidas hoy en día constituye una necesidad económica y ecológica, convirtiéndolos en insumos económicamente atractivos para los productores del campo, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia representando poco o ningún riesgo para la salud humana o el medio ambiente”.

(Flores, 2015, p. 5)

Las medidas de control que se implementen deben de ser científicamente correctas y técnicamente eficaces, con una revalorización de las prácticas de control sobre el patógeno a medio y largo plazo, y con efectos potencialmente estables a largo plazo. Bajo esta óptica la utilización de microorganismos para el control de las enfermedades de las plantas encaja tanto en las técnicas de cultivo tradicionales como en las ecológicas.

En estos últimos años se ha visto en la necesidad de potenciar el uso de agentes biológicos para el control de plagas, creando una competencia natural entre la plaga y el organismo benéfico que permita el desarrollo normal de la planta. El Control Biológico (C.B) de plagas a través de la utilización de organismos vivos resulta ser una alternativa beneficiosa, eficaz, económica y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso indiscriminado de agroquímicos (Bettiol, et al, 2013, p. 385). En el C.B. de enfermedades se utilizan microorganismos antagonistas antes o después de que se presenten los fitopatógenos que interfieren en la supervivencia de las plantas en el sitio de infección. Además del control del patógeno, se busca lograr seguridad alimentaria para poder adquirir alimentos libres de tóxicos y para llevar una vida sana. Referencia Es necesario conocer a los organismos benéficos, aprender de sus hábitos e identificar la función que tienen para regular a las poblaciones dañinas, pudiendo reducir así el uso de plaguicidas. Para ello se necesitan realizar esfuerzos para desarrollar cada vez más

productos a base de organismos antagonistas que actúen contra patógenos de enfermedades foliares.

En este sentido, se han obtenido resultados satisfactorios de control biológico de fitopatógenos con especies del género *Trichoderma spp.* en un rango amplio de enfermedades del follaje, debido a su gran capacidad de parasitar, competir por nutrientes o producir compuestos que resultan antagónicos para una gran variedad de hongos fitopatógenos, como por ejemplo los géneros *Rhizoctonia spp.*, *Fusarium spp.* y *Pythium spp.*. Debido a su capacidad antagónica ampliamente estudiada, se ha propuesto la utilización de *Trichoderma spp.* como biofungicida para evitar el uso de compuestos sintéticos. El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable, dadas las características de ser eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en algunos cultivos. Asimismo, se requiere detectar la presencia y diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de control biológico (Casimiro, 2009, p. 3). Las especies del género *Trichoderma* también pueden mejorar en el suelo la disponibilidad de nutrientes, la descomposición y la biodegradación, por lo que pueden ser utilizadas para procesos de biorremediación de suelos.

Según Mesas (2014), los beneficios de la utilización de agentes de control biológico (ACBs) son:

- i. Una acción sobre el patógeno menos radical, que conlleva la no aparición de resistencias.
- ii. Una cierta permanencia de los ACBs aunque sujeta a controles regulatorios (climático y biótico).
- iii. Una acción de los ACBs sin afectar a la biodiversidad biológica (parámetro que influye en el desarrollo de las enfermedades).
- iv. Un escaso/nulo riesgo de contaminación ambiental y sobre la salud, ya que no está documentado que la introducción de los ACBs aumente los niveles de toxinas ni se ha demostrado que sus metabolitos entren en la cadena trófica.
- v. Distintas cepas del género

El género *Trichoderma* está ampliamente documentado como ACBs, presentando un amplio espectro de acción. Aunque en el pasado se ha dado mucho énfasis en su acción directa sobre el patógeno y en su capacidad de sintetizar toxinas, antibióticos y enzimas, sus mecanismos de acción son más amplios (Casanova, 2010, pp. 23-25). También compiten indirectamente con el patógeno por espacio y nutrientes y pueden tener un efecto protector sobre la planta colonizando las raíces, promoviendo el crecimiento o induciendo respuestas de resistencia. Algunos de estos

efectos pueden actuar conjuntamente, y su importancia en el control de enfermedades depende de cada cepa de *Trichoderma*, del patógeno, de la especie vegetal y de las condiciones ambientales.

En relación a esto, en un estudio sobre evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes del clavel durante la etapa de enraizamiento, se comparó la actividad antifúngica de distintos fungicidas químicos y organismos biológicos en el cultivo del clavel. En este estudio aislaron *Trichoderma spp.* y obtuvieron resultados positivos antagónicos con mayor actividad que carboxin + captan, procloraz, etridiazol, y metalaxil + Mancozeb (Alonso & Sandoval, 2008, pp. 5-10). Siguiendo este contexto, en otro estudio se evaluó de la capacidad antagónica *in vivo* de 6 especies de *Trichoderma spp.* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, una de las cuales una fue comercial. Este autor observó que la especie comercial presentó menor porcentaje de crecimiento, demostrándose la importancia de aislar *Trichoderma spp.* nativa en cada cultivo para que estos agentes biológicos sean más efectivos (Tobar, 2008, pp.17-20). Según un estudio en el que se evaluaron tres cepas de *Trichoderma spp.* para el control de *Fusarium sp.* en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis var flavicarpa*), la utilización de *Trichoderma spp.* como biocontroladores es una de las alternativas más importantes hoy en día para el manejo de la enfermedad causada por género *Fusarium*, además de ser un método más amigable con el ambiente (Lozano, 2013 p. 13).

En la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se realizó un estudio del efecto antagónico de cepas nativas de *Trichoderma spp.* frente a *Mycosphaerella fijiensis* en plantas de banano a nivel de invernadero. En esta investigación se aislaron, se purificaron y se identificaron molecularmente alrededor de 10 cepas de *Trichoderma spp.* tomadas de varias plantaciones bananeras en la región costa del Ecuador. Estas especies fueron utilizadas como control biológico frente a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), resultando ser efectivas y mostrándose como una buena alternativa para el uso de fungicidas evitando de tal manera el daño en el ambiente (Flores, 2015 p. 5-100).

1.2 Bases Teóricas

Los residuos tóxicos productos del uso continuo de pesticidas, afectan la salud de los trabajadores y deterioran el ambiente. Como medida alternativa, se ha planteado el uso del control biológico para buscar la reducción de la actividad del inóculo o actividades de un patógeno, a través de la acción natural de uno o más microorganismos o sustancias microbianas, produciendo la manipulación del ambiente, huésped o antagonistas, o por una introducción masiva de uno o más microorganismos (Márquez, et. al., 2002)

1.2.1. Importancia del cultivo de clavel en el Ecuador

Los centros de producción mundial de cultivos de floricultura siguen innovando. Ecuador sigue avanzado en la producción de flores tratando de reemplazar a Colombia como el mayor centro de producción de flores exportadas en América del Sur. Una tendencia predecible en el mercado internacional de flores es el mayor énfasis en la calidad y la conservación post-cosecha, en las cuales se deben tener en cuenta las influencias ambientales sobre la longevidad de flores, así como la influencia de los microorganismos patógenos, como los virus, en su deterioro. A medida que la competencia en el mercado de flores aumenta en el mundo, la calidad se convierte en un factor más importante. (Insider, 2014)

El clavel es una de las principales flores de exportación en Ecuador y representa un rubro importante dentro de la economía agrícola del país. Su cultivo se extiende por diversos puntos de la región interandina generando fuentes de trabajo directo e indirecto. Por esta razón resulta importante la investigación y diseño de métodos eficientes de control de enfermedades radiculares en clavel. Estos cultivos deben ser sostenibles y sustentables, para de esta manera poder alargar la vida productiva de esta flor y generar así mejores oportunidades para los floricultores que se dedican a su producción, permitiendo tener una herramienta aplicable que sirva de guía para el correcto manejo de producciones de clavel. (Acurio, 2012, p.7)

1.2.2. Control Biológico Microbiano

Es una técnica en la que se utilizan microorganismos como Agentes de Control Biológico. Se puede emplear en la agricultura mediante la utilización de enemigos naturales de plagas particulares para reducir sus poblaciones para evitar las pérdidas económicas y de producción que éstas producen. Se pueden clasificar en dos tipos de acuerdo a los mecanismos en los que actúan, para matar o para inhibir directamente a plagas de fitopatógenos. El grupo definido como los generalistas, incluye a especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, *Clonostachys*, levaduras, etc., y son capaces de controlar un amplio espectro de patógenos. El grupo de especialistas incluye especies de biocontrol de los géneros *Agrobacterium*, *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, etc., que pueden contrarrestar sólo uno o algunos patógenos específicos. Los mecanismos de acción biológica de control incluyen el parasitismo directo o microparasitismo, la secreción de numerosas sustancias líticas, y la competencia por nutrientes o nichos ecológicos (Woo, et al., 2014, p. 76-85).

1.2.3. Antagonismo

El antagonismo es la interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de uno de ellos, como por ejemplo la acción de los antibióticos frente a las bacterias. Los antagonismos se pueden generar mediante la producción de metabolitos biológicamente activos en ciertas especies de plantas, animales, bacterias y hongos, y que pueden tener efecto en algunas plagas. Estas plagas por lo general son combatidas sintéticamente pudiendo causar daños en el suelo, el aire o el agua. Se ha demostrado mediante pruebas de laboratorio que tales fenómenos ecológicos sirven como importantes modelos en el descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos fúngicos de uso en la agricultura y en el medio ambiente. Las especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente utilizadas y estudiadas como agentes antagonistas frente a varias plagas de hongos. También se ha propuesto su uso como potenciadoras del crecimiento de plantas. Algunos de los factores clave que contribuyen a su acción antagónica son su alta tasa metabólica, su producción de metabolitos secundarios y su conformación fisiológica (Asgar & Pessarakli, 2010 p. 10).

El antagonismo puede estar producido por una relación de microparasitismo, por una relación de competencia en la que los organismos compiten por espacio y nutrientes, secretando enzimas y metabolitos secundarios que afecten a la otra especie, o por la inducción de sistemas de defensa de la planta. (Chincholkar & Mukerji, 2007)

1.2.4. Aspectos generales del género Trichoderma

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, y que son capaces de descomponerla. En determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Infante, et. al., 2009, p. 2). No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la supervivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizosfera de la planta.

La actividad de *Trichoderma* en diversas plantas se limita al control de las enfermedades que son causadas por fitopatógenos. Su persistencia en el suelo, en particular en la rizosfera, no genera daños en la planta, más bien *Trichoderma* le otorga una serie de ventajas a largo plazo por su capacidad de activar de mecanismos de defensa y anticipar el ataque de patógenos, mejorar el crecimiento de la planta y por lo tanto la producción, incitar la respiración de la planta mejorando la fotosíntesis o la eficiencia fotosintética, y aumentar la capacidad de la planta para resistir estreses abióticos como la sequía, la salinidad o la temperatura alta (Druzhinina, Kopchinskiy, 2008, p.753)

Según Harman (1993) *Trichoderma spp.* es un hongo imperfecto, de color verde brillante, amarillo, o inclusive blanco, debido a que conidios que se forman en las puntas de las hifas. Los conidióforos son altamente ramificados y por lo tanto difíciles de definir o medir. A menudo forman colonias en anillos concéntricos separados y son transmitidas a lo largo de las escasas hifas aéreas. En sustrato de agar de dextrosa de patata (PDA) toman un color blanquecino y a medida que avanza su crecimiento toma un color blanco más intenso para luego tomar el color que habitualmente toma *Trichoderma spp.* Su crecimiento es rápido y resistente, demostrando efectos antimicrobianos positivos para la planta en el control de fitopatógenos (Harman, 2000, pp. 84-337). En los cultivos su crecimiento oscila en temperaturas de 25-30 ° C, no mayor a 35 ° C, aunque este factor varía de acuerdo a la especie de *Trichoderma spp.* Las colonias en un principio son transparentes sobre los medios de crecimiento o de interacción tales como agar harina de maíz dextrosa (CMD), o blanco en medios ricos tales como PDA (Schuster & Schmoll, p. 787).

El género *Trichoderma spp* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos, y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos. *Trichoderma* se ubica taxonómicamente según Villegas, en la siguiente tabla (Villegas, 2005):

Tabla 1-1: Taxonomía de *Trichoderma sp.*

Reino:	Fungi.
División:	Mycota
Subdivisión:	Eumycota
Clase:	Hyphomycetes.
Orden:	Moniliales.
Familia:	Moniliaceae.
Género:	<i>Trichoderma.</i>

Fuente: Villegas, 2005

Elaborado por: Díaz E, 2016

Según Woo et al (2014), las principales ventajas de utilizar *Trichoderma spp.* y sus derivados bioactivos (enzimas y otras proteínas o metabolitos secundarios) son:

- La eliminación de las limitaciones asociadas con el desarrollo, la aplicación y conservación de los productos que contienen microorganismos.
- La eficacia en el campo se mantiene siendo dependiente de la dosis de la sustancia activa utilizada.
- Algunas aplicaciones son más eficaces, tales como pulverización foliar para el control de patógenos aéreos.
- El efecto directo sobre la planta se puede mejorar y ser más reproducible

- Se reduce la sensibilidad a los cambios en las condiciones ambientales
- La posibilidad de desarrollar mezclas sinérgicas de gran actividad que contiene tanto las sustancias bioactivas como los organismos vivos.

Las cepas de *Trichoderma* pueden también biodegradar compost y actuar como competidores de hongos patógenos en sus fases de saprofitas, especialmente cuando los nutrientes son un factor limitante. Son también reconocidos por su potencial en biotecnología y fitobiorremediación mediante degradación de compuestos tóxicos contaminantes, principalmente en el ambiente del suelo (Campbell, 1989, pp. 50). La versatilidad de *Trichoderma spp.* se extiende a su adaptabilidad a diferentes entornos ecológicos o a situaciones agrícolas, así como a su compatibilidad con numerosos cultivos de uso general, con productos de protección y con otros agentes de control biológico. También presenta sinergismo con muchos pesticidas químicos y otros recursos naturales compuestos, permitiendo así una reducción en la dosis de pesticida.

1.3. Uso de Trichoderma para el control de enfermedades.

Trichoderma spp. es uno de los hongos más usados como agente de control biológico, y ha sido ampliamente investigado alrededor del mundo. El principal mecanismo de antagonismo en *Trichoderma* es el micoparasitismo. La actividad lítica es la característica clave responsable de la expresión del micoparasitismo contra varios patógenos fúngicos. Las especies del género *Trichoderma* también son buenos competidores en el suelo y son productores de compuestos volátiles y no volátiles (Harman & Kubicek, 2005: p. 152-157).

Trichoderma harzianum produce endoquitinasa y enzimas que le permiten consumir hongos patógenos mediante el micoparasitismo (Mora, 2000). Según Harman (2000), el micoparásito crece sobre las hifas del patógeno produciendo B-(1-3) glucanasa y quitinasa que causa exolisis. La exolisis es la disolución de la pared y membrana celular seguida por derrame del contenido celular de la hifa del patógeno que provoca su muerte. También produce sustancias de tipo antibiótico tales como tricodermin y harzianopiricona que causan un efecto antagónico sobre el fitopatógeno, y enzimas de tipo lítico que son capaces de destruir los esclerocios o estructuras de resistencia del fitopatógeno.

1.3.1. Micoparasitismo

Micoparasitismo es un proceso complejo que implica un crecimiento del agente de biocontrol hacia el organismo diana, bobinado y finalmente la disolución de la membrana o pared celular de células del organismo diana por la actividad de enzimas. Los estudios sobre los aspectos moleculares y celulares del proceso de micoparasitismo indican que es un proceso extremadamente complejo que implica varios pasos, numerosos genes separados y productos génicos. *Trichoderma* tiene la capacidad de parasitar a otros hongos. Este micoparásito puede detectar a su huésped desde la distancia y comenzar la ramificación de una manera atípica hacia el hongo. Este proceso es probablemente inducido por gradientes de nutrientes (Benítez et al., 2004, pp. 251-253).

1.3.2. Las enzimas

La mayoría de los hongos patógenos contienen quitina y β -glucanos en sus paredes celulares. En recientes trabajos de investigación se ha demostrado el importante papel de las enzimas de *Trichoderma* en el control biológico de especies. La secreción de enzimas se considera un paso importante dentro del proceso de micoparasitismo. Algunas de las cepas de *Trichoderma* segregan una serie de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas, celulasas, glucanasas y xilanasas (Harman & Kubicek, 2005: p.134-145)

1.3.3. Antibiosis

Según Infante (2009), la antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico.

1.3.4. La competencia en la rizosfera

Es una de las técnicas empleadas en el control biológico. Implica la competencia por los nutrientes entre el biofungicida (*Trichoderma ssp.*) y la enfermedad que afecta a la planta. La actividad de *Trichoderma* en suelos agrícolas y naturales demuestra su capacidad competitiva y por lo tanto su potencial capacidad de biocontrol en cultivo de Clavel.

1.3.5. La producción de sideróforos

Los sideróforos son de bajo peso molecular y su función es la biosíntesis regulada por el hierro que debe ser proporcionado a la célula. La diversidad estructural entre los diferentes sideróforos es bastante considerable y depende de la especie microorganismo de la que se trate. Sin embargo, una característica común de todos los sideróforos es que forman complejos octaédricos de seis coordenadas con ion férrico. El hierro generalmente está presente en el medio ambiente microbiano como ion férrico (Fe (III)), que es prácticamente insoluble en presencia de O₂ y por lo tanto, no está disponible para el crecimiento microbiano. El Hierro es importante en la rizosfera en donde habitan los microorganismos fitopatógenos que presentan una menor capacidad de producción de sideróforos. Si en rizosfera hay una deficiencia de hierro el resultado es una menor infección por patógenos produciéndose un control biológico. Por lo tanto, los sideróforos ayudan a mejorar la actividad antagónica, la competencia en la rizosfera y el crecimiento de las plantas (Woo, et al., 2014, p. 80-85)

1.3.6. Transducción de señales

La capacidad de *Trichoderma spp.* de detectar y responder a diferentes condiciones ambientales, incluyendo la presencia de un huésped potencial, es esencial para la colonización exitosa del suelo, de la materia orgánica y/o de las raíces de las plantas. Estas especies perciben las condiciones ambientales a través de una variedad de vías de transducción que determinan una respuesta celular adecuada (Tucci et al., 2011, p. 351-354).

1.3.7. Trichoderma como un colonizador de compost

Trichoderma puede colonizar y descomponer la materia orgánica muerta. Algunos estudios han demostrado que mejora la descomposición del compost orgánico como el estiércol de vaca, estiércol de aves y cachaza (Kubicek, 2008, p.754). Las especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar el estiércol de vaca que sirve como un excelente sustrato para su multiplicación, no sólo bajo condiciones de laboratorio, sino también en los residuos agrícolas. Además, un análisis de la composición del estiércol de vaca colonizado por *T. harzianum* mostró valores significativamente mayores de contenido soluble en agua total, y de macro y micronutrientes (P, K, S, Zn, Cu y Fe) que el estiércol de vaca no colonizado. (Dinesh & Prateeksha, 2015, p. 20-23)

1.4 Aspectos generales del género Fusarium

Los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico. Su presencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua. Muchas especies del género *Fusarium* tienen una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas. Algunas especies producen toxinas que pueden afectar al hombre y a los animales, o causar infecciones oportunistas. El género *Fusarium* presenta entre 9-78 especies dependiendo del sistema taxonómico utilizado, el cual se basa principalmente en las características culturales de las colonias y en la morfología de sus esporas (Bernal, 2008).

El marchitamiento vascular por *Fusarium* es una enfermedad de clima cálido, más frecuente en suelos ácidos y arenosos, y que se puede propagar fácilmente en cultivos de clavel debido a que muchos de estos se realizan en invernaderos. El patógeno es transmitido principalmente por el suelo infectado y puede permanecer en él hasta diez años. La temperatura de 28 ° C es óptima para el desarrollo del patógeno, aunque puede crecer a una temperatura máxima de 34 ° C y una mínima de 17-20 ° C. Si las temperaturas del suelo son óptimas, pero la temperatura aérea está por debajo de la óptima, el patógeno se extiende por la parte inferior del tallo, pero las plantas no presentarán síntomas externos. En general, los factores que favorecen el desarrollo del marchitamiento son: suelo y aire a temperaturas de 28 ° C, humedad óptima del suelo para el crecimiento, plantas previamente acondicionados con bajo contenido de nitrógeno y fósforo y alto en potasio, bajo pH del suelo, días cortos y baja intensidad de luz. La virulencia del patógeno se ve reforzada por micronutrientes como fósforo, nitrógeno y amonio, y se reduce si el nitrógeno está presente en forma de nitrato (Popovski & Celar, 2013, pp. 106-108).

Fusarium oxysporum es una especie que se encuentran ampliamente distribuidos en todo tipo de suelos de todo el mundo. Son especies de importancia económica, debido a que afecta a diversos cultivos de importación. La identificación de las especies de *Fusarium* se basa principalmente en caracteres distintivos de las formas y tamaños de macro y microconidios, presencia y ausencia de clamidosporas, así como apariciones de colonias, pigmentaciones y las tasas de crecimiento (Acurio, 2010, p. 20)

El hongo se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido y tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Las microconidias son esporas unicelulares, sin septos, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, y rectas o curvadas. Las macroconidias, son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septos transversales con la célula basal elongada atenuada. Las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias, y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes. Las clamidosporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y son las principales responsables de la supervivencia del hongo en tejidos muertos de plantas hospedantes o en el suelo (Prieto et al., 2011, pp. 201-203).

1.4.1. Fusarium redolens.

Es un hongo imperfecto que forma colonias algodonosas de color rosa, tiene sus hifas bien desarrolladas algunas veces flojas, enredadas, fasciculadas o compactas en un esporodoquio o sinema. Rara vez se agrupa en estroma y nunca se presentan en picnidios. Los conidios y conidióforos, son muy diferenciadas entre sí y presentan una amplia variedad de formas. Sus conidióforos son ramificados y verticilados y sus conidios fusiformes o curvos formados por una o varias células, por lo que se dividen en macro y microconidias.

1.4.2. *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*

La enfermedad que produce esta especie se caracteriza por la aparición de síntomas de marchitamiento, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma a causa de la interferencia en el crecimiento. En estados iniciales, en las hojas puede observarse la mitad clorótica y la mitad de un color verde normal. Se observa además un enanismo de los brotes y disminución del crecimiento de la planta. Los síntomas de la enfermedad avanzan hacia arriba afectando a la planta hasta causar un marchitamiento generalizado y la muerte. Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares es una coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y deshilachamiento de los tejidos sin afectar a la médula (Garcés et al., 2001, pp.73-82).

Existen varias técnicas de control para este tipo de fitopatógeno:

1.4.2.1 Químico

Existen diversas técnicas de control químico de *Fusarium oxysporum f.sp.* Frente a la presencia de síntomas de esta enfermedad deben hacerse aplicaciones de formaldehído al 50% para evitar contagio y otros tratamientos a base de Dazomet, Methan Sodio o metil isotiocianato, además de la aplicación de fungicidas sistémicos como Benomyl, Thiabendazol, Carbendazim o metilthiofanato.

1.4.2.2. Físico

La solarización es un método de control físico, ya que los patógenos son afectados por las altas temperaturas que se crean por el efecto invernadero del polietileno colocado sobre el suelo. Es una técnica empleada para el control de muchos patógenos y plagas que captura la energía solar de tal modo que provoca cambios físicos, químicos y biológicos en el suelo. Para ello se coloca una cubierta de polietileno transparente sobre el suelo húmedo durante los meses más calurosos del verano. La solarización es un método muy efectivo para el control de nematodos en el suelo, siendo necesario tener en cuenta el contenido de humedad del suelo al momento de cubrir con plástico el terreno como factor de importancia para tener éxito con la aplicación de esta técnica. El suelo debe conservarse húmedo para incrementar la sensibilidad térmica de los fitopatógenos y facilitar la conducción del calor a través de los poros del suelo (Acurio, 2010, p. 25).

1.4.2.3. Biológico

La problemática de las enfermedades vasculares en clavel (*Dianthus caryophyllus*) tiene mucho que ver con las relaciones poblacionales de microorganismos que se presentan en los suelos o sustratos utilizados. Algunos estudios han mostrado como principales microorganismos benéficos en suelos a los hongos de géneros como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Penicillium*, y a bacterias como *Pseudomonas* (Acurio, 2010, p. 25).

1.4.3. *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* y marchitamiento vascular del clavel *Dianthus caryophyllus*

El marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum f. sp. Dianthi* es una de las enfermedades más limitantes y que mayores pérdidas ha ocasionado en el mundo en los últimos veinte años, a pesar de las diferentes medidas de control aplicadas. Esta enfermedad es la más limitante y la más importante en el cultivo del clavel, debido a la fácil propagación del patógeno a través de esquejes infectados, a la resistencia del hongo a condiciones adversas, y al alto costo y relativa baja eficiencia de las medidas de control utilizadas (Márquez, Martínez & Franco, 2011, p. 86).

1.5. Contaminación del suelo por uso de productos químicos en Cultivos de Clavel

Las propiedades del suelo varían de un lugar a otro con diferencias en la composición del lecho de roca, en el clima, y otros factores. A veces, las cantidades de algunos elementos del suelo y otras sustancias pueden exceder niveles recomendados para la salud de las personas, animales o plantas. Los diversos suelos están formados por la descomposición de la materia orgánica y de la roca a lo largo de muchos años... Ciertos elementos químicos se encuentran naturalmente en los suelos como componentes de minerales, sin embargo, pueden ser tóxicos en algunas concentraciones. Las actividades humanas en la agricultura utilizan diversas sustancias tales como pesticidas, fertilizantes y otros suplementos a los suelos pudiendo causar la contaminación del mismo. Estas sustancias pueden moverse a través del aire y se depositan en el suelo en forma de polvo o por precipitación. (Shayler et al., 2009, pp. 1-6)

Algunos contaminantes orgánicos pueden experimentar cambios químicos o degradarse en productos que pueden ser más o menos tóxicos que el compuesto original. Algunos de estos contaminantes presentan una difícil descomposición pudiéndole llevar años su eliminación del medio ambiente. Sin embargo, sus características pueden cambiar para que puedan ser más o menos fácilmente tomados por las plantas o animales. Diferentes contaminantes varían en su tendencia al:

- Terminar en el agua retenida en el suelo o en el agua subterránea subyacente por lixiviación a través del suelo
- Volatilizarse en el aire
- Unirse fuertemente al suelo.

-

Las características del suelo también afectan al destino de los contaminantes y así pueden pasar fácilmente a las plantas o animales.

Las características del suelo que pueden afectar de forma importante al comportamiento de los contaminantes incluyen:

- Textura del Suelo
- pH (acidez) del suelo
- cantidad de materia orgánica en el suelo
- Los niveles de humedad
- Temperatura
- Presencia de otros productos químicos

Los pesticidas incluyen productos químicos utilizados como insecticidas, herbicidas, fungicidas, venenos de roedores y otros tipos de venenos.. Para la detección de residuos de plaguicidas en el suelo es necesario realizar pruebas para sustancias químicas específicas, y por desgracia, hay cientos de pesticidas entre los que elegir. Los niveles elevados de contaminantes del suelo pueden afectar negativamente al crecimiento de la planta, la salud animal, los procesos microbianos, y la salud general del suelo. Algunos contaminantes pueden cambiar procesos metabólicos o causar daño visible a los cultivos. Incluso concentraciones relativamente bajas de ciertos contaminantes pueden alterar la química del suelo, a organismos de impacto que dependen del suelo, o a plantas. Los efectos sobre plantas, animales, microbios y los suelos dentro de un sistema dado dependerán de las propiedades del suelo, los niveles de contaminación, los contaminantes específicos presentes, y la sensibilidad de un organismo en particular a la contaminación existente (Jastrzębska, 2010, pp 43-53).

1.6. Respuesta a fungicidas

Las respuestas a la aplicación de fungicidas sistémicos, principalmente de aquellos del grupo de los benzimidazoles, han sido variables debido posiblemente a la aparición de resistencias a dichos fungicidas.

En la búsqueda de alternativas para el control de patógenos que ocasionan enfermedades en plantas, específicamente aquellos patógenos del suelo que causan su muerte (ejemplo: *Fusarium. Oxysporum*), se llevó a cabo una investigación que consistió en cinco tratamientos y cuatro repeticiones en bloques al azar de los herbicidas “Alachlor” (Lazo) y “Pendimethalin” (Prowl), en dosis de 4 y 2 l/ha respectivamente aplicadas al suelo al momento de la siembra, y los fungicidas “Dicarboximida” (Captan) y “Pentacloronitrobenzeno” (Brassicol), ambos al 1% aplicados a la semilla y posteriormente a la base del tallo a los 30 días de edad del cultivo. El porcentaje de infección en el campo se determinó en la etapa final del cultivo, encontrando que de 13 fungicidas probados solamente Captan y Benomyl redujeron las poblaciones de esclerocios en los suelos estudiados, en un 83 y 60%, respectivamente. (Pineda & Avila, 1998, p. 79-84).

En el caso concreto de la Florícola Happiness, situada en el Cantón Pillaro de la provincia de Tungurahua, los fungicidas que se están usando habitualmente para el control de plagas son:

1.6.1. Thiodicarb (CARBIN 350 SC)

Thiodicarb pertenece al grupo de los carbamatos que actúa mediante la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa que es una enzima que se encuentra en los tejidos nerviosos y los glóbulos rojos, por lo que puede afectar temporalmente a personas. A estos también se los denomina Xenobióticos debido a que causan efectos tóxicos y pueden producir importantes cambios en el Medio Ambiente. Aunque su persistencia es baja su posible acumulación puede generar asociaciones químicas complejas de toxicidad creciente. Por este motivo es importante reducir su aplicación mediante el uso de *Trichoderma* como tratamiento alternativo y así disminuir los riesgos asociados a ella (Cordoba, p.8).

También es inhibidor de la colinesterasa, con acción estomacal predominante en insectos. Es un excelente control de larvas de lepidópteros, con amplio espectro de control, rápida translocación dentro de la planta y alta residualidad (Adama, 2014).

1.6.2. Acetamiprid (ACETAMIPRID 20 SP)

Acetamiprid pertenece al grupo químico de los cloronicotinilos, actuando sobre la plaga por contacto e ingestión. La Autoridad de Ciencias Ambientales (2015) en su resolución 0398, menciona que el tiempo de vida media del ACETAMIPRID es de 20 días, lo que lo clasifica como no persistente. Para el agua subterránea ACETAMIPRID presenta un potencial grado de lixiviación, con DT₅₀₁ de 20 días y Koc de 71 ml/g. En el aire, el E.I.A. (Estudio de Impacto Ambiental) reporta que la sustancia no es volátil y no se espera que se presente riesgo en base a este compartimiento.

Es un acaricida de alta efectividad y gran selectividad. Ejerce control principalmente sobre insectos chupadores succionadores de sabia, larvas de minadores, trips y áfidos, en una amplia gama de cultivos tales como arroz, maíz, soya, papa, hortalizas, cucurbitáceas, cítricos, ornamentales y frutales en general. Por su novedosa molécula no afecta a poblaciones de arañas benéficas enemigas de numerosas plagas de cultivos (NEDERAGRO, 2014).

1.6.3. Fipronil (REGENT® 200 SC)

Fipronil es un insecticida y herbicida perteneciente a la familia de los Fenil pirazoles. Actúa bloqueando la inhibición del GABA (es un neurotransmisor que inhibe la transmisión de los impulsos nerviosos) al unirse a su receptor. La consecuencia es una sobreexcitación del Sistema Nervioso Central de los insectos (plagas). Se ha podido determinar que la vida media del Fipronil es de 3-7 meses en la vegetación tratada, dependiendo del sustrato y del hábitat en el cual se aplique (RAP-AL, 2004, p.20).

Actúa por contacto e ingestión presentando una excelente actividad biológica sobre insectos perforadores, chupadores y masticadores. Fipronil actúa sobre el sistema nervioso de insectos resistentes o tolerantes a los piretroides, ciclodienos y organofosforados, siendo efectivo para los programas de manejo de resistencia de plagas de insectos. (BAYER, 2016)

1.6.4. Clorotalonil (DACONIL 720)

Este pesticida pertenece al grupo químico de benzonitrilos y clorados y es de acción fúngica. Su solubilidad en agua es baja, la persistencia en el suelo va de alta a no persistente, la movilidad en

el suelo va de ligera a inmóvil en arcilla, es poco persistente en agua sedimentada, y no es volátil. Su bioacumulación es ligera con una vida media de 10 a 40 días en suelos aireados y de 5 a 15 días en suelos inundados. La degradación en el suelo depende de la temperatura y de la presencia de microorganismos ya que puede ser biodegradado en condiciones aerobias o anaerobias. Tiene bajo potencial de lixiviación. (IRET, 2006)

Este fungicida debe estar presente en las plantas antes del inicio de la infección. La infección es evitada como resultado de ciertas acciones recíprocas entre el clorotalonil y las células del hongo, que finalmente dan como resultado la pérdida de su viabilidad celular. Actúa por contacto sobre las esporas de los hongos antes de la germinación e impide la penetración en las células. (ECUAQUIMICA, 2015)

1.6.5. Dicofol+ Tetradifom (ACARIN T)

Este tipo de pesticidas pertenece al grupo de Organoclorados y Sulfonas. Actúa penetrando en el insecto a partir del tejido de la planta, afecta a huevos y estados inmaduros, y esteriliza a las hembras evitando que se reproduzca este tipo de plaga que afecta a las hojas en la producción del Clavel. Es altamente contaminante de los ecosistemas debido a que su persistencia en el suelo y su movilidad es alta. Dicofol +Tetradifon se une a las partículas del suelo y a los complejos ácidos húmicos de forma fuerte e irreversible, por lo que en ciertos casos puede interferir en la microflora del mismo. La presencia de Dicofol en la composición del suelo puede tener el mismo efecto contaminante que el DDT y el DDE, que son muy persistentes y se degradan poco. Este pesticida pertenece al grupo químico de benzonitrilos y clorados, y es de acción fúngica. Su solubilidad en agua es baja, la persistencia en el suelo va de alta a no persistente, la movilidad en el suelo va de ligera a inmóvil en arcilla, es poco persistente en agua sedimentada, no es volátil y su bioacumulación es ligera con una vida media de 10 a 40 días en suelos aireados y de 5 a 15 días en suelos inundados. La degradación en el suelo depende de la temperatura y de la presencia de microorganismos ya que puede ser biodegradado en condiciones aerobias o anaerobias. Tiene bajo potencial de lixiviación (IRET, 2016.). Actúa en los huevos, en ninfas y en adultos, y posee un amplio espectro y una larga actividad residual (MAINTER, 2011.).

1.6.6. Metamidofos (METHAN 600)

Es un insecticida y acaricida organofosforado poco persistente en el ambiente con una vida media de 1.9 días en limo, 4.8 días en suelo franco, 6.1 días en arena y 10-12 días en suelo franco

arenoso. Es altamente móvil en los suelos y no se acumula en ellos, aún después de aplicaciones repetidas. Debido a su baja persistencia su potencial de bioconcentración es bajo. Las plantas pueden absorber este compuesto a través de sus raíces y hojas. A pesar de sus aparentes efectos positivos en la producción agrícola, este insecticida se encuentra prohibido en muchos países y solo puede ser utilizado para fines de investigación, por lo que debe ser motivo de preocupación por su uso continuo en Ecuador. (Iannacone, et. al., 2006, pp. 126-138)

Tiene efecto repelente sobre los adultos de Aleiródidos. Interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la acetilcolinesterasa. Se utiliza cuando la infección es muy avanzada siendo muy efectivo. Además, su costo es accesible en comparación a otros agroquímicos (ANAJALSA, 2015:).

1.6.7. Carbendazim (Arbendazim 50)

Es un fungicida sistémico de efecto preventivo y curativo que controla las enfermedades indicadas en viñedos, frutales, cultivo de lúpulo, cultivos extensivos, plantas ornamentales, hortalizas y cultivos tropicales y subtropicales.. También es indicado para el control de enfermedades en tratamientos post-cosechas. Se absorbe por los órganos verdes y las raíces de los vegetales siendo su persistencia de acción de 2 a 3 semanas. En el caso de que el cultivo o sus subproductos se destinen a la exportación, deberán conocerse el límite máximo de residuos del país de destino, y observar el período de carencia que corresponde a ese valor de tolerancia (NUFARM, 2015).

Se clasifica como persistente en el suelo. Es estable por fotólisis e hidrólisis en el agua, en el aire no es volátil por lo que se considera menos peligroso, su toxicidad varía de alta a extremadamente alta para el zooplancton, y de moderada a extremadamente alta para peces u otras formas de vida. El Carbendazim se encuentra entre los diez fungicidas problema que superan las normas ecotoxicológicas. (IRET, 2016)

1.6.8. Profenofos (Profenofos 50% EC)

El Profenofos posee un rápido y extraordinario poder de penetración en el tejido de la planta, con actividad translaminar en profundidad, que permite controlar plagas minadoras difíciles de alcanzar. Destaca por su eficacia contra larvas de lepidópteros (polillas, cuncunillas), pulgones,

trips, gusanos minadores, chanchitos blancos y burritos en hortalizas, cultivos y frutales. Tiene prolongado efecto residual y dentro de los organofosforados es considerado como un producto de menor riesgo para insectos benéficos. Por su fase de vapor, presenta un destacado control de chanchitos blancos en vides y frutales pomáceos y de carozo, teniendo al mismo tiempo una alta inocuidad sobre el enemigo de esta plaga, *Pseudaphycus flavidulus* (Antalieu, 2015).

La acción insecticida de estos compuestos es atribuida a la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa, enzima que se encuentra en las células nerviosas de los insectos y cuya desactivación paraliza su sistema nervioso. No es recomendable su uso en los cultivos bajo plástico, la vida media es de 8 a 6 horas, y es estable a la fotólisis directa en el ambiente. En los suelos su movilidad es baja y es eliminado rápidamente por hidrólisis (Sanchez J, 1984, pp. 38-51).

1.6.9. Mancozeb (Mancozeb 80% WP)

Mancozeb es un fungicida muy activo que actúa por contacto sobre las hojas para el control preventivo de un amplio espectro de hongos en un amplio rango de cultivos. Se degrada en condiciones ácidas a temperaturas altas, y cuando se expone a humedad y aire. Es poco probable que se volatilice del agua o que se bioconcentre en peces u otros organismos acuáticos. En el medio ambiente, se hidroliza rápidamente, con una vida media de aproximadamente 3 días, dando lugar a varios productos de degradación, algunos de los cuales se unen al suelo y a partículas sedimentarias y se degradan lentamente a través de varios procesos, inclusive la biodegradación (Suguiyama L, 2015, pp 2- 35). Es un producto fungicida de amplio espectro, con acción de contacto para el control de enfermedades fungicas, que inhibe la propagación de esporas. (NURFAM, 2010)

1.6.10. Carboxín + Captan (VITAVAX 400)

Es un fungicida para uso Agrícola resultante de la unión de Carboxin, que es fungicida sintético, más Captan, fungicida protectante que previene y controla el crecimiento de enfermedades causadas por hongos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium sp*, *Fusarium sp*, *Sclerotium, sp Ustilago spp*, *Phytophthora sp*, *Macrophamina sp*, y *Tilletia carie*. Afecta al proceso de respiración de los hongos fitopatógenos mediante el bloqueo de la acción de la enzima succínica deshidrogenasa en

el ciclo de Krebs en el interior de las mitocondrias del protoplasma de la célula del hongo. Es peligroso para animales domésticos, fauna y flora silvestre (PROFICOL, 2013)

1.6.11. Pentacloronitrobenzeno (TERRACLOR® 75 %)

Es un fungicida de síntesis orgánica para la desinfección de suelos y semillas que controla especies como *Sclerotium spp.*, *Botrytis spp.*, *Sclerotinia spp.*, *Thielaviopsis spp.*, y *Tilletia spp.*, entre otros, inhibiendo la división celular de los hongos. La persistencia del producto puede ser menor por la acción de la lixiviación y la fotodegradación (Edifarm, 2015)

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 *Tipo y diseño de la Investigación*

2.1.1. *Por el propósito perseguido*

Aplicada, utiliza conocimientos obtenidos de otras investigaciones. Mediante la misma se expuso determinar la actividad de cepas nativas de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium spp.* a nivel del laboratorio, ambos géneros recolectados de los cultivos de clavel, con expectativas de que pueda ser utilizado en el campo como método de tratamiento alternativo y de esta forma disminuir el uso de agroquímicos que pueden contaminar al ambiente.

2.1.2. *Por la clase de medios utilizados para obtener los datos*

Experimental debido a que para la investigación se sometió a condiciones de laboratorio controladas en las que se modificaron una serie de variables para su análisis con el fin de determinar la actividad de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium spp.* y de esta forma sostener las conclusiones mediante la generación de datos.

2.1.3. *Por el nivel de conocimientos que se adquieren*

Exploratoria debido a que las especies del género *Fusarium* se presentan como un problema económico debido a la infección en plantas y debido al control al que deben ser sometidas, un problema de contaminación ambiental por la utilización de agroquímicos. La importancia de este tipo de investigación radica en que se simplifica la apertura de nuevas líneas de investigación enfocadas en el uso de *Trichoderma spp.* para poder comprobar la viabilidad de este uso.

Descriptiva porque su objetivo es describir la estructura de los fenómenos y su dinámica, así como identificar aspectos relevantes de los hongos.

Explicativa, ya que trata de responder la finalidad por la que se investiga, explicando el comportamiento de las variables y las causas que genera este tipo de enfermedades mediante un análisis cuantitativo (Behar, 2008: pp. 22-24).

2.1.4 Por el tipo de enfoque

Cuantitativo, porque se recolectaron datos físicos, químicos y microbiológicos, durante el periodo febrero 2016 a abril 2016, donde se probó una hipótesis con base a una relación numérica y categórica, y el pertinente análisis estadístico (Behar, 2008: pp. 22-24).

2.2. Materiales

2.2.1. Campo

- Pala para toma de muestras
- Azadón
- Fundas plásticas (Ziploc)
- Etiquetas
- Marcador permanente azul y rojo

2.2.2. Laboratorio

- Medio PDA(Potato Destroxe Agar)
- $MgSO_4$ 0,1g,
- H_2HPO_4 0,45g,
- KCl 0,075g
- $NHNO_4$ 0,5g
- Glucosa 1,5g
- Rosa de Bengala 0,15g
- Quinotoceno 0,1g
- Captan 0,01g
- Propamocarb 0,6g
- Cloranfenicol 0.13g

- Suelo
- Guantes quirúrgicos
- Mascarilla
- Cuaderno de campo
- Computadora
- Cámara fotográfica
- Cámara de aislamiento
- Balanza analítica
- Microscopio
- Autoclave
- Incubadora
- Refrigerador
- Cooler
- Estufa
- Cajas Petri de plástico 200
- Tubos de ensayo de vidrio
- Asas de inoculación mango de acero
- Agua destilada
- Agua
- Papel Toalla absorbente
- Alcohol Industrial

2.2 Diseño Experimental

2.2.1. Método por enfrentamiento dual:

Se utilizó un diseño completamente al azar DCA bifactorial con tres aislamientos (sitios de colecta) y tres repeticiones, y se comparó con un testigo absoluto (caja de petri con cultivo de *Fusarium spp*) con tres repeticiones. Para el registro de los resultados se utilizará el esquema mostrado en la siguiente Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Tabla de medición del porcentaje de inhibición del crecimiento

PORCENTAJE DE ANTAGONISMO DE <i>Fusarium spp</i> CON <i>Trichoderma sp.</i> ENFRENTAMIENTO DUAL			
Aislamiento T (<i>Trichoderma spp</i>)	CRECIMIENTO DE <i>Fusarium spp</i> ENFRENTAMIENT O DUAL mm	PIC (Porcentaje de inhibición del crecimiento)	PROMEDIO PIC/Tratamiento
T1-Aislamiento 1			
T2-Aislamiento 2			
T3-Aislamiento 3			
PORCENTAJE DE ANTAGONISMO DE <i>Fusarium spp</i> CON <i>Trichoderma sp.</i> ENFRENTAMIENTO DUAL			
Aislamiento T (<i>Trichoderma spp</i>)	CRECIMIENTO DE <i>Fusarium spp</i> ENFRENTAMIENT O DUAL mm	PIC (Porcentaje de inhibición del crecimiento)	PROMEDIO PIC/Tratamiento
T1-Aislamiento 1			
T2-Aislamiento 2			
T3-Aislamiento 3			

Elaborado por: Díaz E, 2016

2.2.1 Compatibilidad con Fungicidas y *Trichoderma spp.*

Se utilizó un diseño completamente al azar DCA mediante la inclusión independiente de los 11 agroquímicos utilizados en la Florícola en un medio PDA y la aplicación posterior de discos sembrados de tres aislamientos de *Trichoderma spp.* con tres repeticiones cada uno, y tres repeticiones de un testigo absoluto con *Trichoderma spp.* sin presencia de agroquímicos en el medio PDA.

Tabla 2-2: Productos agroquímicos evaluado frente a *Trichoderma spp.*

Fungicidas evaluados para medir el efecto fungistático			
Nombre Común	Nombre activo	Hongo T (<i>Trichoderma spp.</i>)	Tratamiento Dosis
CARBIN 350 SC	Thiodicarb	T1, T2, T3	0,18 mL
ACETAMIPRID 20 SP	Acetamiprid	T1, T2, T3	0,18 mL
REGENT® 200 SC	Fipronil	T1, T2, T3	0,18 mL
DACONIL 720	Clorotalonil	T1, T2, T3	0,18 mL
ACARIN T	Dicofol+tetradifom	T1, T2, T3	0,18 mL
Metamidofos	METHAN 600	T1, T2, T3	0,18 mL
Arbendazim 50	Carbendazim	T1, T2, T3	0,18 mL
Profenofos 50% EC	Profenofos	T1, T2, T3	0,18 mL
Mancozeb 80% WP	Mancozeb	T1, T2, T3	0,45 g
VITAVAX	Carboxín + captan	T1, T2, T3	0,54 g
TERRACLOR® 75 %,	Pentacloronitrobenzeno	T1, T2, T3	0,9 g

Elaborado por: Díaz E. 2016

2.2.2. Compatibilidad con Fungicidas y *Trichoderma spp.*

Tabla 3-2 Fungicidas a evaluar sobre *Fusarium spp.*

Fungicidas evaluados para medir el efecto fungistático			
Nombre Común	Nombre activo	Hongo T (<i>Trichoderma spp.</i>)	Tratamiento Dosis
DACONIL 720	Clorotalonil	T1, T2, T3	0,15 mL
Arbendazim 50	Carbendazim	T1, T2, T3	0,15 mL
Mancozeb 80% WP	Mancozeb	T1, T2, T3	0,375g
VITAVAX	Carboxín + captan	T1, T2, T3	0,45 g
TERRACLOR® 75 %	Pentacloronitrobenzeno	T1, T2, T3	0,75 g

Elaborado por: Díaz E. 2016

2.3 Unidad de Análisis

- Muestras de suelo del Cultivo de Clavel.
- Muestras de plantas afectadas por *Fusarium spp.*
- Cepas de *Trichoderma spp.*
- Cepas de *Fusarium spp.*

2.4 Población de estudio

La población correspondió a 10 muestras de suelo de la Florícola Happinnes, 8 muestras de plantas de clavel, de las cuales se obtendrá cepas de *Trichoderma spp.* y cepas de *Fusarium spp.*

2.5 Tamaño de muestra

- 2,2 Kg de muestra de suelo

2.6 Selección de muestra

2.6.1. Material biológico

Las muestras de suelo estuvieron conformadas por 3 cepas de *Trichoderma spp.* aisladas en agar PDA, conjuntamente dos cepas de *Fusarium spp.* aisladas de muestras vegetales de la Florícola Happiness, Cantón Pillaro, Provincia de Tungurahua.

2.7 Técnicas de recolección de datos

2.7.1. Fase de campo

2.7.1.1 Localización del área de campo.

La obtención de muestras de suelo usado para el cultivo de clavel y muestras vegetales de estos cultivos, se realizó en la Florícola Happiness Flowers, ubicada en la Provincia de Tungurahua, Cantón Pillaro, Sector la Quinta.

2.7.1.2 Procedimiento

- Recoger el material vegetal infectado con *Fusarium spp.*, de diferentes camas de la plantación de clavel.
- Colocar en fundas de plástico, debidamente etiquetadas y fueron trasladadas al laboratorio de Ciencias Biológicas de la Escuela de Agronomía, para su posterior aislamiento de acuerdo a la metodología
- Recoger de muestras de suelo, de las camas con cultivo de clavel, por el método aleatorio simple.

2.7.2. Fase de laboratorio

2.7.2.1. Localización del Laboratorio

El trabajo de investigación experimental se realizó en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales, en la Escuela Politécnica Superior de Chimborazo, ubicada

en el Km ½ de la Panamericana Sur Riobamba; bajo la colaboración y la metodología de la Dra. Norma Erazo.

Para la fase de laboratorio se realizara los siguientes procedimientos.

- Medición del pH
- Medición del peso de la humedad
- Medición de la Materia Orgánica
- Aislamiento, purificación e identificación del patógeno.
- Aislamiento, purificación y aislamiento del antagonista.
- Determinación del ritmo de crecimiento radial del antagonista.
- Determinación de la actividad de *Trichoderma spp.* sobre los pesticidas sintéticos.

2.7.2.2. Medición del pH

Una vez ingresadas las muestras de suelo al laboratorio medir:

- Limpiar con agua destilada el pHmetro
- Tamizar y dejar reposar por 24h el suelo
- Disolver 20g del suelo en 50ml de agua destilada
- Dejar reposar esta solución 30 minutos
- Un vez transcurrido el tiempo medir en el pHmetro
- Realizar tres repeticiones.



Fotografía 1-2: Tamiz con la muestra Suelo

Fuente: Díaz E, 2016

2.7.2.3. Medición del peso de la humedad

- Tamizar y dejar reposar por 24h el suelo
- Pesarse cada uno de los cilindros en los cuales serán tomadas las muestras
- Colocar en los cilindros el suelo hasta el borde y tomar su peso
- Dejar en la mufla a 105°C por 24 Horas
- Transcurrido el tiempo, sacar de la mufla los cilindros, dejar enfriar y pesar nuevamente.
- Aplicamos la fórmula de medición de peso de la humedad
- Realizar tres repeticiones en su totalidad



Fotografía 2-2. Medición de la muestra de suelo en cilindros

Fuente: Díaz E.2016

2.7.2.4. Medición de la Materia Orgánica

- Tamizar y dejar reposar por 24h el suelo
- Pesarse cada una de las capsulas en las cuales serán tomadas las muestras
- Pesarse 5g y colocamos en el cilindro
- Colocar en la estufa durante 24h a 22°C
- Transcurrido el tiempo, llevar a la mufla por 15 min., a 400°C
- Dejar enfriar y tomar el peso
- Aplicar la fórmula de medición de materia orgánica y tomamos el resultado
- Se realizaron 3 repeticiones

2.7.2.5. Aislamiento, purificación del *Fusarium spp.*

- Seleccionar partes del vegetal afectado y dejar 72 horas en cámara húmeda, para conseguir la descarga de esporas.
- Transcurrido el tiempo indicado, abrir las fundas plásticas y con la ayuda de una asa esterilizada colocar en cajas Petri con PDA y cloranfenicol para la inhibición de bacterias o levaduras.
- Incubar a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm$ hasta obtener colonias de *Fusarium spp.*
- Si estas presentan alguna contaminación se vuelven a purificar para obtener un cultivo puro según la metodología propuesta por Erazo (2015).

2.7.2.6. Identificación del *Fusarium spp.*

A partir de los aislamientos y purificación se procedió a determinar el género y especie correspondiente a *Fusarium spp.*

- En un portaobjetos limpio colocar una gota de azul de lactofeno.
- Cubrir con un pedazo de cinta adhesiva el cultivo sembrado.
- Retirar con cuidado el adhesivo.
- Colocar el pedazo de cinta adhesivo sobre la placa preparada con la gota de azul de metileno.
- Pegar bien y observar a través del microscopio óptico las características microscópicas con los objetivos 4X, 10X y 40X.
- Una vez identificadas al microscopio las estructuras de las colonias de cada muestra, estas fueron comparadas con ilustraciones presentes en la bibliografía. (Domsch, 1993, p. 375)
- Caracterizar de acuerdo a la forma, color y tamaño de la colonia en las cajas petri

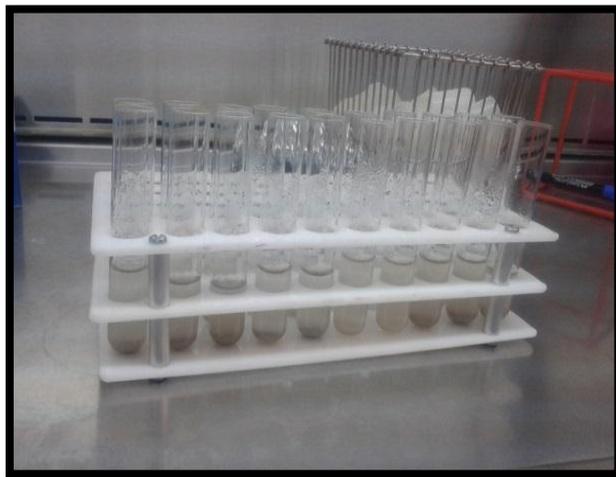
2.7.2.7. Determinación del Ritmo de Crecimiento del *Fusarium spp.*

- De los dos aislamientos de cepas de *Fusarium spp.* retirar discos de 0,5 cm de radio de micelio joven con la ayuda de un sacabocados, para inocular en el centro de cada una de las cajas con 20 ml de medio PDA.
- Registrar los datos correspondientes al ritmo de crecimiento radial de las colonias en esquemas elaborados después de dos días, cuyos valores son expresados en mm. Los datos serán tomados de 4 radios marcados en cruz de cada colonia en intervalos de 24 horas durante 120 horas.

- Cada prueba estuvo constituida por tres repeticiones.

2.7.2.8. Aislamiento, purificación del antagonista *Trichoderma spp.*

- Secar una porción de suelo de cada muestra a temperatura ambiente, y tamizar
- Pesar 10 g de suelo de 10 muestras de suelo respectivamente y colocar en un erlenmeyer con 90 ml de agua destilada estéril.
- Agitar esta suspensión terrosa por 20 minutos y luego dejar reposar por 5 minutos.
- Preparar medio PDA de la siguiente manera: en 500ml de agua destilada agregar 20 gr de PDA, 0,1g de MgSO₄ , 0,45g de H₂HPO₄ , 0,075g de KCl, 0,5g de NHNO₄, 1,5g de Glucosa, 0,15g de Rosa de Bengala, 0,1g de Quinoceno, 0,01g de Captan, 0,6g de Propamocarb y 0.13g de cloranfenicol.
- Utilizar la cámara de aislamiento previamente desinfectada, preparar las cajas Petri, colocando 1ml de dilución a la 10⁻¹ de la suspensión terrosa y en el medio selectivo de *Trichoderma spp.*
- Repartir de modo uniforme la gota de suspensión en la caja petri con movimientos circulares.
- Dejar reposar en cámara de incubación durante 72 horas para observar los resultados y purificar *Trichoderma spp.*
- Efectuar posteriormente las pruebas de Ritmo de Crecimiento y de Antagonismo correspondientes, según la metodología propuesta por Erazo (2016).



Fotografía 3-2. Diluciones del suelo para aislar *Trichoderma sp*

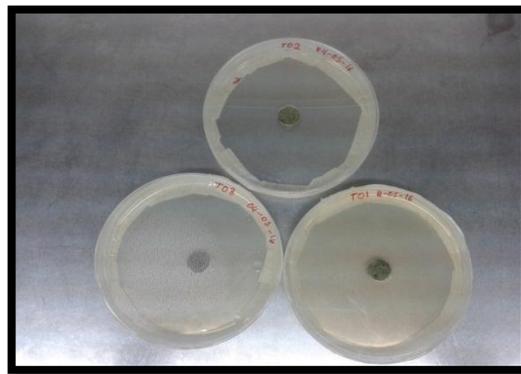
Fuente: Díaz E. 2016

2.7.2.9. Identificación del antagonista *Trichoderma spp.*

- En un portaobjetos limpio colocar una gota de azul de lactofeno.
- Colocar un pedazo de cinta adhesiva encima del cultivo sembrado. Retirar con cuidado el adhesivo.
- Colocar el pedazo de cinta scotch sobre la placa preparada con la gota de azul de metileno.
- Adherir y observar al microscopio óptico con objetivos 4X, 10X y 40X.
- Identificar al microscopio las estructuras de las colonias de cada muestra
- Comparar con ilustraciones de acuerdo a la metodología recomendada

2.7.2.10. Determinación del Ritmo de Crecimiento del antagonista

- De las tres cepas de *Trichoderma spp*, retirar discos de 4 mm de radio de micelio joven con la ayuda de un sacabocados para inocular en el centro de cada una de las cajas con 20 ml de PDA.
- Registrar los datos correspondientes al ritmo de crecimiento radial de las colonias en esquemas elaborados, cuyos valores son expresados en mm. Los datos son tomados de 4 radios marcados en cruz de cada colonia en intervalos de 24 horas durante 120 horas.
- Cada prueba estuvo constituida por tres repeticiones.



Fotografía 4-2. Inicio del crecimiento radial del antagonista
Fuente: Díaz E. 2016

2.8. Pruebas de eficacia in vitro de resistencia de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium spp.*

2.8.1 Método 1 enfrentamiento dual

- Preparar agar PDA.
- En una esquina sembrar *Fusarium spp.* y dar de ventaja de 2 días debido a su crecimiento más lento que el de *Trichoderma spp.*
- Luego en la otra esquina sembrar *Trichoderma spp.*
- Tomar los radios de cada uno de estos para medir el antagonismo

2.8.2 Método 2: colocación de discos invertidos

- Preparar 180 ml de agar PDA.
- Verter en cajas Petri 20 ml de agar PDA
- En la mitad colocar discos de 1 cm de diámetro de *Fusarium spp.* con tres repeticiones de cada una de ellas.
- Observar su crecimiento y esperar hasta se encuentren maduras las cepas o hasta el momento en que las cepas de *Fusarium spp.* hayan invadido totalmente la caja.
- En otras cajas Petri sembrar *Trichoderma spp.* para obtener los anillos que serán incorporados en las cajas del patógeno.
- Una vez culminada esta fase, incorporar un disco de 1 cm de *Trichoderma spp* invertido sobre el centro de las cajas en las que se encuentran las cepas de *Fusarium spp.*
- Sellar para posteriormente observar y medir el crecimiento de *Trichoderma spp...*

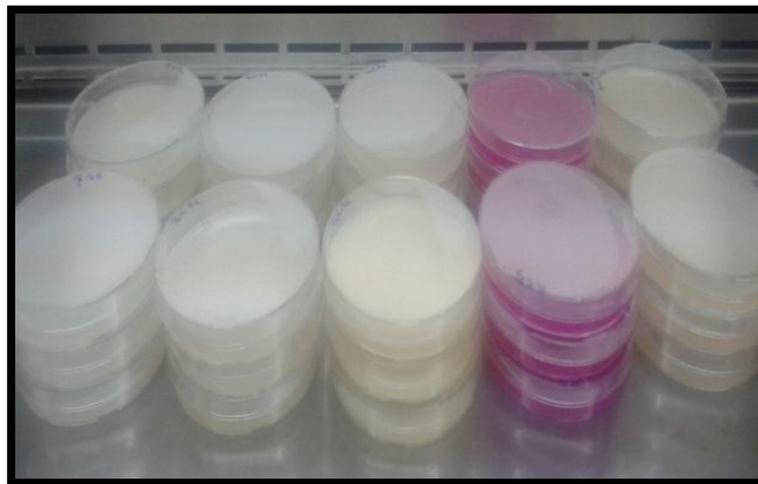
2.8.3 Método 1: por compuestos volatilizados.

- Preparar 180 ml de agar PDA.
- Verter en cajas Petri 20 ml de agar PDA
- En el centro colocar discos de 1 cm de diámetro de *Fusarium spp.* con tres repeticiones para cada una de ellas.
- Observar su crecimiento y esperar a que las cepas se encuentren maduras o hasta el momento en el que estas cepas hayan invadido totalmente la caja.
- En otras cajas Petri sembrar *Trichoderma spp.* de acuerdo al número de cepas del patógeno y al número de repeticiones.

- Una vez culminada esta fase, retirar la tapas que cubren las cajas de *T. harzanium*, y colocar de forma invertida sobre las cajas de *Fusarium spp.*
- Sellar, observar y medir su crecimiento.

2.9. Evaluación de compatibilidad in vitro de resistencia de Trichoderma spp. frente a agroquímicos

- Calcular la dosis para cada producto químico de uso agrícola que son utilizados comúnmente en la Florícola, para lo cual se expresaron en g/L para productos químicos sólidos y mL/L para productos químicos líquidos.
- Preparar 13 botellas con 180 ml de agar PDA
- Esterilizar/autoclavar el agar PDA durante 15 minutos a 121 °C.
- Para evitar inactivar el principio activo de cualquiera de los productos químicos, mantener el a agar PDA a 50°C en baño maría,
- Añadir la dosis de cada uno de los químicos lentamente, logrando mezclarlos homogéneamente con el agar
- Incorporar en las cajas de petri alrededor de 20 mL de medio de cultivo y dejar enfriar.
- Un vez enfriados colocar en el centro, 8 mL de las cepas de *Trichoderma spp.*, con tres repeticiones para cada uno de los productos agrícolas.

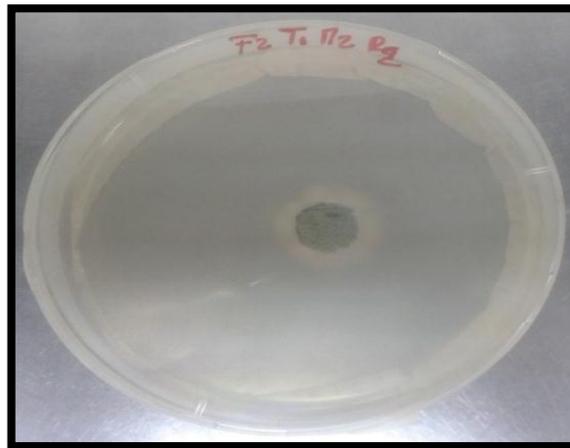


Fotografía 5-2. Agroquímicos a evaluar sobre *Trichoderma spp.*

Fuente: Díaz E.2016

2.10. Evaluación compatibilidad *in vitro* de resistencia de *Fusarium spp.* frente a fungicidas químicos

- En esta parte del procedimiento trabajar con los fungicidas químicos que se utilizan para controlar las enfermedades causadas por *Fusarium spp.*
- Calcular la dosis para cada fungicida químico para lo cual se expresaron g/L para productos químicos en polvo y mL/L para productos químicos líquidos.
- Preparar 6 botellas con 180 ml de agar PDA
- Esterilizar/autoclavar el agar PDA durante 15 minutos a 121 °C.
- Para evitar inactivar el principio activo de cualquiera de los productos químicos mantener el agar PDA a 50°C en baño maría.
- Añadir la dosis de cada uno de los químicos lentamente, logrando mezclar los químicos homogéneamente con el agar
- Incorporar alrededor de 20 mL de esta mezcla en cajas petri y dejar enfriar.
- Un vez enfriados, colocar en el centro discos de 8 mL de *Fusarium spp.*, con tres repeticiones para cada cepa.



Fotografía 6-2. Inicio de crecimiento de *Fusarium spp.* sobre fungicida

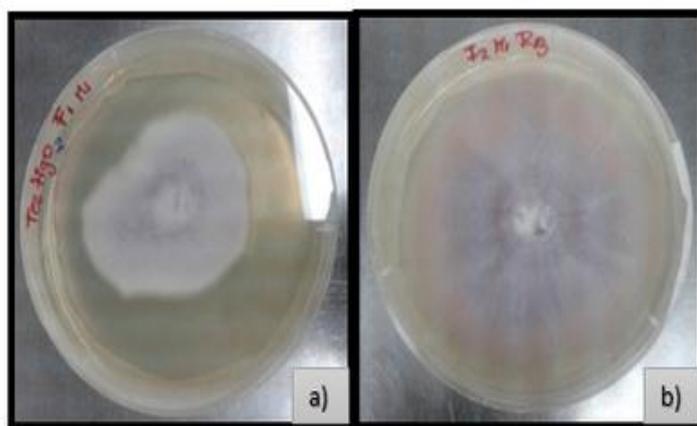
Fuente: Díaz E.2016

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.1. Aislamiento y purificación de *Fusarium spp.*

En total se utilizaron 10 muestras de plantas de clavel para el aislamiento y purificación de este hongo patógeno. De estas muestras pudieron crecer e identificarse solo dos especies pertenecientes al género *Fusarium*, *F. redolens* y *F. oxysporum* (Fotografía. 1-3). La presencia de estos hongos patógenos explica la utilización de fungicidas químicos que posibiliten su control, pero su uso puede representar un riesgo ambiental por la acumulación de estos productos que puede producirse en los ambientes en donde se apliquen regularmente.



Fotografía 1-3. Aislamiento de *Fusarium spp*

a) *Fusarium redolens*;

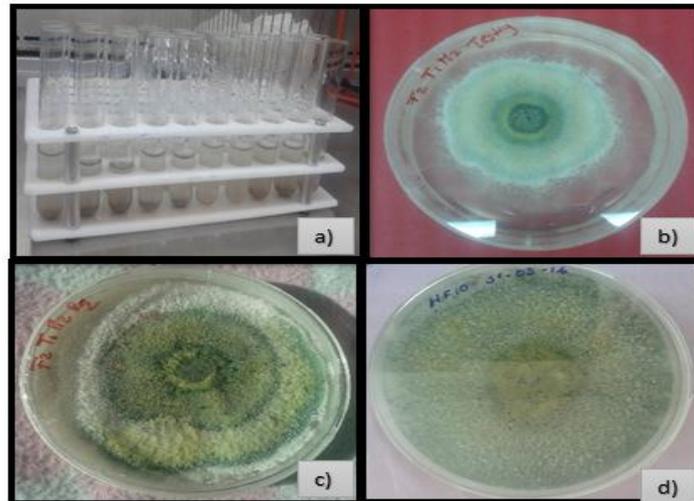
b) *Fusarium oxysporum*

Fuente: Díaz E. 2016

3.2 Aislamiento y Purificación De *Trichoderma spp.*

Para efectuar el aislamiento y purificación de *Trichoderma spp*, se tomaron muestras en 10 puntos alrededor de toda la plantación de clavel de la Florícola Happinnes Flowers. De las 10 muestras aleatorias del suelo con clavel que se realizaron en cada punto se lograron hacer 10 aislamientos en agar PDA. De esos diez aislados, en tres de ellos hubo crecimiento, siendo en todos los casos *Trichoderma harzianum*. Esta especie posee cualidades que le permiten combatir a ciertos fitopatógenos que pueden atacar a la plantación de clavel. Se conoce que muchos hongos

entomopatógenos se encuentran en el suelo de forma natural, pero la aplicación de agroquímicos en el suelo puede inhibir o matar a estos organismos (Nicholls, 2008, pp. 122-125). Al haberse encontrado una única cepa de *Trichoderma spp* se puede considerar que la plantación de clavel de la Florícola Happinnes Flowers no posee un significativo grado de diversidad de microorganismos benéficos que ayuden al control biológico y a la restauración natural del suelo.



Fotografía 2-3. Aislamiento de *Trichoderma spp*
a) Diluciones de las muestras de suelo
b) Aislamiento sitio a las 24H
c) Aislamiento 2 a las 96H
d) Aislamiento 3 sitios 3 a las 168 H

Fuente: Díaz E. 2016

3.3. Ritmo De Crecimiento Radial De *Fusarium spp.*

Se determinó el crecimiento radial de *Fusarium spp.* a través de las medidas del desarrollo del patógeno a partir de las 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, y 168h, y los datos fueron transformados por medio de la siguiente fórmula propuesta por Córdova (2016).

$$\sqrt{CR + 0.5}$$

En donde

CR: crecimiento radial tomado en mm

Tabla 1-3 Análisis de Varianza y Tukey, para el ritmo de crecimiento

Crecimiento Radial De <i>Fusarium redolens</i>			
Tiempo (H)	Medias	Rango	CV
24	0,95	A	6,52
48	1,20	A	7,21
72	1,31	A	5,98
96	1,36	A	7,58
120	1,46	A	8,30
144	1,53	B	6,51
168	1,61	B	6,67
Crecimiento Radial De <i>Fusarium oxysporum</i>			
Tiempo (H)	Medias	Rango	CV
24	0,77	B	9,52
48	1,04	B	7,21
72	1,26	A	5,98
96	1,39	A	7,58
120	1,53	A	8,30
144	1,65	A	6,51
168	1,86	A	6,67

CV: Coeficiente de variación

A-B: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Díaz E. 2016.

De acuerdo a la tabla 1-3, mediante la Prueba de Tukey (al 5% de nivel de significancia) las cepas *Fusarium sp. 1* y *Fusarium sp 2* presentaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 y 48 horas de crecimiento debido a que *Fusarium sp 1* creció más que la cepa número 2 (medias de 0,95-1,20 y 0,77-1,04 respectivamente). También se encontraron diferencias en el crecimiento a partir de las 144 horas y 168 horas, en donde en este caso *Fusarium sp 2* (con una media de 1,65-1,86) creció más que *Fusarium sp 1* (con una media de 1,53-1,61).

3.3. Ritmo De Crecimiento Radial De *Trichoderma spp*

Para la determinación del crecimiento radial de *Trichoderma spp.*, una vez obtenidos los aislamientos puros y realizada su identificación, los respectivos datos a las 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, y 168h que se obtuvieron se transformaron para aplicar su respectivo análisis a través del Software estadístico Infostat (L, Córdova 2016) y así observar el desarrollo de *Trichoderma spp.* en las cajas petri, por medio de la siguiente fórmula:

$$\sqrt{CR + 0.5}$$

En donde

CR: crecimiento radial tomado en mm

Tabla 2-3. Análisis de varianza del ritmo crecimiento

Crecimiento Radial De <i>Trichoderma spp.</i>			
Tiempo (H)	Medias(cm)	Rango	CV
24	0,87	AB	10,55
48	1,27	A	7,70
72	1,61	A	8,84
96	2,97	A	7,96
120	3,9	A	7,17

CV: Coeficiente de variación

A-B: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Díaz E. 2016.

Los tres aislamientos de la especie *T. harzianum* tuvieron crecimientos que fueron de 8,7 cm y 39 mm de radio durante todo el tiempo de tratamiento con un coeficiente de variación de 1,55 a 7,17 entre las 24 y 120 horas (Tabla 2-3). En la Prueba de Tukey, al 5% de nivel de significancia, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al crecimiento en todas las horas ensayadas. En otros estudios también se ha demostrado el rápido crecimiento de *Trichoderma harzianum* obteniendo que es capaz de cubrir el medio de cultivo contenido en placas de petri de 9 cm de diámetro en 5 días a 20 °C (Domsch, 1993: p. 795).

3.5 Identificación Morfológica de la Cepa de *Trichoderma spp.*

A partir del aislamiento y purificación de tres aislamientos de *Trichoderma spp.*, obtenidos de las 10 muestras de suelo tomadas de la Florícola Happiness Flowers, se logró identificar a *Trichoderma harzarium* de acuerdo a la metodología recomendada por Domsch (1993). Según estos autores, los conidios son globulosos, subglobulosos u ovoides; cortos con relación a la longitud de los conidios (de 1,25 μm , 2.8-3,2 a 2,5-2,8 μm); las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, y con un tamaño de 6,3 a 15,6 μm . Mediante la observación al microscopio y acuerdo a la morfología presentada se trataba de un solo tipo de cepa de *Trichoderma spp.* Con el fin de determinar el tipo de cepa de la que se trataba, se procedió a medir las características morfológicas antes mencionadas para determinar si pertenecían a *Trichoderma harzianum*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3-3.

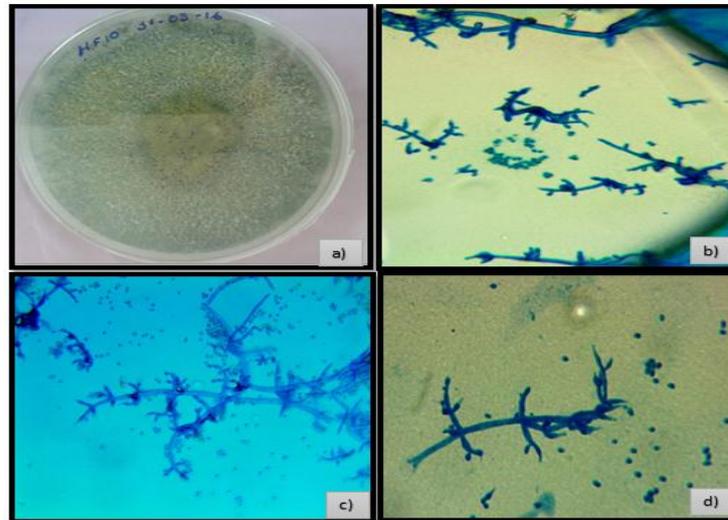
Tabla 3-3 Datos de medición de conidios y filiales de *Trichoderma Harzianum*

Datos de medición de Conidios y Fialides de <i>Trichodermas Harzianum</i> utilizando el microscopio		
Número de Placa	Conidios (μm)	Fiálides (μm)
1	2,91-2,27	9,2
2	2,94-1,94	6,29
3	3,35-2,16	5,37
4	3-1,76	9,53
5	3,91-2,35	6,99
6	2,86-2,6	5,83
7	2,8-1,71	4,72
8	2,9-3,2	4,55
9	3,86-1,7	5,69
10	2,56-2,27	5,12
Promedio	2,44-3,697	6,329

Elaborado por: Díaz E. 2016

De esta manera se confirmó a través de la medición y observación de sus características morfológicas mediante un microscopio óptico (Fotografía. 3-3) que se trataba de la especie *T. harzianum*, obteniendo una longitud media de conidios de 2,44-3,69 μm ., y de las fiálides de 6,329. Estas medidas se encuentran dentro del rango establecido para esta especie.

También se tuvieron en cuenta las características macroscópicas observadas en el laboratorio del departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales, las cuales concuerdan con las descritas por otros autores (Dorsch, 1913, pp. 321-325:795).



Fotografía 3-3. a) Aislamiento de *Trichoderma harzianum*
b) Esporas *T. harzianum*
c) Vista general de *Trichoderma harzianum*.
d) Conidios de *Trichoderma harzianum*

Fuente: Díaz E. 2016

3.6 Identificación morfológica de *Fusarium spp*

Fusarium spp. es un género causante de enfermedades en el clavel y otras plantas que consiste en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y de tallos de la planta de clavel (Nelson, 1990). A partir de las muestras vegetales de la plantación de la Florícola Happiness Flowers se logró realizar el aislamiento, purificación e identificación de las especies *F. redolens* y *F. oxysporum*, siendo ambas especies patógenas de plantas. Para la identificación *F. redolens* se recurrió a la descripción y metodología de Domsch, (1993), en la cual se menciona que las macroconidias de esta especie tienen un tamaño aproximado de 25.4-38.2 x 2.5-4.0 μm , y que presentan un color crema para luego tomar un color morado débil (Domsch, 1993, p.795).

La especie *F. oxysporum*, cuando se cultiva *in vitro* en agar PDA, desarrolla un micelio de color violeta a púrpura con microconidias que son ovoides o en forma de riñón, clamidosporas esféricas, y microconidias producidas en fiálides cortas y ramificadas. Las macroconidias tienen de uno a cinco septos con una longitud de 23-54 x 3-4,5 μm , tienen forma de media luna, ligeramente curvadas, y con pared fina y delicada. Su célula apical es afilada y la célula basal con forma de pie pero pueden tener ambos extremos afilados. Llega a invadir todo el diámetro de la caja petri con el agar en 6-7 días a 25 °C (Domsch, 1993, p. 795).

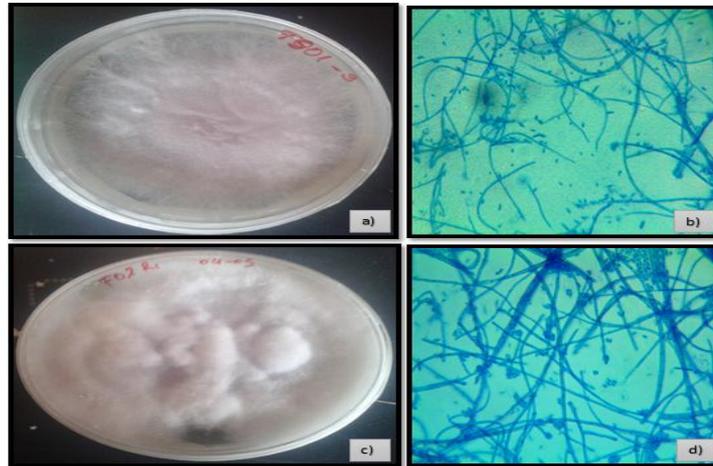
Los tamaños de macroconidias que se obtuvieron en los distintos cultivos en placa petri se muestran en la Tabla 7-3.

Tabla 4-3: Datos de medición de macroconidias para la identificación de *Fusarium* spp.

Datos de medición de macroconidias de <i>Fusarium redolens</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando el microscopio		
Número de Placa	<i>Fusarium redolens</i>	<i>Fusarium oxysporum dianthi</i>
	Macroconidias (<i>um</i>)	Macroconidias (<i>um</i>)
1	27,38-2,18	22,8-5,43
2	17,53-2,2	29,2-5,41
3	27,7-2,47	25,69-3,95
4	28,01-2,74	31,6-7,17
5	21-2,34	20,01-6,69
6	26,89-3,59	27,16-4,66
7	39,79 -2,2	27,53-5,48
8	25,18-2,26	25,89-5,38
9	28,36-2,19	27,48-5,07
10	38,77-2,88	19,17-6-26
Promedio general	28,06-2,50	25,7-4,9

Elaborado por: Díaz E. 2016.

A través de las mediciones realizadas mediante el uso de un microscopio óptico se pudo observar que *F. redolens* presentó un rango de tamaño de macroconidias entre 28,06-2,50 μm (Fotografía. 4-3) y *F. oxysporum* entre 25,7-4,9 μm . Las características microscópicas y macroscópicas, determinadas en el laboratorio del departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales, concuerdan con las propuestas por otros autores (Dosch K, 1993, p. 795).



Fotografía 4-3. a) Crecimiento de *F. redolens* en cajas Petri
b) Vista microscópica de *F. redolens*
c) Crecimiento de *F. oxysporum* en cajas Petri
d) Vista microscópica de *F. oxysporum*

Fuente: Díaz E. 2016

3.7 Actividad antagónica in Vitro de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium redolens* y *Fusarium oxysporum*

Para la medición del porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) en cada uno de los métodos se utilizó la siguiente fórmula (Skidmore, 1976, pp. 65-67)

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

Ecuación 1

Donde:

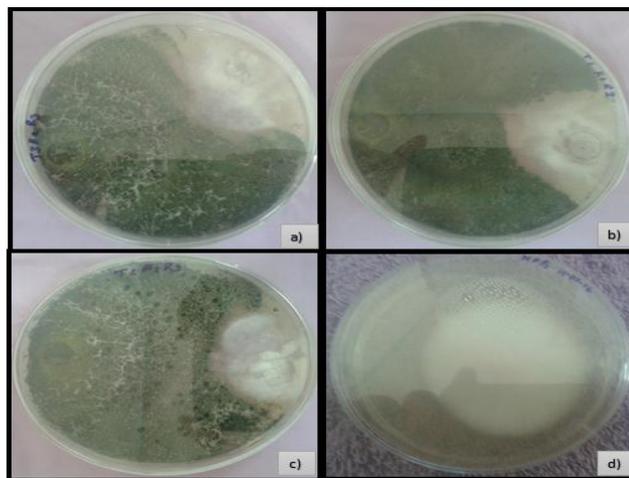
C1= Es el crecimiento radial del testigo (fitopatógeno sin antagonista)

C2= El crecimiento radial del fitopatógeno en los tratamientos Unidad de medida % de inhibición antagonista-patógeno

3.7.1 Determinación Del Tipo De Antagonismo

3.7.1.1 Método 1: enfrentamiento dual

Al evaluar la efectividad de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium spp.* se procedió a medir el crecimiento radial del patógeno como testigo y el patógeno como tratamiento en periodos de 24 horas durante 168 horas (24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas) o hasta que el patógeno tome contacto con el antagonista o cese su crecimiento.



Fotografía 5-3. a) Aislamiento 1 *Fusarium spp.* Vs *Trichoderma spp.* a los 120 horas;
b) Aislamiento 2 a las 144h;
c) Aislamiento 3 168h;
d) Crecimiento del testigo

Fuente: Díaz E 2016

Mediante el análisis del coeficiente de variación se observó que *Trichoderma harzianum* presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a las cepas de *Fusarium spp.* con un coeficiente de variación de 29,48% y una media general de 1,27 cm a las 96 horas de crecimiento. Esto se debe principalmente a que *Trichoderma* presenta una mayor velocidad de crecimiento.

Tabla 5-3: Cuadro de análisis de la varianza del coeficiente de variación a 29,48% a las 96 horas de incubación

F.V.	SC	gl	p-valor
<i>FUSARIUM</i>	0,20	2	0,4868
<i>TRICHODERMA</i>	1,27	1	0,0089
<i>TRICHODERMA</i> * <i>FUSARIUM</i>	0,28	2	0,3667
Error	1,57	12	
Total	3,32	17	

F.V.: Factor de Variación
 SC: suma de cuadrados total\
 gl: grados de libertad
 p-valor: probabilidad al 5%
 Elaborado por: Díaz E. 2016

El porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), de acuerdo a los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC), *F. redolens* tiene un menor porcentaje inhibición de crecimiento (20,3%) que *F. oxysporum* (26,9%) frente a *Trichoderma harzianum*, medido a las 144 horas (tabla 6-3).

Tabla 6-3: porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), a las 144 horas

Código	144 horas	Código	144 horas
A1F1R1	12,5	A1F2R1	20,0
A1F1R2	7,5	A1F2R2	37,5
A1F1R3	17,5	A1F2R3	32,5
A2F1R1	35,0	A2F2R1	5,0
A2F1R2	30,0	A2F2R2	25,0
A2F1R3	42,5	A2F2R3	22,5
A3F1R1	7,5	A3F2R1	22,5
A3F1R2	2,5	A3F2R2	40,0
A3F1R3	27,5	A3F2R3	37,5
Promedio	20,3	Promedio	26,9

A= Aislamiento de *Trichoderma spp.* (1,2,3)

F1= *F. redolens*

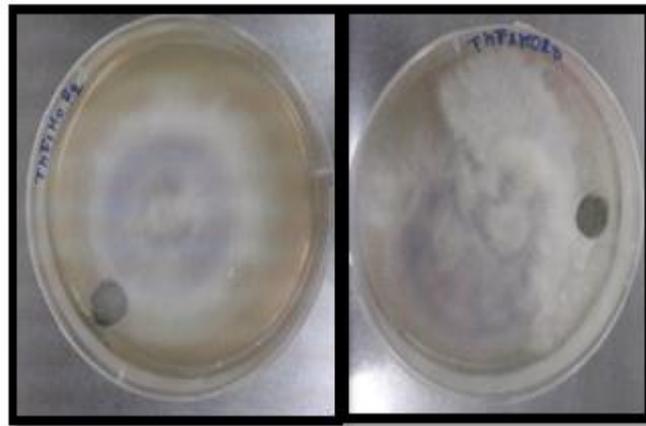
F2= *F. oxysporum*

R1= Numero de repeticiones

Elaborado por: Díaz E. 2016

3.7.2 Método 2: Colocaciones de discos invertidos sobre el patógeno

Mediante la realización de este método no se presentó micoparasitismo, es decir, *T. harzianum* no logró crecer sobre la superficie del micelio de *F. redolens* y *F. oxysporum*. Tampoco se evidenció penetración o enrollamiento de las hifas de *T. harzianum* sobre las de *F. redolens* y *F. oxysporum*, lo que indica que esta cepa de *Trichoderma* no posee la capacidad de micoparasitar a este patógeno (fotografía 6-3). Este comportamiento probablemente ocurrió porque la quitina de la pared celular de *F. redolens* y *F. oxysporum* está cubierta por una capa proteica que previene su degradación por las quitinasas y las β -1-3-glucanasas que produce *T. harzianum*, lo cual dificulta el proceso de control de esta cepa en una avanzada infección por parte de *Fusarium spp.* (Inbar, 1997, pp. 141:2823-2829). Debido a que no se produjo crecimiento no se puede aplicar la fórmula del PIC descrita anteriormente.

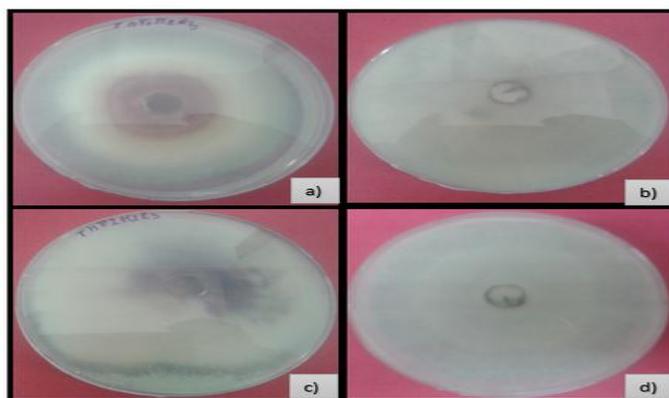


Fotografía 6-3. Cultivos de discos invertidos sobre el patógeno

Fuente: Díaz E. 2016

3.7.3 Método 3: Por compuestos volatilizados.

Mediante el método de compuestos volatilizados se pudo constatar macroscópicamente que *Trichoderma harzianum* ocupó el agar correspondiente dentro de su cultivo e incluso llegó a invadir la caja de *F. oxysporum* aunque este hongo patógeno logro ocupar toda su caja. En el caso de *F. redolens*, *T. harzianum* se desarrolló con normalidad en su caja de Petri pero no logró colonizar la caja del hongo patógeno. Sin embargo si limitó el desarrollo de *F. redolens* impidiendo que ocupara toda la caja de Petri.



Fotografía 7-3. Cultivo de *Trichoderma spp.* Vs *Fusarium spp.* por compuestos volátiles
a) Reverso de Crecimiento de *F. redolens*;
b) Reverso del crecimiento de *Trichoderma*;
c) reverso de crecimiento de *F. oxysporum*
d) Reverso del crecimiento de *Trichoderma*;

Fuente: Díaz E. 2016

Se ha demostrado la utilidad de los compuestos volátiles en la defensa, protección y comunicación de las plantas y hongos. Por lo general son sustancias altamente lipofílicas, de bajo peso molecular, que se evaporan al ser expuestos al aire o a temperatura ambiente, y cuyas presiones de vapor son altas (Vaughn, 2001).

De acuerdo a los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC), *F. redolens* tiene un mayor porcentaje inhibición de crecimiento (35,23%) que *F. oxysporum* (27,5%) frente a *Trichoderma harzianum*, medido a las 144 horas (tabla 6-3). Los compuestos volátiles pertenecen a numerosas clases estructurales como mono y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, lactonas y ésteres. Estos metabolitos están involucrados en diferentes procesos biológicos como biocontrol o su relación con el ambiente. Los metabolitos de *Trichoderma* actúan de forma antibiótica contra patógenos de las plantas y pueden promover el crecimiento de las mismas, así como otórgales resistencia sistemática. A su vez ha sido demostrado que los metabolitos volátiles juegan un rol importante en el micoparasitismo. Por ejemplo, la 6-pentilo-alfa-pirona reduce el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* y promueve el crecimiento de plantas (Stoppacher, et. al., 2010, pp.187-183).

Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición micelial

Código	144h
F1ThM3R1	34,3
F1ThM3R2	37,1
F1ThM3R3	34,3
PROMEDIO	35,23
F2ThM3R1	37,5
F2ThM3R2	22,5
F2ThM3R3	22,5
PROMEDIO	27,5

F1= *F. redolens*, F2= *F. oxysporum*,
Th=*Trichoderma harzianum*,
R= número de repetición
Elaborado por: Díaz E. 2016

3.8. Evaluación física de la compatibilidad in Vitro de los aislamientos de Trichoderma spp. frente a productos agrícolas sintéticos utilizados por la Florícola Happiness Flowers

Existen diversas técnicas para evaluar productos agrícolas químicos en el laboratorio, proporcionando resultados muy rápidos, eliminando la necesidad de probarlos en el campo y reduciendo así los costos de investigación. Estas técnicas son necesarias para conocer la sensibilidad de los agentes biológicos a los agroquímicos que se emplearán en la Florícola Happiness Flowers, con el fin de conservar la capacidad controladora de estos organismos y establecer medidas para su uso eficiente. Para la evaluación de la compatibilidad de *Trichoderma spp.* sobre los productos agrícolas sintéticos se seleccionaron todos los que utiliza la Florícola Happiness para combatir enfermedades en la producción del clavel (Tabla 7-3).

Tabla 8-3: Pesticidas utilizados en la Florícola Happiness Flowers, tipo de pesticida y la dosis aplicada para la evaluación

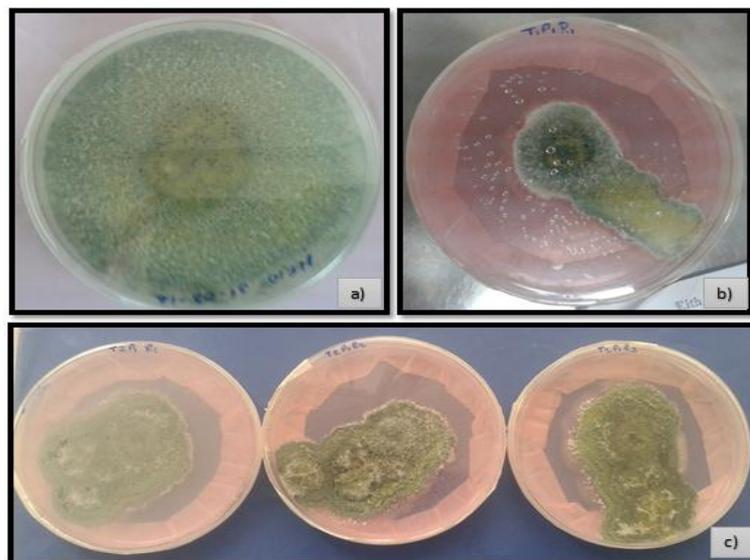
Nº	Ingrediente Activo	Nombre Comercial	Tipo de Pesticida	Dosis
1	Thiodicarb	CARBIN 350 SC	Insecticida	0,18 mL
2	Acetamiprid	ACETAMIPRID 20 SP	Acaricida	0,18 MI
3	Fipronil	REGENT® 200 SC	Insecticida	0,18 MI
4	Clorotalonil	DACONIL 720	Fungicida	0,18 mL
5	Dicofol+Tetradifom	ACARIN T	Acaricida	0,18 MI
6	Metamidofos	METHAN 600	Acaricida + Insecticida	0,18 mL
7	Carbendazim	Arbendazim 50	Fungicida	0,18 mL
8	Profenofos	Profenofos 50% EC	Insecticida, Acaricida	0,18 mL
9	Mancozeb	Mancozeb 80% WP	Fungicida	0,45 g
10	Carboxín + captan	VITAVAX	Fungicida	0,54 g
11	Pentacloronitrobenzeno	TERRACLOR® 75 %,	Fungicida Desinfección	0,9 g

Elaborado por: Díaz E. 2016.

Al evaluar la compatibilidad que producen los productos agrícolas sintéticos al aplicarlos en el agar PDA se obtuvieron los siguientes resultados:

3.8.1. Thiodicarb (Carbin 350 Sc)

Como se puede observar en la Fotografía. 8-3, a pesar de que el crecimiento de *Trichoderma harzianum* no es en forma circular como normalmente ocurre, durante su desarrollo presenta anillos concéntricos. El color no varió presentándose de amarillo a verdoso. Su esporulación fue muy lenta debido a la presencia del Thiodicarb. Por lo tanto es factible el uso combinado de ambos para el tratamiento de *Fusarium spp.* pero en bajas dosis de este producto.

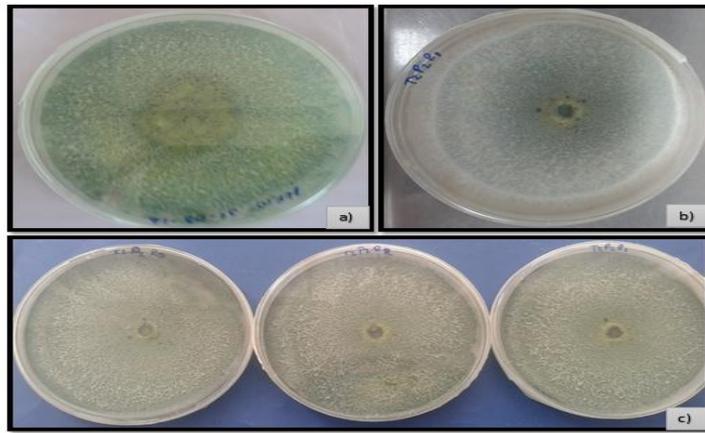


Fotografía 8-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre Thiodicarb
a) Testigo de *T. harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con thiodicarb;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.2. Acetamiprid (Acetamiprid 20 Sp)

De acuerdo a la Fotografía 9-3, el Acetamiprid permite el desarrollo de *T. harzianum*, con las mismas características habituales que tiene el testigo, siendo compatible con este producto. Sin embargo debe usarse en dosis bajas tal y como lo recomienda el E.I.A (Estudio de Impacto Ambiental) de la empresa Interoc S.A. (Sucursal Colombia). Esto nos indica que puede ser usado en tratamientos conjuntos con *T. harzianum* frente a *Fusarium spp*, ayudando a la degradación de este patógeno sin afectar de manera importante a *Trichoderma spp*.

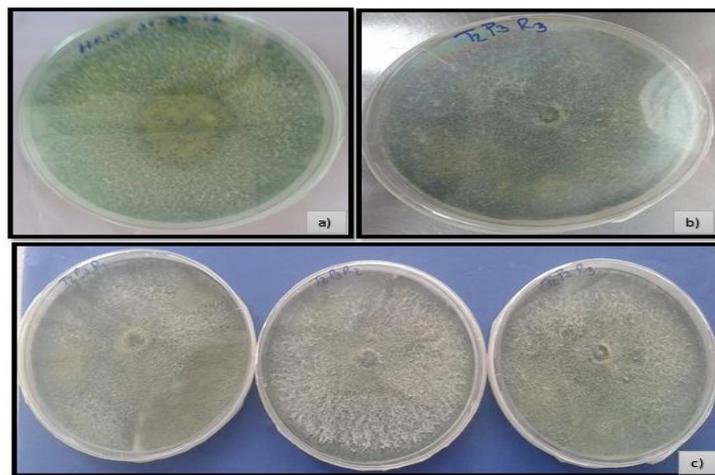


Fotografía 9-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre Acetamiprid
a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con acetamiprid;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas;

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.3. Fipronil (Regent® 200 Sc)

De acuerdo a la Fotografía 10-3, *Trichoderma spp.* se desarrolla de manera normal en PDA suplementado con este insecticida. Se pudo observar que esta especie de *Trichoderma sp.* también es compatible con el Fipronil y que las colonias conservan sus características en presencia de este químico. En su inicio tienen color blanco, y posteriormente se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa.

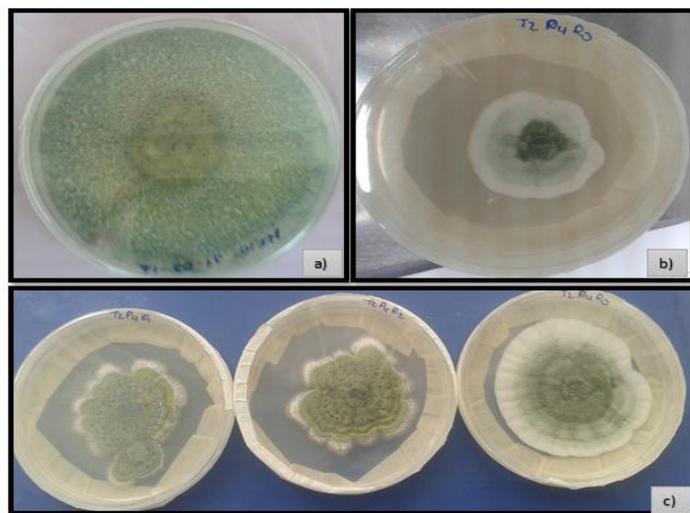


Fotografía 10-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre fipronil
a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a la 72 horas con fipronil;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.4. Clorotalonil (Daconil 720)

De acuerdo con la Fotografía. 11-3, el crecimiento de *T. harzianum* se desarrolla lentamente en presencia de clorotalonil aunque sin alteración de sus características fisiológicas, presentando una coloración de verdosa a blanco, con anillos concéntricos y con esporulación débil. Por lo tanto de cierta manera se demuestra que puede ser combinado con el tratamiento de los hongos del género *Trichoderma sp.*

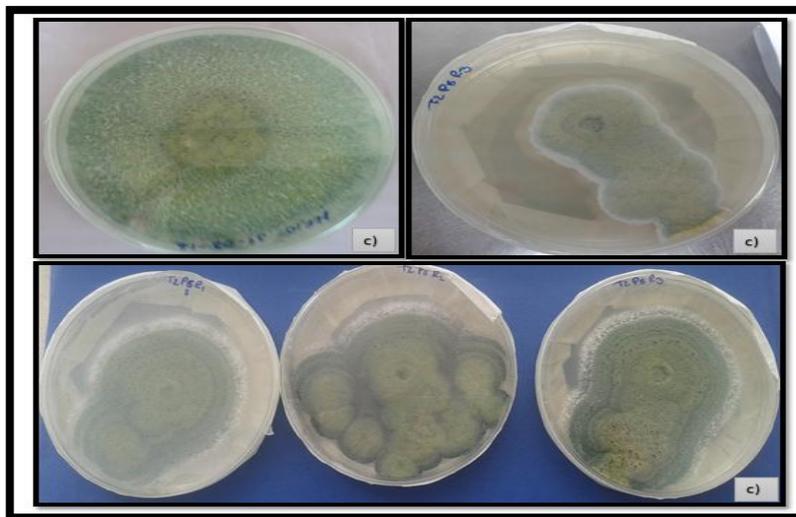


Fotografía 11-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre clorotalonil
a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con clorotalonil;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.5. Dicofol + Tetradifon (Acaraint)

Tal y como podemos observar en la Fotografía 12-3, en las cajas petri con Agar PDA adicionado con una dosis de 1,8mL de Dicofol+Tetradifon, el crecimiento de *T. harzianum* es lento debido a la presencia de este insecticida, pero logra colonizar en un 90% de la totalidad la caja petri desarrollándose sin ningún inconveniente. Por esta razón se puede afirmar que esta especie de *Trichoderma* es resistente a este producto agroquímico. Algunos microorganismos ejercen transformaciones degradativas sobre determinados productos químicos, por lo que pueden emplearse en biorremediación, como es el caso de *T. harzianum* (Puerto, et. al., 2014, pp, 6-15)

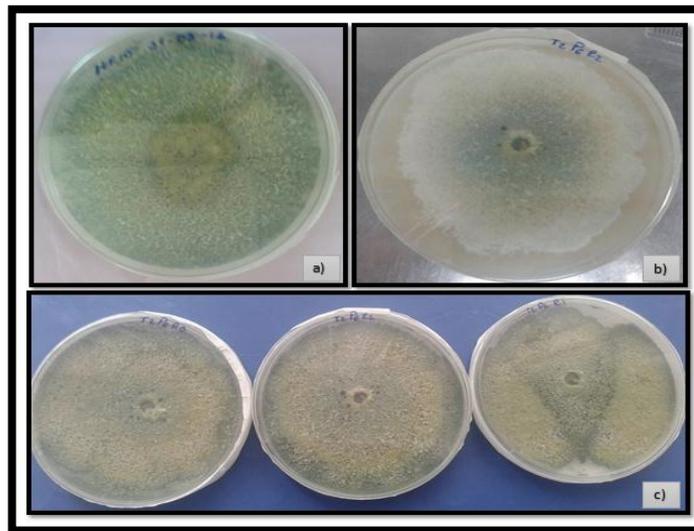


Fotografía 12-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre dicofol + tetradifon
a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con dicofol+tetradifon;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.6. Metamidofos (Methan 600)

De acuerdo a la Fotografía 13-3 podemos observar que *T. harzianum* crece con normalidad sobre el Agar PDA suplementado con una dosis recomendada de metamidofos, colonizando la caja petri en su totalidad, presentando un color de verde a amarillo y teniendo una esporulación densa, por lo que es factible combinar estos dos tratamientos a dosis bajas del químico.



Fotografía 13-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre metamidofos

a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;

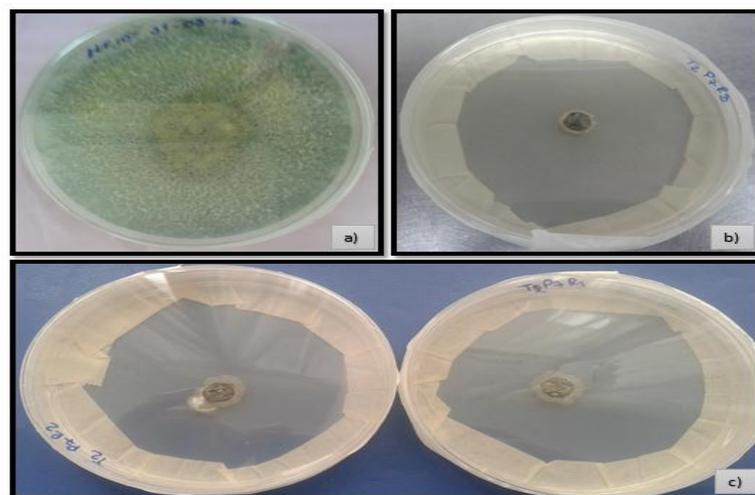
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con metamidofos;

c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.7. Carbendazim (Carbendazim 50)

Como se puede observar en la Fotografía 14-3, el Carbendazim mostró una inhibición total del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, y de la esporulación, incluso sobre el disco de origen, por lo que no es apropiado utilizar prolongadamente este fungicida al poder eliminar microorganismos que son benéficos en el suelo. Teniendo en cuenta las perspectivas de la agricultura a nivel mundial en las que se pretende obtener productos más sanos y disminuir las afectaciones al medio ambiente, se deben realizar pruebas de compatibilidad de productos químicos y biológicos para posibilitar el manejo eficaz de un sistema agrícola (Reyes, Infante, et. al., 2012, pp. 49-51), evitando así la eliminación de estos agentes biológicos beneficiosos, como es el caso de *Trichoderma spp.* Debido a la inhibición mostrada por el Carbendazim se debería restringir su uso para posibilitar el tratamiento biológico sostenible a partir de la utilización de *Trichoderma spp.*



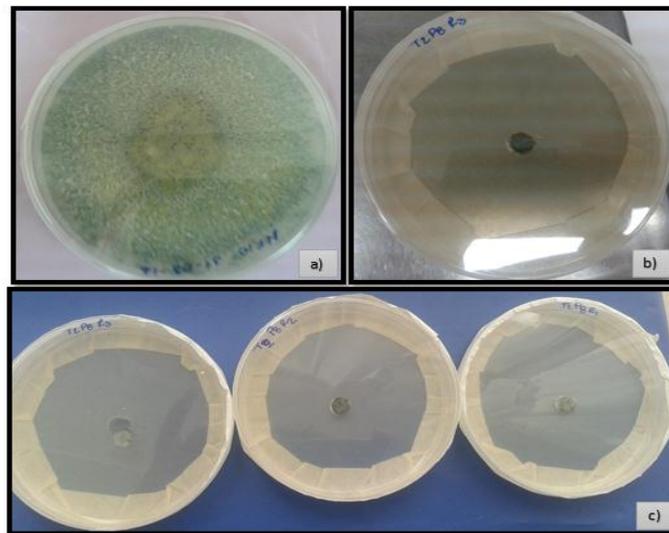
Fotografía 14-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre Carbendazim

- a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
- b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con carbendazim;
- c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.8. Profenofos (*Profenofos 50% Ec*)

De acuerdo a la Fotografía 15-3, suplementar el agar PDA con una dosis de 1,8mL de profenofos es letal para el desarrollo de las cepas de *T. harzianum*. Este tipo de insecticida no permite el crecimiento micelial ni la germinación conidial de las cepas de este hongo debido a su toxicidad (Sanchez y Sanches, 1984). Debido a esta incompatibilidad con el crecimiento de *Trichoderma spp.* el Profenofos debería de ser menos usado en el caso de tratamientos biológicos de suelos infectados con *Fusarium spp.*. Sin embargo, al pertenecer al grupo de los Organofosforados, se caracteriza por tener un espectro de acción más estrecho que el de los organoclorados y por lo tanto su uso reduce la destrucción de otros insectos que pueden ser beneficiosos para el suelo de las plantaciones de clavel. Esto hace que la aplicación o no de este producto dependa del tipo de plaga que se pretenda tratar.

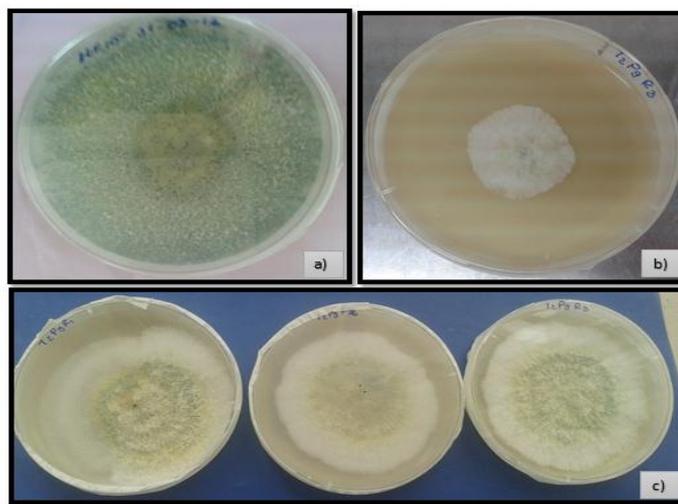


Fotografía 15-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre profenofos
a) Testigo de *T. harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con profenofos;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.9. Mancozeb (Mancozeb 80% Wp)

Como se puede observar en la Fotografía 16-3, mancozeb no disminuye la actividad ni el crecimiento biológico de *T. harzianum*, pero sí altera sus características físicas. En el Agar PDA a una dosis de 0,45 g, se observa una apariencia de color blanco a amarillo según avanzaba el crecimiento micelial, mientras que los testigos fueron color verde turquesa y con una esporulación densa.

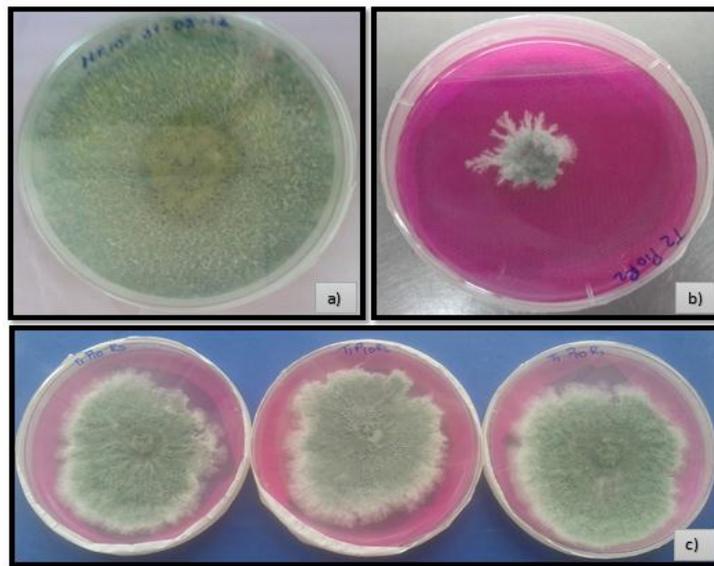


Fotografía 16-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre mancozeb
a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con mancozeb;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.10. Carboxin + Captan (Vitavax 300)

El ingrediente activo carboxin + captan, como podemos observar en la Fotografía 17-3, permitió el crecimiento de *T. harzianum* hasta ocupar toda la caja de Petri y que germinaran los conidios, presentando una forma esponjosa y de color de verde a blanco en los límites de crecimiento de la colonia. El crecimiento y apariencia de las colonias de este hongo fueron distintos en el testigo, por lo que este producto químico si produce cambios en sus características a pesar de no afectar a su crecimiento.

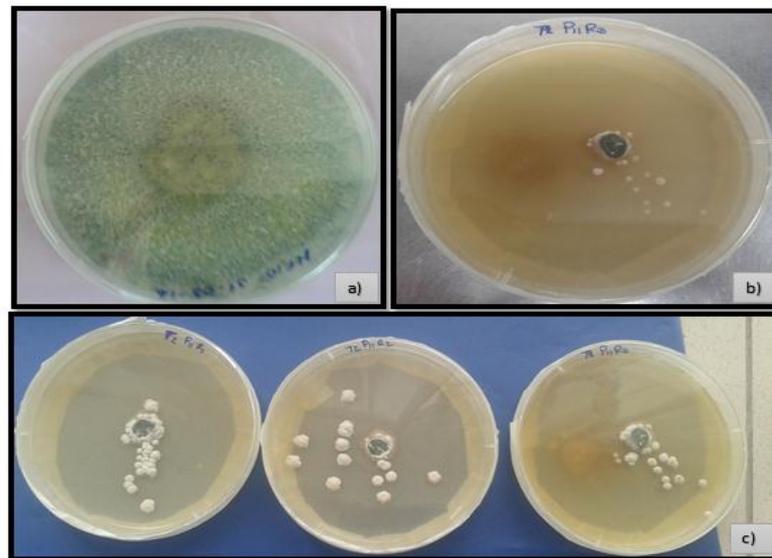


Fotografía 17-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre carboxin+captan
a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;
b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con carboxin + captan;
c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.11. Pentacloronitrobenzeno (Terraclor® 75 %)

El Pentacloronitrobenzeno en Agar PDA, como podemos observar en la fotografía 18-3, posibilita un crecimiento leve de *Trichoderma harzianum*, pero durante el crecimiento las colonias no conservan las características físicas presentes en los testigos. Por consiguiente, este fungicida utilizado para la desinfección de hongos patógenos, no permite el desarrollo normal de *T. harzianum* y podría afectar negativamente al ambiente debido a que presenta una vida media que va de 4 a 10 meses. Este hecho indica que debería restringirse su uso debido a que no es compatible con los tratamientos realizados con *Trichoderma spp.* además de presentar un alto riesgo ambiental por su alta persistencia en el suelo.



Fotografía 18-3. Compatibilidad de *Trichoderma* sobre pentacloronitrobenzeno

a) Testigo de *Trichoderma harzianum*;

b) Compatibilidad de *T. harzianum* a las 72 horas con pentacloronitrobenzeno;

c) Repeticiones y final de crecimiento de *T. harzianum* a las 168 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.8.12 Evaluación estadística de la compatibilidad con respecto a la velocidad de crecimiento con respecto de T. harzianum.

A partir de los muestreos realizados en diez puntos distintos de la Florícola Happinnes Flowers se pudo muestrear una mayor área de dicha florícola, obteniéndose en todos los aislamientos realizados solamente a la especie *Trichoderma harzianum*. El uso de esta metodología para la obtención de muestras es de gran importancia para el desarrollo de este tipo de estudios, ya que posibilita la obtención de todas las cepas presentes en el suelo para posteriormente poder describir su actividad, su compatibilidad con compuestos químicos de uso habitual y su velocidad de crecimiento bajo condiciones controladas. Varios factores son los que determinaron el crecimiento de esta cepa, entre los que destacó el tipo de producto químico con el que se suplementó el agar PDA en el que se inoculó *Trichoderma harzianum*. Estos factores pueden afectar en su nutrición, en su capacidad de esporulación y en su capacidad para degradar al componente químico.

Como se ha podido observar en las anteriores descripciones, *Trichoderma harzianum* puede diferir en su crecimiento, así como en su aspecto físico, respecto a su cultivo sin los compuestos químicos mencionados. Una vez se analizaron estadísticamente los datos obtenidos respecto a la velocidad de crecimiento usando el programa informático “Infostat” para realizar la prueba de Tukey, se encontró que todos los fungicidas, herbicidas, insecticidas y acaricidas se comportaron de diferente manera dependiendo del principio activo que estos poseían, encontrándose comportamientos homogéneos de acuerdo a su tipo.

Para el análisis se utilizó la fórmula tomada de Facolni, (2010)

$$V = E/T$$

Dónde:

V = Velocidad de crecimiento (mm o cm)

E = Diámetro de crecimiento diario

T = Tiempo (número de horas).

Tabla 9 -3: Cuadro de Análisis de la Varianza a las 76 h; coeficiente de variación de la velocidad de crecimiento al 33,13%

F.V.	SC	gl	F	p-valor
Modelo	34,82	32	4,18	<0,000
TRICHODERMA	0,53	2	1,02	0,3657
PESTICIDA	28,66	10	11,00	<0,0001
TRICHODERMA*PESTICIDA	5,51	20	1,06	0,4130

SC: suma de cuadrados total

gl: grados de libertad.

F: Variación entre puntuaciones

p-valor: probabilidad al 5%

Elaborado por: Díaz E. 2016

Tabla 10-3: Cuadro prueba Tukey al 5% las 76 horas, coeficiente variación al 33,13%

PESTICIDA	Medias (V)	Rango
Acetamiprid	2,65	A
Fipronil	2,06	A B
Metamidofos	1,93	A B
Dicofol+Tetradifom	1,63	B C
Mancozeb	1,61	B C
Thiodicarb	1,56	B C
Clorotalonil	1,51	B C D
Carboxín + captan	1,35	B C D
Pentacloronitrobenzeno	0,96	C D
Profenofos	0,83	C D
Carbendazim	0,71	D

V= velocidad de crecimiento

CV: Coeficiente de variación

A-B: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Díaz E. 2016

Para incorporar productos biológicos en el manejo de un cultivo, es imprescindible conocer la sensibilidad de los agentes biológicos a los agroquímicos que se emplearán en dicho manejo con el fin de conservar su capacidad controladora y establecer medidas para su uso eficiente (Martínez e Infante, 2013, pp. 6-7)

En las pruebas in vitro se observó una fuerte inhibición del crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* frente al fungicida carbendazim y pentacloronitrobenzeno, y del acaricida Profenofos, a una dosis similar a la de aplicación en los cultivos de clavel. Sin embargo, los fungicidas carboxín + captan, mancozeb, clorotalonil (fungicidas), Thiodicarb (insecticida), y dicofol + tetradifom (acaricida) fueron ligeramente compatibles con la especie *Trichoderma harzianum*, y Acetamiprid, metamidofos (acaricida) y fipronil (insecticida) mostraron mayor compatibilidad sobre este agente de control biológico, provocando únicamente algunas variaciones en los bordes, coloración de las colonias y textura del micelio (Tabla 10-3).

En algunos estudios se ha comprobado que *Trichoderma spp.* es capaz de degradar organoclorados, clorofenoles e insecticidas como dicloro difenil tricloroetano (DDT), endosulfán, aldrin, dieldrin y pentacloronitrobenzeno, y herbicidas como trifluralin y glifosato (Espósito y Dasilva, 1998 pp. 24:98-98). Esto puede ser indicativo de que no solamente puede ser utilizado para el tratamiento de hongos patógenos, sino que también se podría usar para procesos de biorremediación.

3.9. Evaluación física del crecimiento de F. oxysporum y F. redolens con respecto a fungicidas

Con el fin de poder comparar la efectividad de *Trichoderma harzianum* respecto a los productos que normalmente son usados para el control biológico de *Fusarium spp.*, se evidenció la necesidad de evaluar la susceptibilidad de cada cepa de *Fusarium spp.* a los fungicidas empleados en los escenarios comunes de aplicación, y así ver si es necesario buscar formas alternativas de tratamiento para el control de este patógeno de una manera más sustentable ambientalmente hablando.

Para la evaluación de física de compatibilidad se utilizaron los fungicidas que figuran en la Tabla 11-3, que son los utilizados habitualmente para prevenir o controlar enfermedades producidas por *F. oxysporum* y *F. redolens*.

Tabla 11-3: Fungicidas de evaluación de compatibilidad

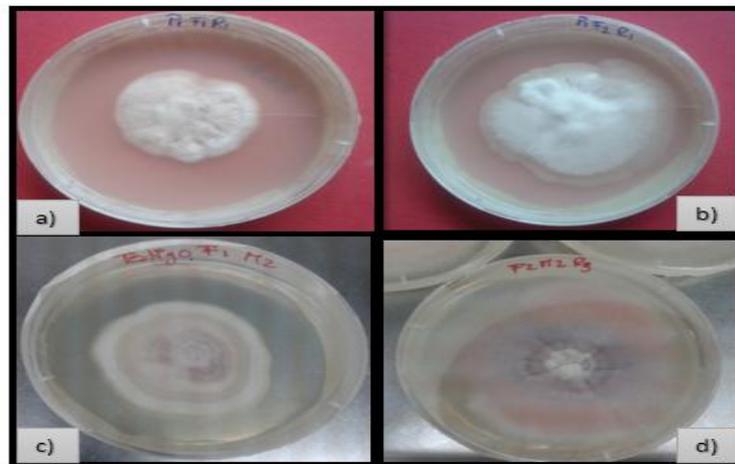
N°	Ingrediente Activo	Nombre Comercial	Tipo de Pesticida	Dosis
1	Clorotalonil	DACONIL 720	Fungicida	0,15 mL
2	Carbendazim	Arbendazim 50	Fungicida	0,15 mL
3	Mancozeb	Mancozeb 80% WP	Fungicida	0,37 g
4	Carboxín + captan	VITAVAX	Fungicida	0,45 g
5	Pentacloronitrobenzeno	TERRACLOR® 75 %,	Fungicida- Desinfección	0,75 g

Elaborado por: Díaz E. 2016

A continuación se resalta las características físicas:

3.9.1.1. Clorotalonil

En presencia de clorotalonil, las colonias de la cepa *F. redolens* presentaron a las 168 horas escaso micelio aéreo, apariencia algodonosa de color blanco y con un ligero abultamiento en el centro, no presentaron ningún tipo de pigmento, y creció menos que la cepa de *F. oxysporum*. Su desarrollo se completó a los 7 días de incubación (Fig. 26-3). Por otro lado *F. Oxysporum* presentó un crecimiento más prolongado con colonias ilimitadas, en forma algodonosa, de no controlar a tiempo estos fitopatógeno pueden causar infestación en el cultivo de clave.



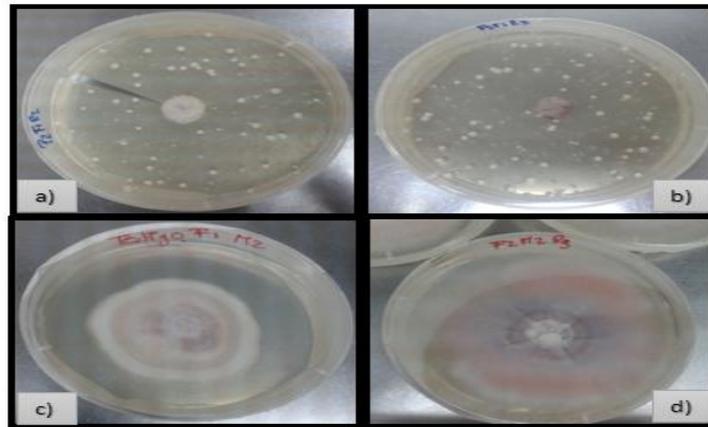
Fotografía 19-3. Compatibilidad de *Fusarium spp.* sobre clorotalonil

- a) Cultivo de *F. redolens* en clorotalonil a las 168 horas;
- b) Cultivo de *F. oxysporum* en clorotalonil a las 168 horas
- c) Cultivo de *F. Redolens* en agar a las 120 horas PDA;
- d) Cultivo de *F. oxysporum* en agar PDA a las 120 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.9.1.2. Carbendazim

Tanto en *F. redolens* como en *F. oxysporum*, Carbendazim no permitió el desarrollo de las cepas durante el tiempo de incubación de 168 horas (Fotografía. 19-3).

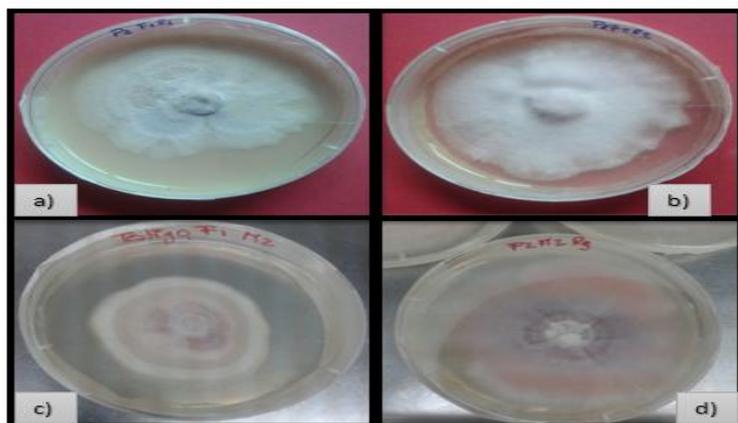


Fotografía 20-3. Compatibilidad de *Fusarium spp.* sobre carbendazim
a) Cultivo de *F. redolens* en carbendazim a las 168 horas;
b) Cultivo de *F. oxysporum* en carbendazim \ a las 168 horas
c) Cultivo de *F. redolens* en agar a las 120 horas PDA;
d) Cultivo de *F. oxysporum* en agar PDA a las 120.

Fuente: Díaz E. 2016

3.9.1.3. Mancozeb

Fusarium redolens, en presencia de mancozeb, no se desarrolló en su totalidad a las 168 horas, debido a las condiciones ácidas que presentó el medio de cultivo. Su colonia fue limitada y algodonosa, careciendo de micelio aéreo. Por otra parte *Fusarium oxysporum* presentó colonias ilimitadas algodonosas de color blanco (Fig. 21-3), por lo que en presencia de este principio activo las cepas de *Fusarium oxysporum*. se pueden desarrollar totalmente y afectar en su totalidad al cultivo de clavel si no se emplea un método alternativo eficaz y adecuado para este patógeno.

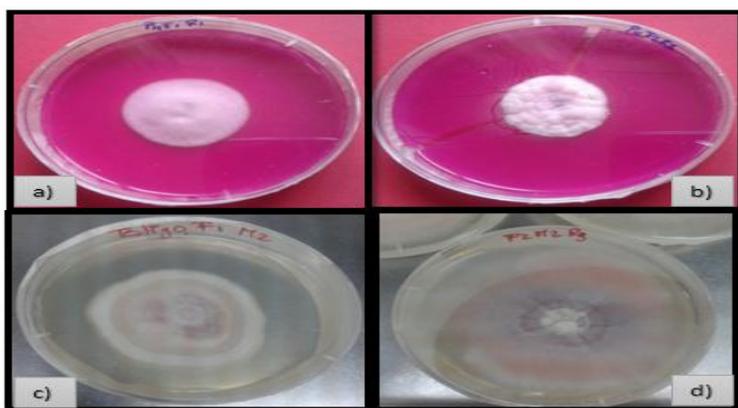


Fotografía 21-3. Compatibilidad de *Fusarium spp.* sobre mancozeb
 a) Cultivo de *F. redolens* en mancozeb a las 168 horas;
 b) Cultivo de *F. oxysporum* en mancozeb a las 168 horas
 c) Cultivo de *F. Redolens* en agar a las 120 horas PDA;
 d) Cultivo de *F. oxysporum* en agar PDA a las 120.

Fuente: Díaz E. 2016

3.9.1.4. Carboxín + captan

En medios suplementados con Carboxin + Captan, tanto *F. redolens* como *F. oxysporum* crecieron de forma limitada pero aproximadamente con radio igual, aunque presentaron diferencias en sus características macroscópicas. Las colonias de *F. redolens* presentaron su micelio aéreo de forma vertical, mientras que las colonias de *F. oxysporum* presentaron su micelio aéreo abultado de forma algodonosa.

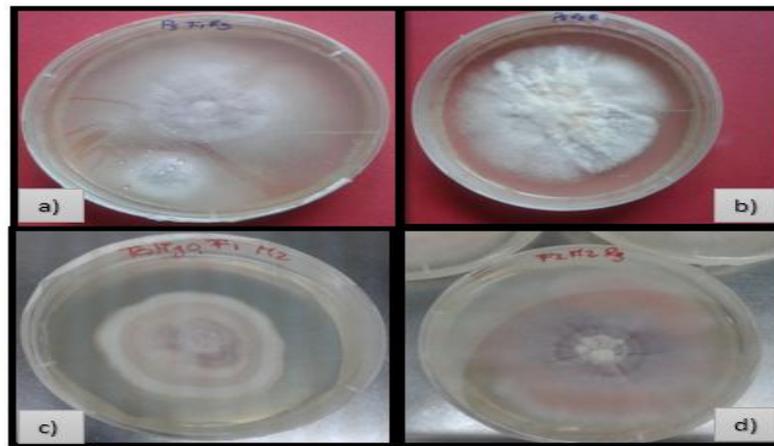


Fotografía 22-3. Compatibilidad de *Fusarium spp.* sobre carboxin+captan
 a) Cultivo de *F. redolens* en carboxin + captan a las 168 horas;
 b) Cultivo de *F. oxysporum* en carboxin + captan a las 168 horas
 c) Cultivo de *F. Redolens* en agar a las 120 horas PDA;
 d) Cultivo de *F. oxysporum* en agar PDA a las 120.

Fuente: Díaz E. 2016

3.9.1.5. Pentacloronitrobenzeno

En presencia de Pentacloronitrobenzeno, las colonias de *F. redolens* presentaron un aspecto algodonoso, de color blanco, planas, con pigmento difusible de color morado y fueron ilimitadas cubriendo todo el agar. Las colonias de *F. oxysporum* también presentaron un aspecto algodonoso, de color blanco con leves tonalidades moradas, planas e ilimitadas. Las características de las colonias en los tratamientos variaron respecto al testigo en cuanto a la forma de los bordes, la textura del micelio y la coloración (Fotografía 23-3).



Fotografía 23-3. Compatibilidad de *Fusarium spp.* sobre pentacloronitrobenzeno

- a) Cultivo de *F. redolens* en pentacloronitrobenzeno a las 168 horas;
- b) Cultivo de *F. oxysporum* en pentacloronitrobenzeno a las 168 horas
- c) Cultivo de *F. Redolens* en agar a las 120 horas PDA;
- d) Cultivo de *F. oxysporum* en agar PDA a las 120 horas.

Fuente: Díaz E. 2016

3.9.2. Evaluación estadística de la compatibilidad con respecto a la velocidad de crecimiento de *Fusarium spp.*

Para analizar los siguientes datos se utilizó la misma metodología que con la velocidad de crecimiento respecto a *Trichoderma spp.* Como resultado se obtuvo que el crecimiento de *F. Redolens* y *F. oxysporum* presenta diferencias significativas (al 5%) para los tratamientos con fungicidas, con un coeficiente de variación del 1,94%, tal y como se señala en la Tabla 11-3.

Tabla 12-3: Cuadro de Análisis de la Varianza a las 72 horas de crecimiento *F. redolens* y *F. oxysporum* con un coeficiente de variación 1,94%,

Variación	SC	gl	F	p- valor
PESTICIDA	1,6E-03	4	2,03	0,1281
FUSARIUM	8,5E-05	1	0,44	0,5158
PESTICIDA*FUSARIUM	8,3E-04	4	1,07	0,3958
Error	3,9E-03	20		

SC: suma de cuadrados total
 gl: grados de libertad.
 F: Variación entre puntuaciones
 p-valor: probabilidad al 5%

Elaborado por: Díaz E. 2016

En la Prueba de Tukey, al 5% de nivel de significancia, la compatibilidad de *Fusarium spp* con los fungicidas que son utilizados para controlar enfermedades causadas por el marchitamiento vascular, presentó un solo rango siendo significativo respecto al crecimiento. El fungicida de mayor compatibilidad fue el pentacloronitrobenzeno con una media de 0,73 cm, mancozeb y clorotalonil presentaron una ligera compatibilidad con una media de 0,72 cm, y carboxin + captan y carbendazim presentaron una baja compatibilidad con una media de 0,71cm y un coeficiente de variación de 1,94% a las 72 horas de incubación.

Tabla 13-3: Prueba de Tukey al 5% de comparación de medias de la velocidad de crecimiento *F. Redolens* y *F. oxysporum*

Ingrediente Activo	Medias(cm)	Rango
Pentacloronitrobenzeno	0,73	A
Mancozeb	0,72	A
Clorotalonil	0,72	A
Carboxín + captan	0,71	A
Carbendazim	0,71	A

A-B: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Díaz E. 2016

En el test de Fisher, al 5% de nivel de significancia, las dos cepas de *Fusarium spp* tuvieron crecimientos que oscilaron entre 0,72 cm y 0,71 cm (Tabla 14-3), por lo que no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 14-3 Test de Fisher

FUSARIUM	Medias	rango
2	0,72	A
1	0,71	A

A-B: Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p > 0,05$)

Elaborado por: Díaz E. 2016

CONCLUSIONES

Se pudo comprobar la presencia de una especie del género *Trichoderma* en el suelo con cultivos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) de la Floricola Happines Flowers, en los cuales el género *Fusarium* produce enfermedades que afectan a la producción de esta flor.

A través de la recolección de muestras tomadas del suelo con cultivos de clavel se pudieron realizar tres aislamientos de *Trichoderma spp.* y dos de *Fusarium spp.*, de los cuales se identificó morfológica y macroscópica a solamente a *Trichoderma harzianum* con un promedio en sus conidios de 2,439-3,697 μm y filíades 6,329 μm y las cepas *Fusarium redolens* (con un rango de macroconidias de 28,061-2,505 μm); y *Fusarium oxysporum* (con un rango de macroconidias de 25,7-4,9 μm).

Se realizaron diferentes métodos para determinar el efecto antifúngico de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium spp.* obteniendo de media un radio de crecimiento antagonista de 9 cm en 5 días, un radio de crecimiento promedio del patógeno de 9 cm en 7, y un porcentaje de inhibición micelial con un coeficiente de variación de 23,50%. Los aislamientos de *T. harzianum* utilizados presentaron un modo de acción favorable por competencia de nutrientes y espacio debido a su rápido crecimiento, siendo superior al de *F. oxysporum* y *F. redolens*, e impidiendo el desarrollo normal de estos patógenos con una inhibición de más del 50%.

Se observó que *Trichoderma* tiene una resistencia superior a los agroquímicos, incluyendo algunos fungicidas que sirven para el control de *Fusarium spp.*

Sin embargo para *Fusarium redolens* y *Fusarium oxysporum*, la velocidad de crecimiento y resistencia difiere entre cada una de estas cepas. Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que los insecticidas no influyen significativamente en la esporulación de *Trichoderma*, con respecto al acaricida profenofos y el fungicida carbendazim causó inhibición sobre del crecimiento micelial de las cepas de este género. Por lo tanto, en aquellos lugares que se esté realizando un tratamiento biológico con *Trichoderma harzianum*, debe evitarse el uso de los fungicidas Carbendazim y Pentacloronitrobenzeno, y del acaricida Profenofos debido a que estos agroquímicos producen una fuerte inhibición del crecimiento de esta especie.

Los fungicidas químicos que han presentado una mayor actividad inhibitoria del crecimiento de *Fusarium spp.* han sido carboxin + captan y carbendazim. El carbendazim presenta un mayor riesgo ambiental que el carboxin + captan por lo que este último sería el agroquímico de elección para tratar a la cepas de *Fusarium* presentes en la Florícola Happines Flowers.

Trichoderma harzianum no es capaz por si solo de controlar el crecimiento de *Fusarium spp.* por lo que es necesario combinar el uso de este microorganismo con otras especies de *Trichoderma* u otros agentes biológicos antagonicos. También sería posible el tratamiento combinado de este hongo junto con bajas dosis de fungicidas químicos, puesto que al ser menor esta dosis el riesgo ambiental también es menor. Como solo el carboxin + captán permite el crecimiento de *Trichoderma harzianum* e inhibe el de *Fusarium spp.*, este sería el agroquímico de elección en el caso de estos tratamientos combinados.

RECOMENDACIONES

Se recomendaría manejar un antagonista nativo a nivel de invernadero que se encuentre en la Florícola. Además el microorganismo nativo ya puede presentar una buena adaptación a las condiciones medioambientales presentes en el lugar mientras que el microorganismo foráneo posiblemente tenga que pasar por una fase de adaptación que puede hacer que el crecimiento y actividad sean más lentos.

Es necesario manejar de manera consciente el uso de productos agroquímicos debido a que una sobredosis en el suelo puede causar una contaminación severa que podría afectar a la actividad biológica beneficiosa del mismo al inhibir el crecimiento de por ejemplo *Trichoderma spp.*

Se recomendaría evaluar a *Trichoderma harzianum* como agente biorremediador sobre suelos contaminados con agroquímicos utilizados en la Florícola Happiness Flowers ya que el hecho de crecer a pesar de su presencia puede ser indicador de que son capaces de biodegradarlo o bioacumularlo. También sería conveniente usar a esta especie como acelerador de la descomposición del estiércol de animales domésticos al igual que se ha hecho con otras especies de *Trichoderma*.

Debido a que *Trichoderma harzianum* no es capaz por si solo de controlar el crecimiento de *Fusarium spp.* y a que solo el carboxin + captán permite el crecimiento de *Trichoderma harzianum* e inhibe el de *Fusarium spp.*, para el control de estos patógenos se recomienda un tratamiento combinado de carboxín + captan a dosis bajas e inoculación de *Trichoderma harzianum*. Además para el correcto funcionamiento de este tratamiento combinado se debería eliminar el uso del profenofos, sustituyéndolo por acetamiprid o Fipronil.

BIBLIOGRAFÍA

Acurio, R. 2010. “Técnicas de prevención y control de fusarium oxysporum f.sp. dianthi en clavel dianthus caryophyllus y su incidencia en la productividad, [en línea] (tesis) (Maestría), UTA, Ambato, 20-06-2016, pp, 1-85. [Consulta: 08/02/2016] Disponible en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1868/1/tesis-010%20Gesti%C3%B3n%20de%20la%20prod.%20de%20flores%20y%20Frut.....pdf>

ADAMA, Carbin, [en Línea] Guayaquil: Ecuador, 2014. [Consulta: 04-01-2016.] Disponible en: <http://www.adama.com/ecuador/es/crop-protection/insecticide/carbinsc.html>.

Alonzo, D. Sandoval, E. Evaluacio In vitro de Fungicidas para el control de hongos patojenos en esquejes del clavel durante la etapa de enraizamiento.[en línea] (tesis).(maestria) Pontificia Universidad Javeriana, Bogota,Colombia. 2008, pp. 26-42. [Consulta: 08/02/2016] Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis136.pdf>

ANAJALSA. 2015. Anajalsa Agroquimicos, METHAN 600, [en línea] Mexico: 2015. [Consulta: 3-29-2016.] Disponible en: http://www.anajalsa.com.mx/pdf/ficha_25.pdf.

Antalien. 2015. Antalien Agro Quimicos. Profenofos 50% EC. [en línea] Lima: Peru 2015. [Consulta:02-2-16.] Disponible en: <http://www.antalien.net/modulos/productos/archivos/070166dddc1f9387a5fa3288f9bb77da.pdf>

Ares, A. Urquijo, C. Tello, M. Incidencia de la Fusariosis Vascular en los cultivos Incidencia de la Fusariosis Vascular en los cultivos, Vol. 25, n°2. 2000, España pp. 181-194.

Autoridad de Ciencias Ambientales. Ministerio de Ambiente y Desanollo Sostenible de Colombia. Resolucion 0398. [en línea] Bogota: Colombia, 2015. [Consulta: 05-10-2016.] Disponible en: http://www.anla.gov.co/sites/default/files/16692_res_0398_09042015.pdf

Asghar H. Pessaraki, M. Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. Vol. 10, (2010) pp. 274-280:1727_3048.

Barberá, C. Pesticidas Agrícolas. 3º Edición. Barcelona, España: Omega, 1990. p. 216.

BAYER. Bayer Crop Science. REGENT® 200 SC. [en línea] España: 2016. [Consulta: 03 28, 2016.] Disponible en: <https://www.cropscience.bayer.co/es-CO/Productos-e-innovacion/Productos/Insecticidas-Acaricidas/REGENT-200-SC.aspx>. ICA 2244 .

Behar, D. Metodología de la Investigación.[en línea]. Venezuela: Shalom, Vol. 1. 2008. pp. 7-90. [Consulta: 03,25, 2016.] Disponible en: <http://es.slideshare.net/ceferinacabrera/libro-metodologia-investigacion-behar-rivero-1>

Bettiol, W. et al. Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe. 2013, p. 385.

Bernal, A. Andreu, C. Moya, M. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* sp. cubense, [en línea] Vol. 24, nº1, Cuba 2009. [Consulta: 02-05-2016]. Disponible en: http://ugi.espe.edu.ec/ugi/wp-content/uploads/2014/05/Control_biologico_de_enfermedades_de_plantas_en_America_Latina_y_el_Caribe_2014.pdf

Benítez, T. Rincon, A. Limon, C. Condón, A. Biocontrol mechanisms, International Microbiology, Vol. 7, pp. 249-260.

Casanova, E. Sánchez, P. Segarra, G. Borrero, C. Beneficios del uso en la agricultura de agentes de control . *Trichoderma asperellum* cepa T34, 2010, Barcelona, pp. 23-25.

Casimiro, et al. Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). Vol. 27, n°1. 2009, pp. 18-24.

Campbell, A. Biological Control of Microbial Plant Pathogens, Cambridge University Press, 1989. pp. 20-50.

Carrero, J. Planes, S. Plagas de Campo, 13ª Edición, Madrid: Mundi Prensas, 2008, pp. 223 sig.

Cervantes, M. Pro Agro. Vitavax. [en línea] México: 2015. [Consulta 06-05-2016] Disponible en: <http://www.pro-agro.com.mx/prods/bayer/bayer84.htm>.

Chincholkar, S. Mukerji, K. Biological Control of plant Diseases. London : The Haworth Press Inc., 2007.

Córdoba, J. Martín, R. Rodríguez, F. Principio de emergencia urgencias, y cuidados Médicos. [en línea] [Consulta: 05 06, 2016.]. México: 2015 Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsapud/e/matedu/carbamato/carbamato.pdf>.

Dinesh, R. Prateeksha, M. Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences, Vol. 3, 2015 Uttarakhand: Pantnagar, pp. 20-23.

Domsch, K. Compendium of Soil Fungi, Vol. 1, Germany: IHW-Verlag, 1993, p. 321–325:795.

Druzhinina, I. Kopchinskiy, A. International Subbcomision on Trichoderma and Hyprocrea Taxonomy, ISTH. [en línea] Viena:Austria, 2008, [Consulta: 03-28-2016]. Disponible en: <http://www.isth.info/morphology.php>.

ECUAQUIMICA. Grupo Edifarm, DACONIL 720SC, [en línea] Quito:2015. [Consulta: 04-1-2016]. Disponible en: http://www.ecuaquimica.com.ec/pdf_agricola/DACONILULTREX.pdf.

ECUAQUIMICA. TERRACLOR 75%. [En línea] Quito:Ecuador, 2015. [Consulta: 04-2-016]. Disponible en: http://www.ecuaquimica.com.ec/pdf_agricola/TERRACLOR.pdf.

Espósito, E. Dasilva, M. Systematics and enviromental application of the genus Trichoderma. Microbiology. Vol. 24, 1998. pp. 24:89-98.

EXPOFLORES. Informe Anual de Exportaciones de Flores 2015, [en línea]. 2015. [Consulta: 03-03-2016]. Disponible en: <https://sway.com/arN17HuKwaUWESr2>.

Facolni, C. Manual de Taxonomía de Trichoderma spp. Microorganismos Agrícolas ecuatorianos. Quito. 2010. pp. 3-40.

Flores, V. Determinación del efecto antagónico de cepas nativas de Trichoderma spp. frente a Mycosphaerella fijiensis en plantas de banano a nivel de invernadero. (Tesis) (Pregrado) (Ingeniero en Biotecnología), Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba. 2015. pp. 4-44.

Garcés, Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer, [en línea]. Colombia: 2001. [Consulta: 03-03-2016] Vol. 6, n°1, pp. 11-14.

Garcés, et al. Soluble protein contents, isozime characterization, benomyl response, vegetative compatibility and micelial growth of Fusarium oxysporum f. sp. dianthi., 1992, Vol. 307.

Harman, E. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, Vol. 84, 2000, pp. 84-337.

Harman, E. Kubicak, C. *Trichoderma and Gliocadium*, Vol. 2, London: Taylor Francis & library. 2005, pp. 70-75

Hernandèz, J. Sanchez, M. Jesus, G. Gonzales, J. Caracterizaciòn de *Trichoderma* spp. Caracterizaciòn molecular y agronòmica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del Noroeste de Mexico, Vol. 13, n°2 2010, (Mèxico) pp. 176-185.

Howell, C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts, Vol. 87, n° 1 2003, **EEUU**: *Plant Disease*. pp. 4-10

Iannacone, J. et al. Evaluaciòn del Riego Ambiental del Insecticida Metamidofos en Bioensayos con Cuatro Organismos Acuáticos no Destinatarios, *Scielo*, Vol. 67, (2001), (Chile) pp. 126-138.

Inbar, J. & Chet. I. The role of recognition in the induction of specific chitinases of during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, Vol. 141, (1997), (Universidad de Jerusalem) pp. 2823-2829.

Insider, M. International Trade Center, [en línea]. 2014 [consulta 03-15-2016]. Disponible en: <http://www.intracen.org/itc/blog/market-insider/Ecuadorian-flower-export-to-recover-in-March/> .

Infante, D. Martínez, B. González, N. y Reyes, Y. Mecanismos de acciòn de trichoderma frente a hongos fitopatògenos [en línea], 2014, (La Habana) Vol. 24, n°1 [consultado: 03-15-2016]. ISSN 2224-4697. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>

IRET. Manual de plaguicidas de centroamérica, Clorotalonil. Vol. 1, [en línea] Costa Rica :2014 [consulta: 03-15-2016]. Disponible en:
<http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/152-clorotalonil>

Jastrzębska, E. Comtemporany Problems of Management and Environmental Protection. The Effect of Crop Protection Chemicals, Vol. 5, (2010), (University of Warmia & Mazury in Olsztyn) pp. 43-53.

Márquez, M. Martínez, M. Franco, M. Acctinomycetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum*. f. sp. *Dianthi*. Vol. 19, n°1, (2011), (Agronomía Colombiana) p. 82.

Villegas, M. Trichoderma Pers. Características generales y su potencial biológico en la Agricultura sostenible. [en línea] Chile :2014 [consultado: 03-15-2016]. Disponible en:
<http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0> .

MAINTER. MAKHTESHIMI AGAN. Acarin T. [en línea] Santa cruz: Bolivia, 2011. [Consultado: 03-28-2016]. Disponible en: <http://www.mainter.com.bo/wp-content/uploads/2012/04/Acarin-T.pdf>.

Martínez B. Infante D. Reyes. Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Proteccion Ambiental, Vol. 28, n°1, (2013), (Mayabeque), pp. 6-7.

Márquez, M. Martínez, M. Franco, M. Aislamiento de trichoderma sp. Y actinomycetes a partir de suelos de clavel (*dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagonica in vitro sobre *fusarium oxysporum*. F. Sp. *Dianthi*, [en línea] 2002. (Bogotá) 19 (2), pp. 81-87 [Consultado: 03-28-2016]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/24683/1/21883-74993-1-PB.pdf>.

Mesas, R. Utilización de bacterias endófitas en el desarrollo de plántulas de pimiento, Escuela Politécnica Superior y Facultad de Ciencias Experimentales.[en línea] 2002. [Consulta: 03-28-2016]. Disponible en: <http://repositorio.ual.es:8080/jspui/bitstream/10835/3226/1/Trabajo.pdf.f>.

NEDERAGRO. NEDERAGRO S.A. ACETAMIPRID 20 SP. [en línea] . Guayaquil:2014. [consulta: 02-20-2016]. Disponible en: <http://nederagro.com/images/stories/pdf/Insecticidas/acetamiprid%2020%20sp.pdf>. INF - 01 - VER011007.

Nicholls, I. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico, 1° Edición, Antioquia-Colombia: &Universidad de Antioquia, 2008. pp. 122-125.

NUFARM, CARBENDAZIM 50. [en línea]. 2015, [Consultado: 02-2-2016]. Disponible en: <http://www.nufarm.ec/assets/28213/1/HojaTcnicaCarbendazim50Nufarm.pdf>.

NURFAM. Mancozeb 80% WP. [en línea]. 2010, [Consulta: 03-29-2016.]. Disponible en: http://www.nufarm.com/assets/20867/1/ft_mancozeb.pdf.

Popovski, S. Celar, F. Acta agriculturae Slovenica, Vol. 101, n°03, 2013, Slovenia pp. 105-116.

Prieto, J. et al. Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica, Vol. 39, n°02, (2011), Bogota-Colombia, p. 199.

PROFICOL, Departamento Técnico,PROFICOL,Vitavax 300, [en línea], 2013, (Colombia) [Consulta: 04-2-2016]. Disponible en: http://www.adama.com/colombia/es/Images/FT%20VITAVAX%20300WP_tcm104-58131.pdf.

Puerto, A. Suárez, S. & Palacio, D. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), Vol. 52, n°3, (2014), (La Habana) p. 53.

RAP-AL. Pesticides News. Fipronil. [en línea]. Uruguay, 2004. [Consulta: 02-04-2016]. Disponible en: <http://rapaluruaguay.org/fipronil/Fipronil.html>

Reyes, et al. Compatibilidad de *Trichoderma asperellum samuels* con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz, Vol. 27, n°1, (2012), (La Habana) pp. 45-53

Sanchez, V. Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. de diferentes ecosistemas en la región del Papaloapan. Vol 36 Mexico : s.n., 2011.

Sánchez, J. & Sánchez, M. Los plaguicidas adsorción y evolución en el suelo. Instituto de recursos naturales y agrobiología. [en línea], 2012, (Oxaca-Mexico), (36), pp.17-23. [Consultado: 02-04-2016]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>.

Schuster M, & Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology. [en línea], 2010. (Austria), (87)3, pp. 787–799. [Consulta: 03-28-2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886115/>.

Shayler, H. McBride, M. & Harrison, H. Cornell Waste Management Institute. Sources and Impacts of Contaminants in Soils, [en línea], 2009. (Ithaca–New York, EE.UU) (4)15, pp. 1-6. [Consulta: 04-21-2016]. Disponible en: <http://cwmi.css.cornell.edu>.

Skidmore, M. & Dickinson, C. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi, (1976). pp. 66 - 57.

Stoppacher, N. Kluger, B. Zeilinger, S. & Krsa, R. Identification and Profiling of volatile metabolites of control fungus *Trichoderma atroviride*. [en linea], 2010, (81)2, pp. 187-183. [Consulta:04-05-2016]. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701210000989>

Tobar, J. Evaluación de la capacidad antagónica "in vivo" de aislamiento de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatogénico *Rhizoctonia solani*, [en línea], (Tesis).(Trabajo de Titulación) Pontificia Universidad Javeriana Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá-Colombia. 2008. pp.50- 70. [Consulta:07-05-2016]. Disponible en:

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>

Tucci, M. et al. Molecular Plant Pathology. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is, Vol. 12, n°4, (2011), (Italy) pp. 351-354.

Vaughn, S. Plant volatiles. In: Encyclopedia of Life Sciences, 1° Ed. John Wiley & Sons, (2001)

Villegas, A. *Trichoderma* pers. Características generales y su potencial biológico en la Agricultura Sostenible. OriusBiotecnología. [Consulta: 03-28-2016]. Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/trichoderma-pers-caracteristicas-generales-y-su-potencial-biologico-en-la-agricultura-sostenible>.

Woo, S. Ruocco. et al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture, Bentham Open, Vol. 8, (2014), (Italia), pp, 71-126

ANEXOS

ANEXO A: Datos del Crecimiento de *Fusarium spp.* y *Trichoderma spp.* transformados

Código	Tiempo de Crecimiento Radial F1(F. redolens); F2 (F. Oxysporum)						
	24H	48h	72h	96h	120h	144h	168h
F1R1	0,7745967	1,0954451	1,183216	1,2247449	1,2649111	1,3416408	1,5165751
F1R2	1,0488088	1,2247449	1,4491377	1,5165751	1,6124515	1,6733201	1,7320508
F1R3	0,7745967	1	1,3416408	1,3784049	1,5491933	1,5811388	1,3784049
F1R4	1,0488088	1,0954451	1,4142136	1,5165751	1,6733201	1,7320508	1,8165902
F1R5	0,83666	1,183216	1,2649111	1,3416408	1,3784049	1,5165751	1,7888544
F1R6	1	1,3784049	1,3784049	1,4491377	1,4832397	1,5165751	1,5491933
F1R7	1	1,2649111	1,2649111	1,3416408	1,5165751	1,5491933	1,7029386
F1R8	1	1,2247449	1,2247449	1,2649111	1,3038405	1,3416408	1,4491377
F1R9	1	1,3038405	1,3038405	1,3038405	1,3784049	1,4832397	1,5811388
F1R10	1,0488088	1,2247449	1,2649111	1,3038405	1,4142136	1,5491933	1,5811388
F2R1	0,7745967	1,0488088	1,3038405	1,4491377	1,6124515	1,6733201	1,7606817
F2R2	0,7745967	1,0488088	1,2649111	1,3784049	1,5165751	1,7320508	1,8439089
F2R3	0,83666	1,0488088	1,183216	1,3416408	1,5165751	1,6431677	1,9235384
F2R4	0,7745967	1,0488088	1,2649111	1,4142136	1,6124515	1,6733201	1,8165902
F2R5	0,7745967	1	1,1401754	1,2247449	1,3416408	1,5165751	1,7606817
F2R6	0,7071068	1,0488088	1,2247449	1,3038405	1,4491377	1,5811388	1,8708287
F2R7	0,7745967	1,0488088	1,3784049	1,6431677	1,7606817	1,7888544	1,9235384
F2R8	0,7745967	1,0488088	1,2649111	1,3416408	1,4491377	1,6431677	1,9748418
F2R9	0,7745967	1,0954451	1,3038405	1,3784049	1,4832397	1,6733201	1,9235384
F2R10	0,7745967	1	1,2247449	1,4491377	1,5165751	1,5811388	1,8165902
Crecimiento de Trichoderma							
T1F1R1	0,7745967	1,183216	1,6733201	2,1213203	1,8439089	1,9493589	1,8973666
T1F1R2	0,7745967	1,4142136	2	2,0976177	2,0976177	2,1679483	2,0976177
T1F1R3	1	1,3038405	1,3416408	2,236068	2,236068	2,1447611	2,1447611

T1F1R4	1	1,3416408	1,7029386	1,9748418	2,1447611	0,7071068	0,7071068
T1F1R5	1	1,1401754	1,5165751	1,7320508	2,0976177	2,1213203	2,1908902
T1F1R6	0,83666	1,1401754	1,4142136	1,8973666	2,2135944	1,6733201	2
T1F1R7	0,7745967	1,2649111	1,6124515	1,8973666	2,0976177	2,1679483	2,1447611
T1F1R8	0,7745967	1,2247449	1,5491933	1,7888544	2,0736441	2,1213203	2,236068
T1F1R9	0,7745967	1,2649111	1,5811388	1,9235384	2,0976177	2,1908902	2,2135944
T1F1R10	0,9486833	1,4491377	1,7320508	2,0736441	1,9493589	2	2,1447611
T1F1R11	0,7745967	1,4142136	1,7606817	2,1447611	2,1908902	2,236068	2,4494897
T1F1R12	0,7745967	1,2247449	1,8165902	1,9493589	2,1908902	2,1908902	2,2135944
T1F1R13	0,83666	1,3038405	1,7320508	1,8165902	2,1447611	2,0493902	2,2135944
T1F1R14	0,7745967	1	1,4142136	1,8708287	2,2803509	2,2803509	2,1213203
T1F1R15	1,0954451	1,2649111	1,7320508	1,7320508	2	2,236068	2,236068
T1F1R16	0,7745967	1,3038405	1,7320508	2,0248457	2,236068	2,2803509	2,236068
T1F1R17	1	1,3038405	1,6733201	1,9748418	2,236068	2,1908902	2,236068
T1F1R18	0,7745967	1,2649111	1,7029386	1,9235384	2,1447611	2,1679483	2,0976177

ANEXO B: Datos de la velocidad de *Trichoderma spp.* sobre agroquímicos

Tiempo	Velocidad crecimiento en días ()						
	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H
Código							
T1P1R1	0,74	0,73	0,73	0,72	0,72	0,79	0,72
T1P1R2	0,75	0,73	0,73	0,72	0,72	0,79	0,72
T1P1R3	0,75	0,74	0,73	0,72	0,73	0,82	0,72
T1P2R1	0,81	0,76	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P2R2	0,81	0,76	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P2R3	0,81	0,77	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P3R1	0,81	0,76	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P3R2	0,81	0,77	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P3R3	0,81	0,76	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P4R1	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,79	0,72
T1P4R2	0,73	0,72	0,72	0,72	0,72	0,79	0,72
T1P4R3	0,73	0,72	0,72	0,73	0,72	0,79	0,72
T1P5R1	0,74	0,73	0,72	0,72	0,73	0,81	0,72
T1P5R2	0,74	0,73	0,73	0,72	0,73	0,81	0,72
T1P5R3	0,74	0,73	0,72	0,73	0,73	0,80	0,72
T1P6R1	0,78	0,76	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P6R2	0,78	0,76	0,74	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P6R3	0,80	0,76	0,75	0,74	0,73	0,82	0,72
T1P7R1	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
T1P7R2	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
T1P7R3	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
T1P8R1	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
T1P8R2	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
T1P8R3	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
T1P9R1	0,72	0,73	0,73	0,73	0,73	0,82	0,72
T1P9R2	0,74	0,73	0,73	0,73	0,73	0,82	0,72
T1P9R3	0,74	0,73	0,73	0,73	0,73	0,82	0,72
T1P10R1	0,72	0,71	0,73	0,72	0,73	0,80	0,72
T1P10R2	0,72	0,71	0,72	0,73	0,73	0,81	0,72
T1P10R3	0,72	0,72	0,72	0,73	0,73	0,81	0,72
T1P11R1	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71	0,74	0,71
T1P11R2	0,72	0,72	0,71	0,71	0,71	0,74	0,71
T1P11R3	0,72	0,71	0,71	0,71	0,71	0,74	0,71

ANEXO C: Datos de velocidad de crecimiento de *Fusarium spp.* sobre fungicidas

Código	Velocidad de Crecimiento						
	Tiempo						
	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H
P1F1R1	0,722	0,716	0,714	0,714	0,713	0,713	0,713
P1F1R2	0,716	0,714	0,715	0,714	0,714	0,714	0,713
P1F1R3	0,719	0,714	0,714	0,714	0,714	0,713	0,712
P2F1R1	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707
P2F1R2	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707
P2F1R3	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707
P3F1R1	0,727	0,716	0,718	0,721	0,723	0,722	0,720
P3F1R2	0,733	0,714	0,716	0,718	0,718	0,717	0,719
P3F1R3	0,719	0,720	0,719	0,719	0,719	0,719	0,720
P4F1R1	0,707	0,707	0,708	0,709	0,710	0,710	0,710
P4F1R2	0,710	0,710	0,710	0,712	0,712	0,712	0,712
P4F1R3	0,713	0,713	0,711	0,712	0,711	0,711	0,711
P5F1R1	0,722	0,716	0,714	0,714	0,714	0,714	0,715
P5F1R2	0,725	0,717	0,791	0,715	0,716	0,716	0,715
P5F1R3	0,725	0,716	0,715	0,715	0,715	0,715	0,714
P1F2R1	0,727	0,720	0,718	0,716	0,715	0,715	0,715
P1F2R2	0,733	0,720	0,717	0,717	0,715	0,715	0,714
P1F2R3	0,733	0,720	0,717	0,717	0,716	0,716	0,713
P2F2R1	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707
P2F2R2	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707
P2F2R3	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707	0,707
P3F2R1	0,730	0,723	0,723	0,723	0,724	0,723	0,720
P3F2R2	0,730	0,720	0,721	0,721	0,721	0,720	0,723
P3F2R3	0,730	0,722	0,721	0,721	0,719	0,720	0,720
P4F2R1	0,716	0,713	0,711	0,711	0,710	0,710	0,710
P4F2R2	0,713	0,710	0,710	0,710	0,710	0,710	0,710
P4F2R3	0,713	0,710	0,710	0,710	0,710	0,711	0,710
P5F2R1	0,725	0,717	0,715	0,714	0,714	0,713	0,716
P5F2R2	0,719	0,716	0,716	0,716	0,716	0,716	0,715
P5F2R3	0,722	0,717	0,716	0,715	0,715	0,715	0,715