



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA INGENIERÍA FORESTAL**

**SENSIBILIDAD DE SEIS ESPECIES DE *Trichoderma* AISLADAS  
DE SUELOS AGROFORESTALES DE SANTA CRUZ, ISLAS  
GALAPAGOS A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE  
ACCIÓN**

**Trabajo de Integración Curricular**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERO FORESTAL**

**AUTOR:**

**JOSÉ EDUARDO PAREDES ESPÍN**

Riobamba – Ecuador

2022



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA INGENIERÍA FORESTAL**

**SENSIBILIDAD DE SEIS ESPECIES DE *Trichoderma* AISLADAS  
DE SUELOS AGROFORESTALES DE SANTA CRUZ, ISLAS  
GALAPAGOS A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE  
ACCIÓN**

**Trabajo de Integración Curricular**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERO FORESTAL**

**AUTOR:** JOSÉ EDUARDO PAREDES ESPÍN

**DIRECTOR:** Ing. DANIEL ARTURO ROMÁN ROBALINO, MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

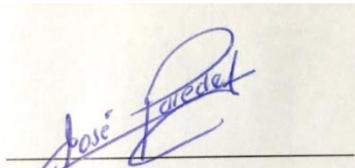
**© 2022, José Eduardo Paredes Espín**

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

Yo, **JOSÉ EDUARDO PAREDES ESPÍN**, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 01 de diciembre de 2022.

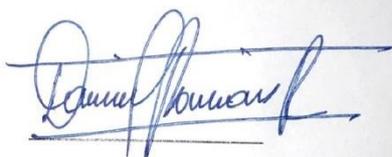
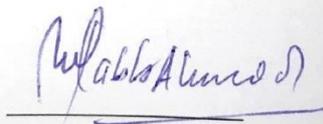


**José Eduardo Paredes Espín**

**1804938718**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA INGENIERÍA FORESTAL**

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación: **SENSIBILIDAD DE SEIS ESPECIES DE *Trichoderma* AISLADAS DE SUELOS AGROFORESTALES DE SANTA CRUZ, ISLAS GALAPAGOS A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN**, realizado por el señor: **JOSÉ EDUARDO PAREDES ESPÍN**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Miguel Angel Guallpa Calva, MSc. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2022/12/01
Ing. Daniel Arturo Román Robalino, MSc. <b>DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2022/12/01
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero, PhD. <b>ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2022/12/01

## **DEDICATORIA**

A Dios quien ha sido mi guía y fortaleza que con su mano de fidelidad y amor han estado conmigo hasta el día de hoy. A mis padres José Luis y Piedad Sofía quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de sacrificio y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre, a mis hermanas Sofía, Leslie y Dayana por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas

Eduardo

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi alma, a mis padres y hermanas pilar fundamental en mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que hacen el Departamento de Sanidad Vegetal, por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de laboratorio.

De igual manera mis agradecimientos a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Escuela de Ingeniería Forestal, a mis profesores en especial al Dr. Pablo Álvarez y al Ing. Daniel Román quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada una de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Ing. Juan Guerra, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Eduardo

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
SUMMARY .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	1

### CAPITULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
1.1.	Planteamiento del problema .....	2
1.2.	Objetivos .....	2
1.2.1.	<i>Objetivo general</i> .....	2
1.2.2.	<i>Objetivos específicos</i> .....	2
1.3.	Justificación .....	2
1.4.	Hipótesis .....	3
1.4.1.	<i>Hipótesis nula</i> .....	3
1.4.2.	<i>Hipótesis alterna</i> .....	3

### CAPITULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1.	Antecedentes de la investigación .....	4
2.2.	Referencias teóricas .....	5
2.2.1.	<i>Trichoderma</i> .....	5
2.2.1.1.	<i>Taxonomía de Trichoderma sp.</i> .....	5
2.2.2.	<i>Biología</i> .....	6
2.2.3.	<i>Mecanismos de biocontrol</i> .....	6
2.2.4.	<i>Micoparasitismo</i> .....	7
2.2.5.	<i>Antibiosis</i> .....	7
2.2.6.	<i>Competencia</i> .....	8
2.2.7.	<i>Promotor del desarrollo vegetativo</i> .....	8
2.2.8.	<i>Estimulador de los mecanismos de defensa de las plantas</i> .....	9

2.2.9.	<i>Biorremediador de suelos</i> .....	9
2.2.10.	<i>Fungicidas</i> .....	9
2.2.10.1.	<i>Fungicidas protectantes</i> .....	9
2.2.10.2.	<i>Fungicidas sistémicos</i> .....	10
2.2.11.	<i>Descripción de los fungicidas utilizados en el presente estudio investigativo</i> .....	10
2.2.11.1.	<i>Tebuconazol</i> .....	10
2.2.11.2.	<i>Azoxystrobin</i> .....	11
2.2.11.3.	<i>Metil-Tiofanato</i> .....	11
2.2.11.4.	<i>Boscalid</i> .....	11
2.2.11.5.	<i>Sales de cobre</i> .....	12
2.2.11.6.	<i>Cyprodinil</i> .....	12
2.2.12.	<i>Clasificación de fungicidas de acuerdo con los modos de acción según la FRAC</i> ....	13
2.2.13.	<i>Sensibilidad y resistencia a fungicidas</i> .....	15
2.2.14.	<i>Métodos in vitro para estudiar sensibilidad de fungicidas</i> .....	15
2.2.14.1.	<i>Crecimiento micelial</i> .....	15
2.2.14.2.	<i>Dosis letal 50 (DL50)</i> .....	15

### CAPITULO III

3.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	16
3.1.	<b>Enfoque de investigación</b> .....	16
3.2.	<b>Nivel de Investigación</b> .....	16
3.3.	<b>Diseño de investigación</b> .....	16
3.3.1.	<i>Según la manipulación o no de la variable independiente</i> .....	16
3.3.2.	<i>Según las intervenciones en el trabajo de campo</i> .....	16
3.4.	<b>Tipo de estudio</b> .....	17
3.5.	<b>Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra</b> .....	17
3.6.	<b>Características del lugar</b> .....	17
3.6.1.	<i>Localización del sitio</i> .....	17
3.7.	<b>Métodos, técnicas e instrumentos de investigación</b> .....	18
3.7.1.	<i>Materiales y equipos</i> .....	18
3.7.1.1.	<i>De escritorio</i> .....	18
3.7.1.2.	<i>De Laboratorio</i> .....	18
3.7.2.	<i>Metodología</i> .....	19
3.7.2.1.	<i>Preparación del medio de cultivo</i> .....	19

3.7.2.2.	<i>Cálculos para determinar las concentraciones de los fungicidas</i> .....	19
3.7.2.3.	<i>Aislados de Trichoderma</i> .....	21
3.7.2.4.	<i>Preparación de la solución Stock</i> .....	21
3.7.2.5.	<i>Ensayo de crecimiento micelial</i> .....	22
3.7.2.6.	<i>Tasa de crecimiento micelial</i> .....	22
3.7.2.7.	<i>Estimación de dosis letal (DL<sub>50</sub>)</i> .....	22
3.7.2.8.	<i>Porcentaje de inhibición</i> .....	23
3.7.2.9.	<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i> .....	23
3.7.2.10.	<i>Rango de sensibilidad</i> .....	23
3.7.2.11.	<i>Recolección de datos</i> .....	23

#### CAPITULO IV

4.	<b>MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	24
4.1.	<b>Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Azoxystrobin</b> .....	24
4.1.1.	<i>Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de Azoxystrobin para los diferentes aislados de Trichoderma</i> .. .....	25
4.2.	<b>Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol</b> .....	27
4.2.1.	<i>Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de Tebuconazol para los diferentes aislados de Trichoderma</i> .. .....	28
4.3.	<b>Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiofanato</b> .....	30
4.3.1.	<i>Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de Tiofanato para los diferentes aislados de Trichoderma</i> ..... .....	31
4.4.	<b>Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Boscalid</b> .....	33
4.4.1.	<i>Dosis letal (DL<sub>50</sub>) de Boscalid para los diferentes aislados de Trichoderma</i> .....	34
4.5.	<b>Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Sales de Cobre</b> .....	36
4.5.1.	<i>Dosis letal (DL<sub>50</sub>) de Sales de cobre para los diferentes aislados de Trichoderma</i> ..... .....	37
4.6.	<b>Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Cyprodinil</b> .....	39
4.6.1.	<i>Dosis letal (DL<sub>50</sub>) de Cyprodinil para los diferentes aislados de Trichoderma</i> .....	40

<b>4.7.</b>	<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>42</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
	<b>GLOSARIO</b>	
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b>	Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> sp. ....	6
<b>Tabla 2-2:</b>	Fungicidas utilizados en la investigación .....	12
<b>Tabla 3-2:</b>	Clasificación de fungicidas según el modo de acción según la FRAC .....	13
<b>Tabla 1-3:</b>	Listado de ingredientes activos y nombres comerciales que fueron utilizados ....	19
<b>Tabla 2-3:</b>	Rangos de sensibilidad.....	23
<b>Tabla 1-4:</b>	Análisis de varianza para la DL50 de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> enmendado con Azoxystrobin.....	25
<b>Tabla 2-4:</b>	Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> con diferentes dosis de Azoxystrobin.....	26
<b>Tabla 3-4:</b>	Análisis de varianza para la DL50 de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> enmendado con Tebuconazol.....	28
<b>Tabla 4-4:</b>	Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> con diferentes dosis de Tebuconazol.....	29
<b>Tabla 5-4:</b>	Análisis de varianza para la DL50 de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> enmendado con Tiofanato.....	31
<b>Tabla 6-4:</b>	Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> con diferentes dosis de Tiofanato.....	32
<b>Tabla 7-4:</b>	Análisis de varianza para la DL50 de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> enmendado con Boscalid .....	34
<b>Tabla 8-4:</b>	Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> con diferentes dosis de Boscalid .....	35
<b>Tabla 9-4:</b>	Análisis de varianza para la DL50 de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> enmendado con Sales de Cobre.....	37
<b>Tabla 10-4:</b>	Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> con diferentes dosis de Sales de Cobre .....	38
<b>Tabla 11-4:</b>	Análisis de varianza para la DL50 de diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> enmendado con Cyprodinil .....	40
<b>Tabla 12-4:</b>	Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> con diferentes dosis de Cyprodinil.....	41
<b>Tabla 13-4:</b>	Resumen de los resultados obtenidos.....	41

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1-3:</b>	Ubicación geográfica del laboratorio de fitopatología .....	17
<b>Ilustración 1-4:</b>	TCM de seis aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con Azoxystrobin en diferentes dosis .....	24
<b>Ilustración 2-4:</b>	DL50 de Azoxystrobin para seis aislados de <i>Trichoderma</i> .....	25
<b>Ilustración 3-4:</b>	TCM de seis aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con Azoxystrobin en diferentes dosis .....	27
<b>Ilustración 4-4:</b>	DL50 de Tebuconazol para seis aislados de <i>Trichoderma</i> .....	28
<b>Ilustración 5-4:</b>	TCM de seis aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con Tiofanato en diferentes dosis .....	30
<b>Ilustración 6-4:</b>	DL50 de Tiofanato para seis aislados de <i>Trichoderma</i> .....	31
<b>Ilustración 7-4:</b>	TCM de seis aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con Boscalid en diferentes dosis .....	33
<b>Ilustración 8-4:</b>	DL50 de Boscalid para seis aislados de <i>Trichoderma</i> .....	34
<b>Ilustración 9-4:</b>	TCM de seis aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con Sales de Cobre en diferentes dosis .....	36
<b>Ilustración 10-4:</b>	DL50 de Sales de Cobre para seis aislados de <i>Trichoderma</i> .....	37
<b>Ilustración 11-4:</b>	TCM de seis aislados de <i>Trichoderma</i> en medio PDA enmendado con Cyprodinil en diferentes dosis .....	39
<b>Ilustración 12-4:</b>	DL50 de Cyprodinil para seis aislados de <i>Trichoderma</i> .....	40

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA CON FUNGICIDAS EN SUS RESPECTIVAS DOSIS
- ANEXO B:** SIEMBRA DE LOS DISCOS DE MICELIO CON AISLADOS DE *Trichoderma* EN LAS CAJAS PETRI ENMENDADO CON FUNGICIDAS
- ANEXO C:** RECOLECCIÓN DE DATOS
- ANEXO D:** CRECIMIENTO DE LOS 6 AISLADOS DE *Trichoderma* CON EL PRINCIPIO ACTIVO AZOXYSTROBIN

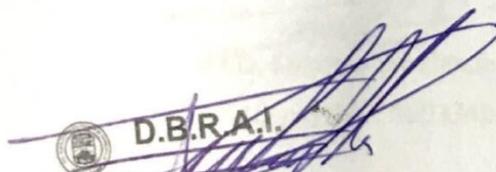
## RESUMEN

El presente estudio radicó en determinar la sensibilidad de seis especies de *Trichoderma* aisladas de suelos agroforestales de Santa Cruz, islas Galápagos a fungicidas de diferente modo de acción. La metodología consistió en un diseño completamente al azar de seis aislados por cinco dosis de seis fungicidas con tres repeticiones; para esto, se usaron los aislados de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma breve*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma resei* y *Trichoderma andinense* en medio de cultivo agar papa dextrosa, con los complejos activos de sulfato de cobre, tebuconazol, azoxystrobin, metil tiofanato, cyprodinil y boscalid, en dosis de 0,1, 1, 10, 100 y 500 partes por millón. Los datos del crecimiento micelial de los aislados de *Trichoderma* se recogieron cada 24 horas, en milímetros en los ejes ecuatorial y polar; con estos, se calculó la tasa de crecimiento micelial, luego se procedió a la estimación de dosis letal, el porcentaje de inhibición y se determinó el rango de sensibilidad en las categorías sensibles, levemente resistente, moderadamente resistente y resistente, mediante una escala de sensibilidad. Los datos se analizaron con el programa R mediante análisis exploratorio con diagramas de caja y bigotes, mediciones de resumen y prueba de Tukey para la separación de medias. La tasa de crecimiento micelial mostró diferencias evidentes entre los principios activos, la especie que mostró una alta resistencia y mayor crecimiento ante los diferentes principios activos fue *Trichoderma resei* siendo compatible con los productos de diferente modo de acción fúngicos investigados, seguido de *Trichoderma harzianum* que mostró un comportamiento similar ante la combinación química-biológica. Los aislados mencionados darán mejores resultados en el manejo integral de enfermedades, se recomienda evaluar el estudio a nivel de vivero para corroborar los resultados.

**Palabras clave:** <AISLADOS DE *Trichoderma*>, <DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>)>, <FUNGICIDA>, <HONGO BENÉFICO>, <TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL (TCM)>, <PARTES POR MILLÓN (PPM)>.



2395-DBRA-UPT-2022

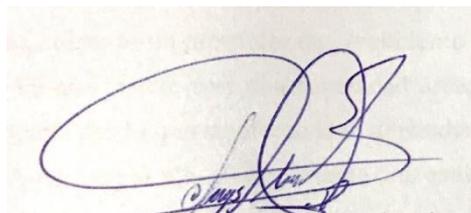
  
D.B.R.A.I.  
Ing. Cristian Castillo

## SUMMARY

The study aimed to determine the sensitivity of six *Trichoderma* species isolated Islands to fungicides with different modes of action from agroforestry soils of Santa Cruz, Galapagos. The methodology consisted of a completely randomized design of six isolates for five doses of six fungicides with three repetitions by using the isolates of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma breve*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma resei* and *Trichoderma andinense*. They were used in potato dextrose agar culture medium, with the active complexes of copper sulfate, tebuconazole, azoxystrobin, methyl thiophanate, cyprodinil and boscalid, in doses of 0.1, 1, 10, 100, and 500 parts per million. The data on the mycelial growth of the *Trichoderma* isolates were collected every 24 hours, in millimeters in the equatorial and polar axes. The mycelial growth rate was calculated, then the lethal dose was estimated, the inhibition percentage and the range of sensitivity was determined in the sensitive, slightly resistant, moderately resistant, and resistant categories, using a sensitivity scale. Data were analyzed with the R program using exploratory analysis with box-and-whisker plots, summary measurements, and Tukey's test for separation of means. The mycelial growth rate showed evident differences between the active principles, the species that showed a high resistance and higher growth before the different active principles was *Trichoderma resei*, being compatible with the products of different fungal modes of action investigated, followed by *Trichoderma harzianum* that showed a similar behavior before the chemical-biological combination. The isolates will give better results in the comprehensive management of diseases. It is recommended to evaluate the study at the nursery level to corroborate the results.

**Keywords:** <ISOLATES OF *Trichoderma*>, <LETHAL DOSE 50 (LD50)>, <FUNGICIDE>, <BENEFICIAL FUNGUS>, <MYCELIAL GROWTH RATE (MCT)>, <PARTS PER MILLION (PPM)>.

Riobamba, December 15<sup>th</sup>, 2022



PhD. Dennys Tenefanda López

ID number: 0603342189

## INTRODUCCIÓN

El creciente uso de agroquímicos ha dado paso al interés en el control biológico de patógenos de plantas puesto que muchos de los químicos afectan a la inocuidad de alimentos, recursos naturales, el ambiente y la biodiversidad (Chiriboga, 2015, p. 2). Por ello, muchas investigaciones se han visto fortalecidas dando interés al estudio de agentes controladores de plagas, algunos basados en el género *Trichoderma*, debido a que estos organismos poseen habilidades micoparásitas, lo cual le da la capacidad de tomar nutrientes de hongos patógenos, parasitar o atacar a otros organismos (Mesa et al., 2019, pp. 32-44).

Es importante indicar que las especies de *Trichoderma* presentan un requerimiento nutricional bastante bajo lo cual le ha permitido predominar en múltiples ecosistemas terrestres, e incluso presenta un amplio rango de temperatura. Por otra parte, diferentes especies del género en mención se asocian con la rizosfera de las plantas lo que promueve el crecimiento y desarrollo (Hernández et al., 2019, pp. 98-112).

El género en mención presenta un amplio espectro de aplicación sobre bacterias, insectos y parásitos, entre los beneficios de su aplicación se tiene su amplio rango de acción, descompone la materia orgánica, favorece a la proliferación de organismos que son benéficos para el suelo y lo más importante es que ayuda a la preservación del ambiente mediante la disminución del uso de fungicidas (Chiriboga et al., 2015, p. 20).

Como se ha mencionado, *Trichoderma* es un agente de biocontrol, pero algo que indicar es que, según Monte y Llobell (2003, pp. 725-733), aplicar este género en un sustrato sin patógenos tiende a promover el crecimiento de las plantas, aumenta la producción de frutas y a su vez algo importante es la reducción de los diferentes tratamientos químicos.

*Trichoderma* es un género utilizado como una alternativa sostenible para procesos de control de enfermedades en plantas, aparte es un promotor de crecimiento en los cultivos (Sánchez et al., 2021, pp. 26-42), pero a pesar de que cuente con una capacidad antagónica ante otros organismos, el mismo es altamente variable por lo que su efectividad dependerá de la especificidad de la cepa y los modos de acción que posea, por ello es importante una evaluación del patógeno *in vitro* y en planta, una caracterización taxonómica de aislados; esto permitirá que se puedan establecer los requerimientos para su crecimiento y criterios para ser seleccionado como agente de biocontrol (García et al., 2017, pp. 58-79).

## CAPITULO I

### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Planteamiento del problema

La especie *Trichoderma* sp. posee múltiples beneficios como controlador microbiano, pero su potencial dependerá de factores externos, como la sensibilidad, mismo factor que llega a incidir en el desempeño de la especie fúngica debido a los rangos de compatibilidad con fungicidas de diferentes modos de acción (González y Pineda, 2020, p. 96).

#### 1.2. Objetivos

##### 1.2.1. Objetivo general

Analizar la sensibilidad de seis especies de *Trichoderma* aislados de suelos agroforestales de Santa Cruz, islas Galápagos a fungicidas de diferente modo de acción.

##### 1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la tasa de crecimiento micelial de 6 especies de *Trichoderma* en medios de cultivo enmendados con fungicidas de diferentes modos de acción.
- Calcular la dosis letal 50 de fungicidas de diferente modo de acción a 6 especies de *Trichoderma*.

#### 1.3. Justificación

El presente estudio propone analizar la sensibilidad de seis especies de *Trichoderma* obtenidos de suelos agroforestales de Santa Cruz, Islas Galápagos a fungicidas de diferente modo de acción. Tomando en cuenta la importancia del hongo *Trichoderma*, el estudio se presenta como una alternativa para validar diferentes productos que, en conjunto con el mismo, permitirán un manejo integrado de enfermedades.

Se considera, que ante la ausencia de estudios sobre sensibilidad entre las especies de *Trichoderma* y fungicidas, el trabajo estará enfocado en proponer información idónea para un

control de enfermedades más efectivo, así mismo proporcionar información sobre el nivel de resistencia que presentan a los fungicidas.

#### **1.4. Hipótesis**

##### ***1.4.1. Hipótesis nula***

Ninguno de los fungicidas de diferente modo de acción y dosis planteadas presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

##### ***1.4.2. Hipótesis alterna***

Al menos uno de los fungicidas de diferente modo de acción y una de las dosis presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

Masaquiza (2019, pp. 1-41), realizó un estudio denominado “Caracterización morfológica y molecular de hongos asociados a la rizosfera de plantas de café en la isla Santa Cruz–Galápagos”, donde evidenció la predominancia del género *Trichoderma* en 23 de los 27 aislados, con 4 clados diferentes: clado *viride*; clado *pachybasium A/hamatum*; clado *virens* y clado *harzianum*. El autor destaca la importancia del género *Trichoderma* de las islas Galápagos debido a su aislamiento geográfico que impide el intercambio de material biológico entre el Ecuador continental y las islas.

En la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se ha desarrollado el “Estudio de *Trichoderma* spp. en viveros forestales de la provincia de Chimborazo y suelos agrícolas en Santa Cruz, Islas Galápagos”, mediante el análisis de muestras de alrededor de 25 sitios en la provincia de Chimborazo y siete sitios en Santa Cruz, lo que permitió aislar alrededor de 40 cepas en el continente y 20 procedentes del archipiélago. El propósito final de este proyecto es determinar la eficiencia del *Trichoderma* spp., a nivel de laboratorio y campo, para promover su utilización en las actividades que realizan productores, viveristas y personas vinculadas a la agronomía (DC.ESPOCH, 2022, párr. 1-4).

Dentro del estudio mencionado en el anterior párrafo se encuentra el Trabajo de Integración Curricular realizado por Arce (2022, pp. 1-61), titulado “Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos agrícolas de Galápagos a diferentes hongos patógenos”, en el que se presentan niveles favorables de antagonismo de *Trichoderma* frente a hongos patógenos como *Fusarium circinatum*, *Neoscitalidyum* spp. y *Alternaria linariae*. Este y otros estudios recientes realizados por egresados de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo muestran el potencial uso de hongos benéficos de la localidad en la industria de control de enfermedades de plantas, resaltando la importancia de ser amigables con el ambiente.

## 2.2. Referencias teóricas

### 2.2.1. *Trichoderma*

*Trichoderma* es a menudo predominante de la microflora en suelos nativos y también en suelos agrícolas siendo así una de las especies que son ampliamente utilizadas en la agricultura e industrias, cabe mencionar que las especies de este hongo se han adaptado a casi todos los ecosistemas situándose en sitios marinos y terrestres (Mukherjee et al., 2013, pp. 105-129).

Mukherjee et al. (2012, pp. 105-129), menciona que los hongos de *Trichoderma* llegan a colonizar órganos de plantas desde la parte aérea y por debajo del suelo; teniendo su aparición en la hojarasca, materia orgánica presente en el suelo y en tejidos de mamíferos.

Infante et al. (2009, pp. 14-21), menciona que las especies del hongo *Trichoderma* al ser saprófitos tienen una tolerancia y resistencia ecológica, siendo parte también de los hongos antagonistas mismos que son empleados para el control biológico. También, estos hongos poseen la capacidad de detectar, invadir y destruir a otros hongos lo cual ha sido su principal fuerte para su éxito comercial como un biopesticida (Mukherjee et al., 2012, pp. 105-129).

Chiriboga et al. (2015, p. 13), menciona que *Trichoderma* posee ventajas diversas como agente de control biológico debido a su rápido crecimiento y desarrollo, a su capacidad de desarrollarse en una gran variedad de sustratos lo que permite que sea de fácil producción enfocado para el uso agrícola, un dato importante a tomar en cuenta es su tolerancia a condiciones ambientales extremas, así como su capacidad de sobrevivir en medios donde haya contenidos significativos de agrodefensivos y otros químicos.

*Trichoderma* es un microorganismo benéfico de uso amigable, siendo una alternativa sana y limpia para lidiar con patógenos que afectan a las plantas, además este género llega a comprender hongos productores de metabolitos secundarios que poseen una importancia clínica (Chiriboga et al., 2015, p. 18).

#### 2.2.1.1. *Taxonomía de Trichoderma sp.*

La presente tabla muestra la taxonomía de *Trichoderma sp.*, obtenido del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2020, párr. 1):

**Tabla 1-2:** Clasificación taxonómica de *Trichoderma* sp.

<b>Reino</b>	Fungi
<b>Phyllum</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Orden</b>	Hypocreales
<b>Familia</b>	Hypocreaceae
<b>Género</b>	<i>Trichoderma</i>

Fuente: NCBI, 2020

Realizado por: Paredes José, 2022

### **2.2.2. Biología**

Lorito (2006; citado en Mesa et al., 2019, pp. 34), menciona que los hongos filamentosos perteneciente al género *Trichoderma* son cosmopíltas tanto en el suelo y madera en descomposición, mostrando una variable forma de vida e interacciones con diferentes hongos, plantas o animales.

Según Camargo (2005; citado en Tovar, 2008, p. 18), menciona que *Trichoderma* sp. es un organismo natural del suelo, teniendo la característica de un comportamiento saprófito o parásito, a su vez se consideran colonizadores secundarios por la frecuencia en su aislamiento a partir de materia orgánica en estado de descomposición.

Las especies de *Trichoderma* se encuentran ampliamente distribuidas, existiendo desde zonas polares hasta la ecuatorial, debido a esta amplia distribución y su plasticidad ecológica ha dado como resultado su capacidad enzimática, permitiéndoles degradar sustancias, poseer un metabolismo versátil y una resistencia a los inhibidores microbianos (Infante et al., 2009, pp. 14-21).

De manera morfológica, *Trichoderma* está caracterizada por la presencia de conidióforos ramificados a manera de un pequeño árbol, con penachos compactados en forma de anillo. Posee Clamidiosporas intercalares, terminales y propágulos de tres tipos: hifas, clamidiosporas y conidios. También posee un método de resistencia, en la que los hongos poseen la capacidad de producir clamidiosporas, mismas que producen zonas terminales del micelio, como zonas medias o intercalados (Mesa et al., 2019, p. 34).

### **2.2.3. Mecanismos de biocontrol**

*Trichoderma* ha sido descrita con diferentes mecanismos de acción, siendo 3 los que se involucran en la biorregulación de organismos patógenos, los principales son: micoparasitismo, antibiosos y

competencia; también se puede mencionar otros mecanismos como: promotor del desarrollo vegetativo, estimulador de los mecanismos de defensa de las plantas, facilitador de la solubilización y absorción de nutrientes y biorremediador de suelos (Castro y Rivillas, 2012, pp. 7-14).

#### **2.2.4. Micoparasitismo**

Mecanismo de acción de gran importancia, debido a que su proceso involucra la producción de enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, laminarinasas, proteasas, celulasas, esterases, xylanases, glucosidades y lipasas) (Castro y Rivillas, 2012, pp. 7-8).

Este proceso se lo puede separar en cuatro etapas debido a que hay aspectos que no están completamente esclarecidos, por ello cada etapa dependerá de los hongos involucrados, condiciones ambientales, necrotrofismo del antagonista y la acción biotrófica (Infante et al., 2009, pp. 14-21):

- **Crecimiento quimiotrófico:** Es el crecimiento de las hifas del hongo *Trichoderma* en dirección al patógeno debido a una respuesta o estímulo químico.
- **Reconocimiento:** El reconocimiento se da a través de una interacción de lectinas-carbohidratos, y gracias a varios estudios realizados han mostrado que las cepas de *Trichoderma* son efectivas solamente contra patógenos específicos. Cabe mencionar que en varios casos se encontró evidencias de que las lectinas se involucran en el micoparasitismo.
- **Adhesión y enrollamiento:** Al efectuarse el reconocimiento del patógeno por parte de las cepas de *Trichoderma* las hifas se adhieren a las del hospedante mediante una estructura de similitud a los ganchos o apresorios.
- **Actividad lítica:** El proceso inicia con la producción de enzimas líticas extracelulares que llegan a degradar paredes celulares del hospedante lo que facilita la penetración de las hifas del antagonista, mediante este proceso absorbe nutrientes del interior del hongo fitopatógeno. El micoparasitismo finaliza con la pérdida del contenido citoplasmático produciendo síntomas de disgregación con lo cual se disminuye la efectividad del patógeno.

#### **2.2.5. Antibiosis**

Es la actividad antibiotica referida a compuestos no volátiles mismos que juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos (Castro y Rivillas, 2012, p. 9).

Por otro lado, la antibiosis llega a ocurrir al momento de la interacción entre antibióticos producidos por las cepas de *Trichoderma*, además la producción de metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles impiden que se produzca la colonización por parte de microorganismos antagónicos. (Tovar, 2008, p. 21).

Infante et al. (2009, pp. 14-21), mencionan que la antibiosis no debe ser vista como el principal mecanismo de acción como antagonista, debido a que se puede dar la aparición de patógenos resistentes.

### **2.2.6. Competencia**

Es la competencia por el espacio o los nutrientes, siendo este el mecanismo clásico de biocontrol de *Trichoderma*; aparte posee la capacidad de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo (Castro y Rivillas, 2012, p. 9).

Algo importante a señalar es que la presencia natural de *Trichoderma* en diferentes suelos, denominado plasticidad ecológica, permite comprender su habilidad de competidor de nutrientes, de esta manera se entiende que esta especie está biológicamente adaptada a una colonización agresiva de sustratos y condiciones adversas (Infante et al., 2009, pp. 14-21).

### **2.2.7. Promotor del desarrollo vegetativo**

La existencia de *Trichoderma* en raíces colonizadas por el mismo generan un aumento en su crecimiento, desarrollo, resistencia al estrés abiótico, a la productividad del cultivo y a la toma y uso de nutrientes; tal es el caso que la productividad de un cultivo puede aumentar en más de 300% (Castro y Rivillas, 2012, p. 11).

Existen diferentes especies del género *Trichoderma* que producen factores de crecimiento mismos que han sido detectados en laboratorio, siendo estas auxinas, citoquininas y etileno, que aparte posee la característica de acidificar el entorno donde se encuentre (Castro y Rivillas, 2012, p. 12).

Castro y Rivillas (2012, p. 12), mencionan a *Trichoderma harzianum* como un promotor en el crecimiento y desarrollo en hortalizas y flores, el ejemplo claro es que *T. harzianum* ayudo a incrementar en un 30% el proceso de germinación de semillas de pepino, dando como resultado un 95% de incremento en el área radicales, un 45% en la altura y un 80% de área foliar.

### **2.2.8. Estimulador de los mecanismos de defensa de las plantas**

La habilidad que *Trichoderma* posee para proteger a las plantas contra patógenos que atacan a las raíces es gracias al antagonismo que se produce, pero la relación entre hongo-raíz permite que se estimule los mecanismos de defensa de las plantas, por ello se induce a una resistencia igual a la resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida “RSI” (Castro y Rivillas, 2012, p. 12).

### **2.2.9. Biorremediador de suelos**

Una de las habilidades que posee *Trichoderma* es la de degradar compuestos organoclorados, endosulfán, cloro fenoles y glifosato; a su vez el hongo posee enzimas que le permiten degradar la materia vegetal y enzimas especializadas en simplificar moléculas complejas como pesticidas, de la misma manera produce enzimas rodanasa y cianuro hidratasa las cuales son capaces de degradar el cianuro con lo cual permite un desarrollo normal de las plantas (Castro y Rivillas, 2012, pp. 14-15).

### **2.2.10. Fungicidas**

Los fungicidas son productos químicos que se utilizan para la eliminar o prevenir el desarrollo de hongos y como todo producto químico debe ser utilizado con precaución para evitar daños a tanto al ambiente como a la salud (Pérez y Forbes, 2018, p. 1).

Tanto insecticidas, herbicidas y fungicidas son pesticidas que son utilizados para la protección de las plantas, de manera específica los fungicidas son un tipo específico de pesticida que permite controlar enfermedades fúngicas pues inhibe o mata de manera específica al hongo causante de la enfermedad (McGrath, 2016, párr. 2).

#### **2.2.10.1. Fungicidas protectantes**

Los fungicidas de contacto o también llamados protectores solamente actúan en la superficie de las plantas, previniendo que los esporangios lleguen a germinar y penetren a las células, por lo que se debe cubrir toda la planta con el producto en mención (Pérez y Forbes, 2018, p. 1).

McGrath (2016, párr. 2), menciona que los fungicidas protectantes, preventivo o curativo son aquellos productos que son usados para uso preventivo y funcionan por medio del contacto con la superficie de la planta, para proteger una planta es necesario una aplicación periódica y a su

vez también para reemplazar aquel material que fuese sido lavado por acción de la lluvia, el riego o diferentes factores climáticos, de cierta manera, gracias a la capacidad que poseen para penetrar en la planta algunos sistémicos cuentan con actividad preventiva y curativa, afectando al patógeno incluso después de la infección.

#### *2.2.10.2. Fungicidas sistémicos*

Los fungicidas sistémicos son absorbidos por medio de las raíces y por consiguiente se llegan a movilizar por toda la planta, por otro lado, los productos conocidos como fungicidas translaminares poseen la capacidad de desplazarse desde el lado superior al lado inferior de la hoja, pero no se puede mover de hoja a hojas (Pérez y Forbes, 2018, p. 1).

McGrath (2016, párr. 2), menciona que aquellos fungicidas sistémicos o también llamados penetrantes o fungicidas móviles son absorbidos por las plantas, y su movimiento es de cortas distancias desde el lugar de su aplicación mientras que otros se mueven extensamente en el tejido de la xilema.

#### *2.2.11. Descripción de los fungicidas utilizados en el presente estudio investigativo*

##### *2.2.11.1. Tebuconazol*

Es un fungicida sistémico que inhibe la biosíntesis del esterol, su sustancia activa se absorbe de manera rápida por los órganos vegetales y con ello se asegura que se dé una distribución completa y al interior de la planta, Tebuconazol actúa de tal manera que impide al patógeno su proceso de infección y reduciendo la producción de conidias en lesiones ya establecidas previamente (Álvarez, 2020, párr. 2).

Tebuconazol presenta una acción biocida, con un modo de acción sistémico y de contacto, preventivo y curativo o erradicante, el uso que presenta es de control de *Mycosphaerella fijensis* y otras enfermedades fungosas en banano y plátano, *Alternaria solani* en tomate y papa, y otros hongos en arroz, maní, ajo y ornamentales (Universidad Nacional de Costa Rica, 2022, párr. 1).

Su comportamiento en ambiente es que presenta una solubilidad baja en agua, con una persistencia extrema a mediana en el suelo, con una movilidad igual de ligera y no es volátil. En cuando a observaciones, R51/53: son tóxicos para organismos acuáticos, de cierta manera,

provoca efectos negativos en concentraciones bajas a largo plazo para las larvas de peces (Universidad Nacional de Costa Rica, 2022, párr. 5).

#### *2.2.11.2. Azoxystrobin*

Azoxystrobin funciona como un inhibidor de la respiración mitocondrial, lo que interrumpe el ciclo de energía dentro del hongo, lo cual interrumpe su ciclo de vida, siendo más frecuente en el proceso de germinación de esporas. En cuanto a su modo de acción, este fungicida muestra absorción gradual en las hojas, al ser transportado acropetalmente y de manera translaminar por el interior de las hojas, debe ser aplicado a manera de prevención (Syngenta Crop Protection, 2022, párr. 1).

Algo que señalar sobre Azoxystrobin es que, en el agua, en oscuridad, se mantiene estable, pero se llega a fotodegradar con la luz y llega a tener una vida media de 11-17 días. En el suelo se degrada rápidamente por los microorganismos con una vida media de 3 a 39 días y se fotodegrada (Terralia, 2018a, párr. 2).

#### *2.2.11.3. Metil-Tiofanato*

Metil tiofanato del grupo químico de benzimidazol, es un fungicida de modo de acción, sistémico, y protector, que es absorbido por las hojas y las raíces y las transporta vía floema (Ciati, 2020, párr. 1).

Respecto al modo de acción, su eficiencia es selectiva, extensa actividad por su estabilidad a la luz solar, por su acción sistémica puede ser aplicado directamente al suelo o manipulando las raíces transportando al follaje, ingresando en los tejidos de la planta, desplegando su acción fungicida (Toledo, 2018, p. 409).

#### *2.2.11.4. Boscalid*

Es un fungicida sistémico y translaminar de efectos preventivos, inhabilita la germinación de esporas e impide el desarrollo del tubo germinativo y la formación de apresorios, en algunos hongos también tiene efectos sobre el crecimiento micelial y el desarrollo de las esporas, aplicado sobre la superficie foliar, se absorbe y se mueve desde la base hasta el ápice de las hojas, el movimiento translaminar es del haz al envés de la hoja, inhabilita la enzima succinato ubiquinona reductasa, conocida como complejo citocrómico II, en la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial (Terralia, 2018b, párr. 2).

### 2.2.11.5. Sales de cobre

La acción fungicida y bactericida de los compuestos insolubles de Cobre, es la liberación lenta y constante del ion Cobre (II) o  $\text{Cu}^{2+}$  en contacto con el agua, los fungicidas cúpricos actúan por contacto y de forma anticipada, que forman una barrera protectora en la superficie de las hojas contra el ataque de los hongos endoparásitos (Iqvagro, 2019, párr. 1-3).

Los iones Cobre son absorbidos por las esporas del hongo y las bacterias hasta que la acumulación resulta perjudicial para sus células, las principales sales de Cobre que se vienen utilizando para uso fungicida y bactericida son el caldo bordelés, el Oxiclورو de Cobre y el hidróxido de Cobre (Iqvagro, 2019, párr. 1-3).

### 2.2.11.6. Cyprodinil

Cyprodinil es el ingrediente activo que ejerce de forma sistémica, el cual tiene propiedades lipofílicas, lo que proporciona su absorción dentro de la cutícula y las capas de cera de las hojas, favoreciendo así su distribución y penetración en el tejido de la planta (Syngenta, 2019, párr. 1).

Referente a su mecanismo de acción cyprodinil obstaculiza el crecimiento del micelio mediante la inhibición de la cistationina- $\beta$ -liasa, una etapa primordial en la biosíntesis de la metionina; así se obstaculiza el crecimiento del micelio en la planta (Syngenta, 2019, párr. 3).

**Tabla 2-2:** Fungicidas utilizados en la investigación

<b>Ingrediente activo</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Sitio de acción</b>	<b>Movilidad</b>
<b>Sulfato de cobre</b>	Productos químicos con actividad multi-sitio	Actividad de contacto multi-sitio	Contacto
<b>Tebuconazol</b>	Biosíntesis de esterol en las membranas	C14- demetilasa en la biosíntesis de esteroles (erg11/cip51)	Sistémico
<b>Azoxystrobin</b>	Respiración	Complejo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cit b)	Sistémico-translaminar
<b>Boscalid</b>	Respiración	Complejo II: succinato deshidrogenasa	Sistémico-translaminar
<b>Metil tiofanato</b>	Proteínas motoras y del citoesqueleto	Ensamblaje de la $\beta$ -tubulina en mitosis	Sistémico
<b>Cyprodinil</b>	Síntesis de aminoácidos y proteínas	Biosíntesis de metionina (propuesto) (gen cgs)	Sistémico

Realizado por: Paredes José, 2022

### 2.2.12. Clasificación de fungicidas de acuerdo con los modos de acción según la FRAC

A continuación, se presenta la tabla sobre la clasificación de fungicidas de acuerdo al modo de acción:

**Tabla 3-2:** Clasificación de fungicidas según el modo de acción según la FRAC

MODO DE ACCIÓN	CÓDIGO Y PUNTO DE ACCIÓN	NOMBRE DE GRUPO	GRUPO QUÍMICO	NOMBRE COMÚN
Citoesqueleto y proteína motora	B1 Tubulina Polimerización	CMB- Fungicidas (Metilo Benzimidazol Carbonatados)	benzimidazoles	Benomilo Carbendazim Fuberidazol Tiabendazol
			tiofanatos	Tiofanato Tiofanato-metilo
Respiración	C3 Complejo III: Citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa)	QoI-Fungicidas (quinona afuera inhibidores)	Metoxi- acrilatos	azoxistrobina cumoxistrobina enoxastrobina flufenoxistrobina picoxistrobina piraxistrobina
			metoxi- acetamida	mandestrobina
			metoxi- carbamatos	piraclostrobina pirametostrobina triclopiricarb
			oximino- acetatos	kresoxim-metil trifloxistrobina
			oximino- acetamidas	dimoxistrobina fenaministrobina metominostrobin orisastrobina
			oxazolidina- dionas	famoxadona
			dihidro- dioxazinas	fluoxastrobina
			imidazolinonas	fenamidona
			carbamatos de bencilo	carbamatos de bencilo
	QoI-Fungicidas (quinona afuera inhibidores; subgrupo A)	Tetrazolinonas	metiliteraprole	
	C4 Complejo III: citocromo bc1 (ubiquinona reductasa) en el sitio Qi	QoII-fungicidas (Quinona dentro Inhibidores)	ciano-imidazol	ciazofamida
			sulfamoil- triazol	amisulbrom
			picolinamidas	fenpicoxamida florilpicoxamida
C8 complejo III: citocromo bc1 (ubiquinona reductasa) en Sitio Qo, estigmatelina subsitio vinculante	QoSI fungisidas (Quinona fuera inhibidor, estigmatización tipo de enlace)	triazolo- pirimidilamina	ametotradina	

	<b>D1</b> metionina biosíntesis (propuesto) (gen cgs)	<b>AP</b> -fungicidas (Anilino-Pirimidinas)	anilino-pirimidinas	ciprodinilo mepanipirim pirimetanil
<b>Transducción de señal</b>	<b>E2</b> MAP/Histidina-Quinasa en osmótica transducción de señales (os-2, HOG1)	<b>PP</b> -fungicidas FenilPirroles	fenilpirroles	fenpiclonil fludioxonil
<b>Síntesis o transporte de lípidos/integridad o función de la membrana</b>	<b>F3</b> peroxidación celular (propuesto)	Ah-fungicidas (Aromático Hidrocarburos) (clorofenilos, Nitroanilinas)	hidrocarburos aromáticos	bifenilo cloroneb dicloran quintoceno (PCNB) tecnaceno (TCNB) tolclofos-metil
<b>Biosíntesis de esteroides en membranas</b>	<b>G1</b> C14- desmetilasa en esterol biosíntesis (erg11/cyp51)	<b>DMI</b> -fungicidas (Desmetilación Inhibidores) (SBI: Clase I)	piperazinas	triforina
			piridinas	pirifenox pirisoxazol
			pirimidinas	fenarimol nuarimol
			imidazoles	imazalil oxpoconazol pefurazoato procloraz triflumizol
			triazoles	azaconazol bitertanol bromuconazol ciproconazol difenoconazol diniconazol epoxiconazol etaconazol fenbuconazol fluquinconazol flusilazol flutriafol hexaconazol imibenconazol ipconazol mefentrifluconazol metconazol miclobutanil penconazol propiconazol simeconazol tebuconazol tetraconazol triadimefón triadimenol triticonazol protioconazol
	<b>G3</b> 3-ceto reductasa, C4- desmetilación (erg27)	<b>KRI</b> fungicidas Cetorreductasa Inhibidores	hidroxianilidas	fenhexamida
			amino-pirazolinona	fenpirazamina
<b>Biosíntesis de la pared celular</b>	<b>H5</b> celulosa sintasa	<b>CAA</b> -fungicidas Ácido carboxílico Amidas	amidas de ácido cinámico	dimetomorfo flumorfo pirimorfo
			valinamida carbamatos	bentiavalicarbo iprovalicarbo valifenalato
			amidas del ácido mandélico	mandipropamida

Fuente: FRAC Code List, 2022

Realizado por: Paredes José, 2022

### ***2.2.13. Sensibilidad y resistencia a fungicidas***

Tomando en cuenta que resistencia se define como la competencia de un patógeno para sobrevivir al grado letal de un fungicida o bactericida, hay que diferenciar la resistencia propia, que es inherente a un patógeno que jamás fue sensible, de la resistencia obtenida la cual es la capacidad de un patógeno para sobrevivir a grados de fungicida o bactericida que anteriormente sus resultados fueron letales (Montesinos, 2005, párr. 1-3).

Los componentes de la resistencia son evidentemente variables y pueden ser causados por la disminución de la permeabilidad celular al fungicida, la desintoxicación ya sea por variabilidad química o por restricción, a pesar de ello, los fungicidas no promueven resistencia al contrario seleccionan dicha población del patógeno que se ha transformado u obtenido mencionada capacidad al intercambio genético, aunque la resistencia se muestre frecuentemente en el laboratorio mediante la investigación de aislados de patógenos, esto no implica que la eficiencia en campo sea afectada (Montesinos, 2005, párr. 1-3).

### ***2.2.14. Métodos in vitro para estudiar sensibilidad de fungicidas***

#### ***2.2.14.1. Crecimiento micelial***

Guigón et al. (2010, pp. 87-96), mencionan que, en su trabajo, para la determinación de la tasa de crecimiento se colocaron en discos de PDA de 8 mm de diámetro el micelio de cada cepa, en una caja Petri de 90 mm de diámetro mismas que fueron inoculadas a una temperatura de 25 °C; siendo medido de manera diaria el crecimiento radial.

Por otra parte, Martínez et al. (2015, p. 4), mencionan en su trabajo que el crecimiento de los hongos se estimó basándose en el diámetro de la colonia fúngica en intervalos de 24 a 48 horas.

#### ***2.2.14.2. Dosis letal 50 (DL50)***

Sánchez y Andrade (2009, p. 35), mencionan que la  $DL_{50}$  es aquella concentración obtenida por estadística, de una sustancia la cual se espera produzca la muerte del 50% de los individuos expuestos durante un tiempo determinado. El valor de la  $DL_{50}$  se expresa en miligramos por litro (mg/L).

## CAPITULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Enfoque de investigación

Es una investigación propuesta para dar respuesta a problemas que presentan los productores agrícolas y agroforestales.

#### 3.2. Nivel de Investigación

En una investigación básica de tercer nivel para la obtención de título de pregrado.

#### 3.3. Diseño de investigación

Se trabajará con 6 aislados de *Trichoderma* con 5 dosis, 3 repeticiones cada uno y 6 fungicidas, dando un total de 108 repeticiones por ensayo. En donde se evaluarán el diámetro de crecimiento micelial por día en el eje ecuatorial(X) y en el eje polar (Y) utilizando un Diseño Completamente al Azar.

Si los datos presentan normalidad, se aplicará el Análisis de Varianza.

Se utilizará el test de Tukey al 5% para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos para separar las medias.

##### *3.3.1. Según la manipulación o no de la variable independiente*

Es una investigación de tipo experimental.

##### *3.3.2. Según las intervenciones en el trabajo de campo*

La investigación tendrá una intervención de tipo longitudinal.

### 3.4. Tipo de estudio

La investigación es de tipo laboratorio, ya que mencionado tema exige la utilización de equipos y materiales que posea un laboratorio de Fitopatología.

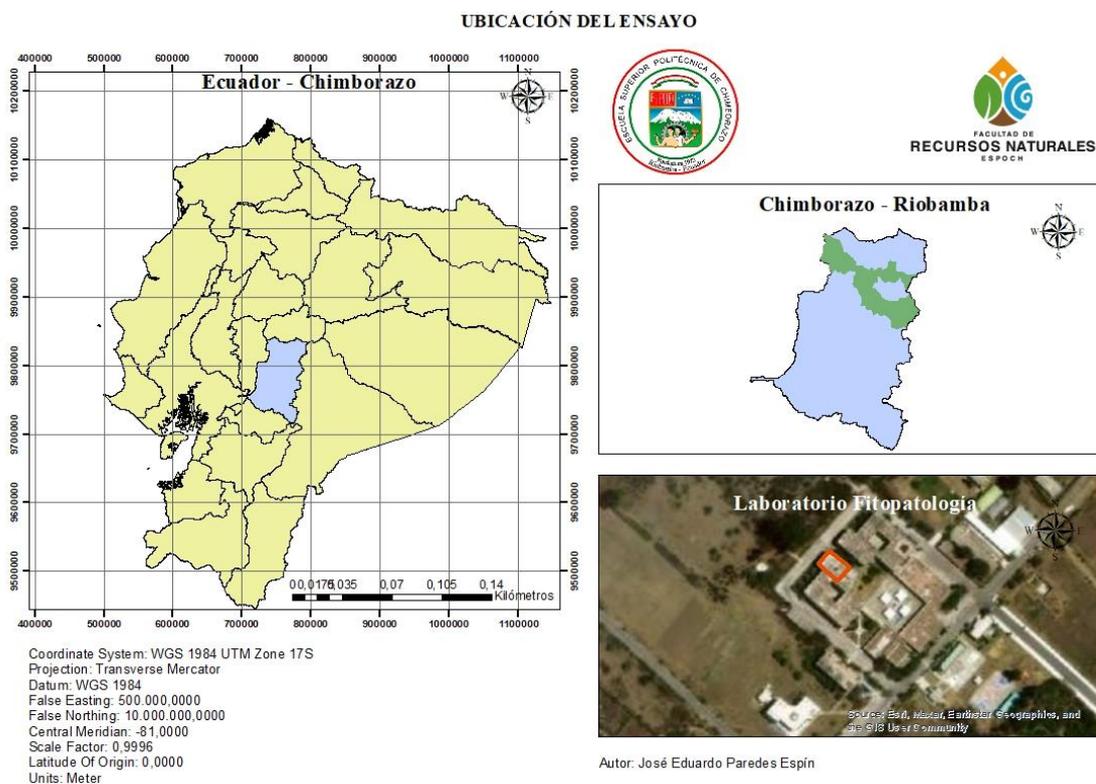
### 3.5. Población y Planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

Las unidades experimentales constarán de 6 aislados x 5 dosis x 6 fungicidas y 3 repeticiones.

### 3.6. Características del lugar

#### 3.6.1. Localización del sitio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo sede central Riobamba.



**Ilustración 1-3:** Ubicación geográfica del laboratorio de fitopatología

Realizado por: Paredes José, 2022

### **3.7. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación**

#### **3.7.1. Materiales y equipos**

##### *3.7.1.1. De escritorio*

Computadora, impresora, regla, lápices, borrador, carpeta, libreta de apuntes, esferos, papelería en general, marcadores, tijeras.

##### *3.7.1.2. De Laboratorio*

#### **Material biológico**

Las cepas de *Trichoderma* que fueron utilizadas para el estudio fueron aisladas de suelos agroforestales de Santa Cruz, Islas Galápagos.

#### **Materiales**

Cajas Petri de vidrio, botellas de vidrio de tapa roscable (1000 mL), sorbetes, palillos, puntas para micropipeta (1000 µL), vasos de precipitación (500 mL), papel film, pinzas, jeringas (5 ml), guantes, papel toalla, cinta masking, mascarilla.

#### **Equipos**

Cámara de flujo laminar (OASIS 48), Autoclave (BIOBASE BKQ-B100II), Destilador de agua (BOECO WS 8000), Incubadora (DIN12880-2007-K1, MEMMERT), Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), Secador de vidrio (SELECTA 200038), Microondas (PANASONIC 900W), Cámara fotográfica (CANNON), Micropipeta (Eppendorf), Calibrador digital (VERNIER).

#### **Reactivos e insumos**

Cepas de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma breve*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma resei*, *Trichoderma andinense*, papa dextrosa agar (PDA), fungicidas: Benzimidazol (metil-tiofanato), Triazol (Tebuconazol), Estrobilurinas (Azoxystrobin),

Carboxamida (Boscalid), Sales de cobre, Pirimidina (Cyprodinil), alcohol antiséptico al 70%, agua destilada estéril, antibióticos. (cloranphenicol; streptomycin).

**Principios activos utilizados:**

**Tabla 1-3:** Listado de ingredientes activos y nombres comerciales que fueron utilizados

<b>Ingrediente Activo</b>	<b>Nombre comercial</b>
Sulfato de cobre	Phyton SL
Tebuconazol	Stratego® SC
Azoxystrobin	Amistar 50 WG
Metil tiofanato	Novak® 500 SC
Cyprodinil	Escudo 75 WG
Boscalid	Cantus® 50 WG

**Realizado por:** Paredes José, 2022

**3.7.2. Metodología**

*3.7.2.1. Preparación del medio de cultivo*

Se esterilizó dos frascos de vidrio con tapa roscable de 1000 mL, después se añade 39 g de medio de cultivo PDA y 1000 mL de agua destilada. Se esteriliza a 121 °C por 25 minutos.

Se añadió cloranphenicol y streptomycin al 5% y las cantidades de fungicidas determinados según la concentración deseada, posterior se dispensa en las cajas Petri.

*3.7.2.2. Cálculos para determinar las concentraciones de los fungicidas*

Los cálculos para alcanzar la solución madre fueron ejecutados en base a las concentraciones del ingrediente activo en cada uno de los fungicidas; lo que se presenta a continuación un ejemplo:

Cálculo del fungicida Tebuconazol al 43%:

$$\begin{array}{l}
 1\% \longrightarrow 5\,000 \text{ mg/L} \\
 43\% \longrightarrow ? = 215\,000 \text{ mg/L} = C_i
 \end{array}$$

Luego de conseguir la concentración inicial (Ci) se determinó el volumen del fungicida para que la solución se encuentre en stock en un volumen de 5 mL de solución, para lo que se utilizó la fórmula propuesta por Descroizilles (Domingo, 2020, párr. 13-19):

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$
$$215\,000 \text{ mg/L} * V_i = 5\,000 \text{ mg/L} * 5 \text{ mL}$$
$$V_i = \frac{25\,000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot \text{ml}}{215\,000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} = 0,12 \text{ ml del fungicida}$$

Dónde:

Ci = Concentración inicial

Vi = Volumen inicial

CF = Concentración final

Vf = Volumen final

Una vez conocida la cantidad de fungicida para nuestra solución se procede a determinar la cantidad de solvente a utilizar, para lo cual:

$$V_T = V_f + V_s$$
$$5 \text{ mL} = 0,12 \text{ mL} + V_s$$
$$V_s = 5 \text{ mL} - 0,12 \text{ mL}$$
$$V_s = 4,88 \text{ mL de agua destilada estéril}$$

Dónde:

VT = Volumen total

Vf = Volumen del fungicida

Vs = Volumen del solvente

La solución lograda es la solución stock; es decir, que su concentración está a 500 ppm y para obtener dosis más pequeñas se realizó la dilución de esta, es decir: especificar otra solución stock para 100 ppm.

100 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución stock.

10 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución 100 ppm.

1 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución 10 ppm.

0,1 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución 1 ppm.

0 ppm = control

### 3.7.2.3. Aislados de *Trichoderma*

Para la activación de los aislados se utilizaron seis especies, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma breve*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma resei*, *Trichoderma andinense*.

De acuerdo con los principios activos del fungicida se prepararon metil-tiofanato (Benzimidazol), Tebuconazol (Triazol), Azoxystrobin (Estrobilurinas), Boscalid (Carboxamida), Sales de cobre, Cyprodinil (Pirimidina) solución madre de cada fungicida y dosificación, se tomaron las diferentes fracciones para obtener una concentración de 0; 0,1; 1; 10; 100; 500 (mg/L) de ingrediente activo.

Se utilizó la siguiente formula:

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

Donde:

$C_i$  = concentración inicial

$V_i$  = volumen inicial

$C_f$  = concentración final

$V_f$  = volumen final

### 3.7.2.4. Preparación de la solución Stock

Una vez obtenidos los cálculos, se procedió a realizar la solución stock dentro de la cabina de flujo con el volumen de 5 mL, para lo cual se tomó una parte del fungicida con ayuda de la micro pipeta siempre y cuando el fungicida sea líquido (en caso que el fungicida sea sólido se pesó con la ayuda de la balanza digital), y se colocó en un vaso de precipitación posteriormente se colocó la cantidad faltante de agua destilada estéril para completar los 5 mL que fue el volumen de la solución final, así obteniendo la dosis 500 ppm.

Para la preparación de las dosis pequeñas se realizó por medio de disolución, es decir, con ayuda de la micro pipeta se tomó 0,5 mL de la solución madre (dosis 500 ppm) y se añadió en un vaso de precipitación, luego se colocó 4,5 mL de agua destilada estéril, obteniendo así una solución de

5 mL (dosis 100 ppm) y para las otras dosis más pequeñas (10; 1; 0,1 ppm) se procede a repetir el procedimiento anterior.

#### 3.7.2.5. *Ensayo de crecimiento micelial*

Para el crecimiento micelial de los aislados de *Trichoderma*, se obtuvieron discos con ayuda de sorbetes estériles y se colocó en las cajas petri en medio de cultivo enmendado con cada dosis del fungicida. Las mismas que fueron etiquetadas, selladas con papel film y llevadas a la incubadora en obscuridad a temperatura  $25\pm 2$  °C hasta que el control llenó por completo la caja.

Los datos del crecimiento micelial de aislados de *Trichoderma* se recogieron bajo mediciones cada 24 horas en milímetros (mm) de los dos ejes x (ecuatorial), y (polar) que se realizaron al momento de la instalación del ensayo tanto del testigo como de los medios enmendados con el fungicida, los cuales se registraron en una matriz anteriormente elaborada.

#### 3.7.2.6. *Tasa de crecimiento micelial*

Se calculó la tasa de crecimiento cada 24 horas (mm/día) de acuerdo al procedimiento establecido, para lo cual se tomaron los radios de crecimiento micelial del día inicial y final, utilizando la siguiente ecuación:

$$T_c = \frac{C_f - C_i}{T_f - T_i}$$

Donde:

Cf: Crecimiento diametral final expresado en mm

Ci: Crecimiento diametral inicial (día uno) expresado en mm

Tf: Tiempo final (día final)

Ti: Tiempo inicial (día uno)

#### 3.7.2.7. *Estimación de dosis letal (DL<sub>50</sub>)*

Por otra parte, para conocer la sensibilidad de las seis especies de *Trichoderma* se estimó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), lo cual permitió conocer la variabilidad entre los aislados y un grupo de fungicidas, para medir la potencia fungitóxica, también permitió calcular el crecimiento o germinación relativa al testigo por cada una de las dosis de fungicida y aislados lo cual se calculó usando la regresión de los valores de inhibición de crecimiento micelial versus al log<sub>10</sub> de la concentración de los fungicidas.

### 3.7.2.8. Porcentaje de inhibición

Conjuntamente se efectuó la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{diámetro medio} * 100}{\text{diámetro concentración cero}}$$

### 3.7.2.9. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se montó en un diseño completamente al azar con 3 repeticiones para cada tratamiento. Los datos se analizaron con el programa R. versión 4.1, utilizando un análisis exploratorio con diagramas de caja y bigotes, mediciones de resumen (mediana, desviación estándar), y para la separación de los diferentes tratamientos se compararon utilizando intervalos de confianza del 95%.

### 3.7.2.10. Rango de sensibilidad

Se caracterizaron los fenotipos como: sensibles, levemente resistente, moderadamente resistente y resistente. Mediante la escala de sensibilidad propuesta por Edgington et al. (1970; citado en Yumbo, 2022, p. 33):

**Tabla 2-3:** Rangos de sensibilidad

Fenotipos	DL <sub>50</sub> (mg/L)
Sensible	<1
Levemente resistente	1 – 10
Moderadamente resistente	10 – 50
Resistente	>50

Realizado por: Paredes José, 2022

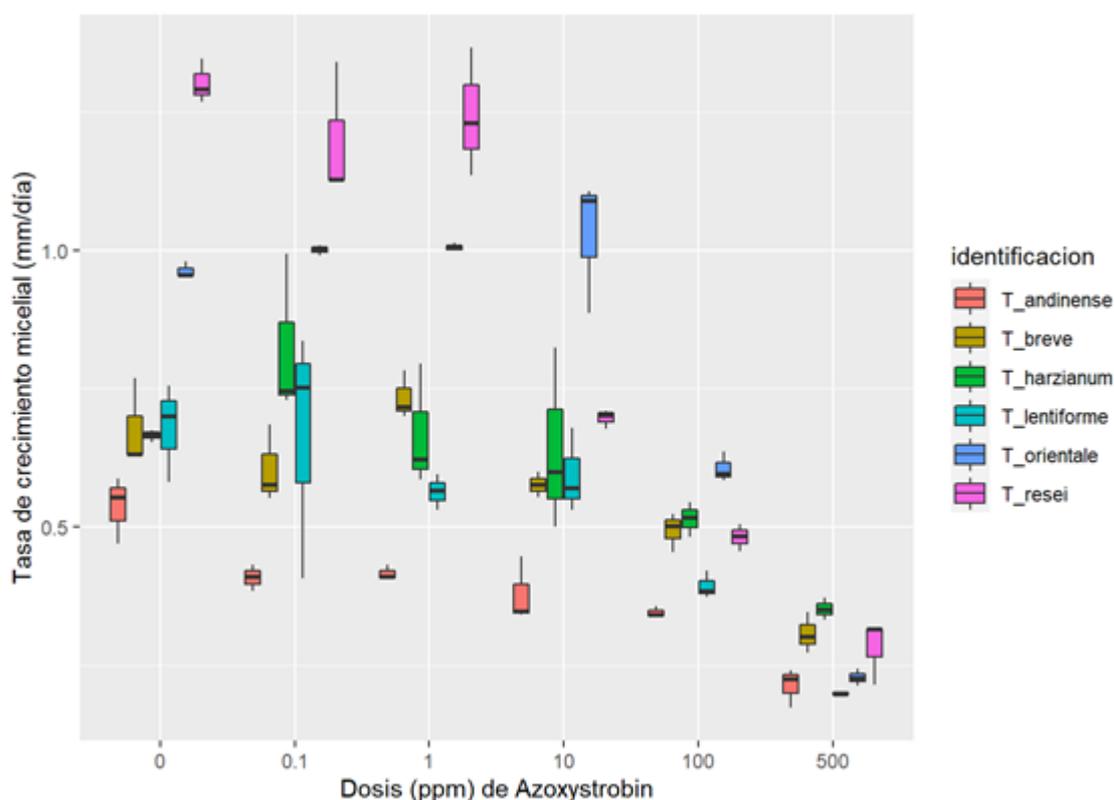
### 3.7.2.11. Recolección de datos

Una vez montado el ensayo, se procedió a la medición del diámetro de cada tratamiento y repetición de manera horizontal (ecuatorial) y vertical (polar) cada 24 h. Tomando en cuenta que las cajas Petri debían mantener condiciones de temperatura controladas en todo el ensayo para cada caso y que las mediciones deben ser realizadas en un mismo horario una vez recolectada la información, la cual se procedió a agrupar la información en un documento de Microsoft Excel con hojas separadas por cada producto utilizado.

## CAPITULO IV

### 4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Azoxystrobin

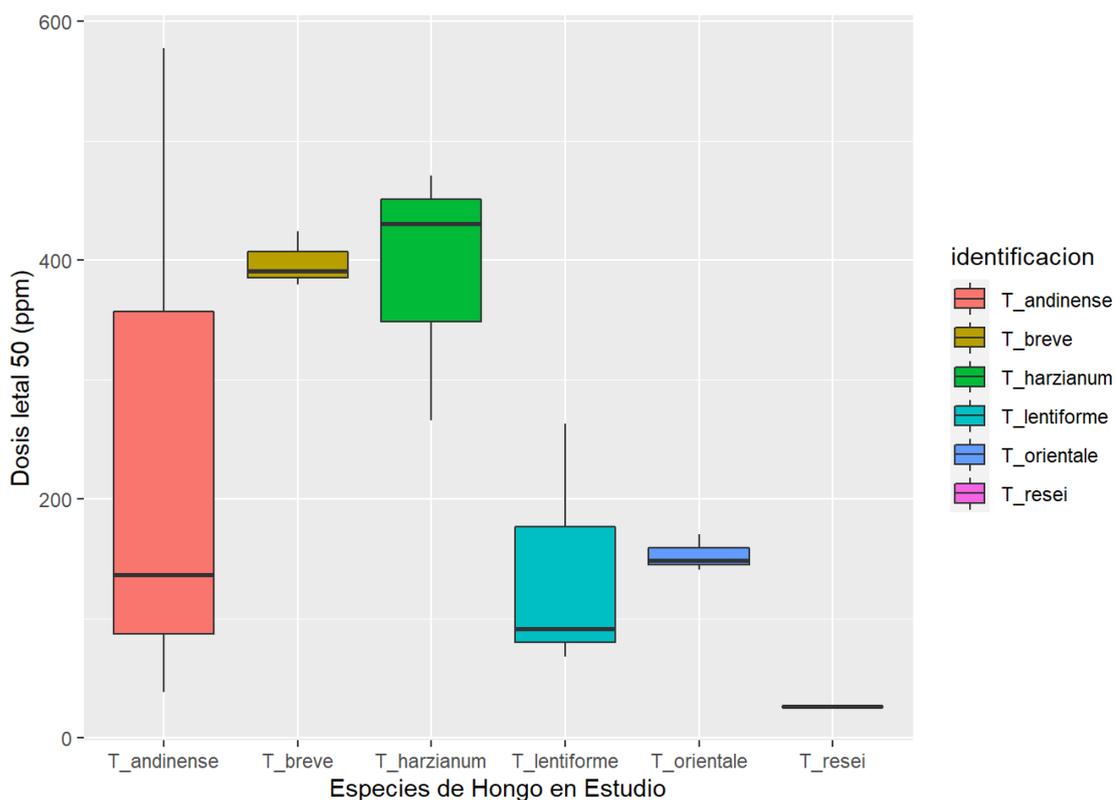


**Ilustración 1-4:** TCM de seis aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con Azoxystrobin en diferentes dosis

Realizado por: Paredes José, 2022

De acuerdo a la Ilustración 1-4, la Tasa de Crecimiento Micelial en las dosis 0 (Tratamiento control); 0,1; y 1; ppm nos muestra que los aislados correspondientes a *Trichoderma andinense*, presentaron el menor crecimiento, opuesto a lo presentado por los aislados de *Trichoderma resei* que presentaron el mayor crecimiento micelial en las dosis mencionadas; mientras que en las dosis 10; y 100; ppm muestran que los aislados correspondientes a *Trichoderma andinense* presentaron el menor crecimiento opuesto a lo presentado por *Trichoderma orientale* con un mayor crecimiento, finalmente en la dosis 500 ppm en el aislado de *Trichoderma lentiforme* con un menor crecimiento y en *Trichoderma harzianum* con un mayor crecimiento micelial.

#### 4.1.1. Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de Azoxystrobin para los diferentes aislados de *Trichoderma*



**Ilustración 2-4:** DL<sub>50</sub> de Azoxystrobin para seis aislados de *Trichoderma*

Realizado por: Paredes José, 2022

El aislado *Trichoderma breve* requiere mayor DL<sub>50</sub> de Azoxystrobin para su control, a diferencia del aislado *Trichoderma resei* que requiere menor DL<sub>50</sub> de Azoxystrobin para su control.

**Tabla 1-4:** Análisis de varianza para la DL<sub>50</sub> de diferentes aislados de *Trichoderma* enmendado con Azoxystrobin

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(>F)
Aislados	5	327997	65599	3,697	0,0295*
Error	12	212906	17742		

Realizado por: Paredes José, 2022

Códigos de significancias: 0 ‘\*\*\*’ 0,001 ‘\*\*’ 0,01 ‘\*’ 0,05 ‘.’ 0,1 ‘ ’ 1

El análisis de varianza (ANOVA), indicó que existe diferencia significativa en el factor estudiado con un valor de P=0,0295 (Tabla 1-4).

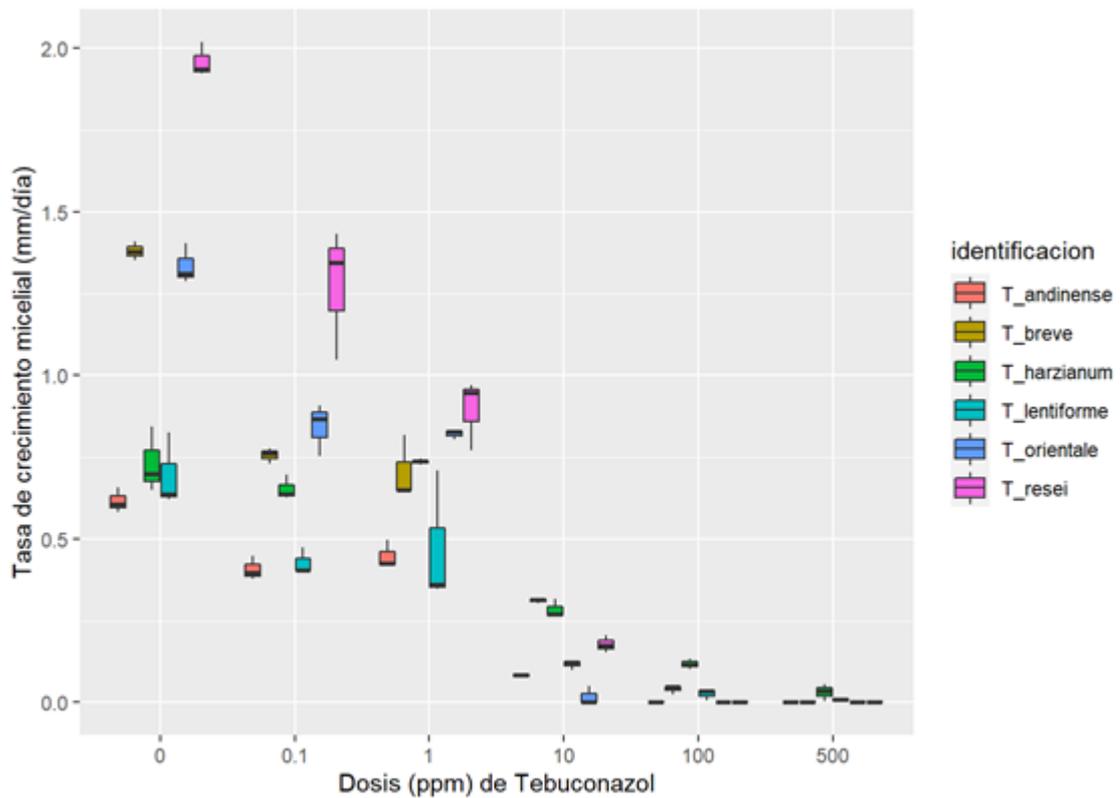
**Tabla 2-4:** Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de *Trichoderma* con diferentes dosis de Azoxystrobin

Aislados	DL <sub>50</sub>	Rango de Significancia <sup>1</sup>
<i>T_breve</i>	398,32	a
<i>T_harzianum</i>	389,29	ab
<i>T_andinense</i>	250,64	ab
<i>T_orientale</i>	153,32	ab
<i>T_lentiforme</i>	140,79	ab
<i>T_resei</i>	26,43	b

Realizado por: Paredes José, 2022

La prueba Tukey al 5% en diferentes aislados de *Trichoderma* (Tabla 2-4) mostró dos grupos estadísticos; en el grupo “a” se encuentra la identificación *Trichoderma breve*; en el grupo “ab” se encuentran las identificaciones *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma andinense*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma lentiforme*; finalmente en el grupo “b”, se encuentra la identificación *Trichoderma resei*, en donde el aislado *Trichoderma breve* con mayor DL<sub>50</sub> resistencia y con el menor DL<sub>50</sub> es el aislado *Trichoderma resei* que por su valor entra en el rango de moderadamente resistente, considerando que los aislados presentan diferencia significativa en sus muestras al fungicida Tebuconazol.

#### 4.2. Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol

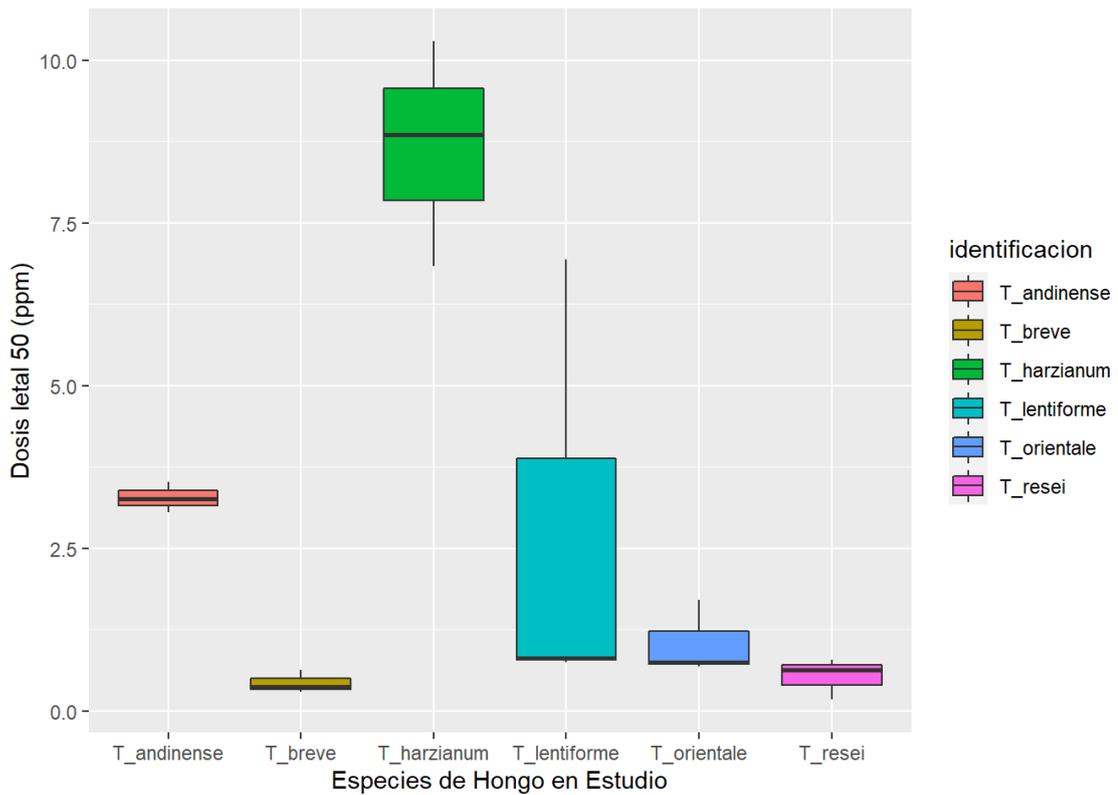


**Ilustración 3-4:** TCM de seis aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con Azoxystrobin en diferentes dosis

Realizado por: Paredes José, 2022

De acuerdo a la Ilustración 3-4, la TCM en las dosis 0 (Tratamiento control) y 0,1 ppm muestran que los aislados correspondientes a *Trichoderma andinense*, presentan el menor crecimiento, opuesto a lo señalado por los aislados de *Trichoderma resei* que presentan el mayor crecimiento; mientras que en las dosis 1 ppm indica que el aislado perteneciente a *Trichoderma orientale* presenta el menor crecimiento opuesto a lo presentado por *Trichoderma resei* con un mayor crecimiento, seguido por la dosis 10 ppm en el aislado de *Trichoderma orientale* con un menor crecimiento y en *Trichoderma breve* con un mayor crecimiento micelial, finalmente en las dosis 100 y 500 ppm que no presentan crecimiento significativo en sus aislados.

#### 4.2.1. Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de Tebuconazol para los diferentes aislados de *Trichoderma*



**Ilustración 4-4:** DL<sub>50</sub> de Tebuconazol para seis aislados de *Trichoderma*

Realizado por: Paredes José, 2022

El aislado *Trichoderma harzianum* requiere mayor DL<sub>50</sub> de Tebuconazol para su control, a diferencia del aislado *Trichoderma breve* que requiere menor DL<sub>50</sub> de Tebuconazol para su control.

**Tabla 3-4:** Análisis de varianza para la DL<sub>50</sub> de diferentes aislados de *Trichoderma* enmendado con Tebuconazol

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(>F)
Aislados	5	145,41	29,082	10,8	0,000412***
Error	12	32,33	2,694		

Realizado por: Paredes José, 2022

Códigos de significancias: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

El análisis de varianza (ANOVA), indicó que existe diferencia altamente significativa en el factor estudiado con un valor de  $P=0,000412$  (Tabla 3-4).

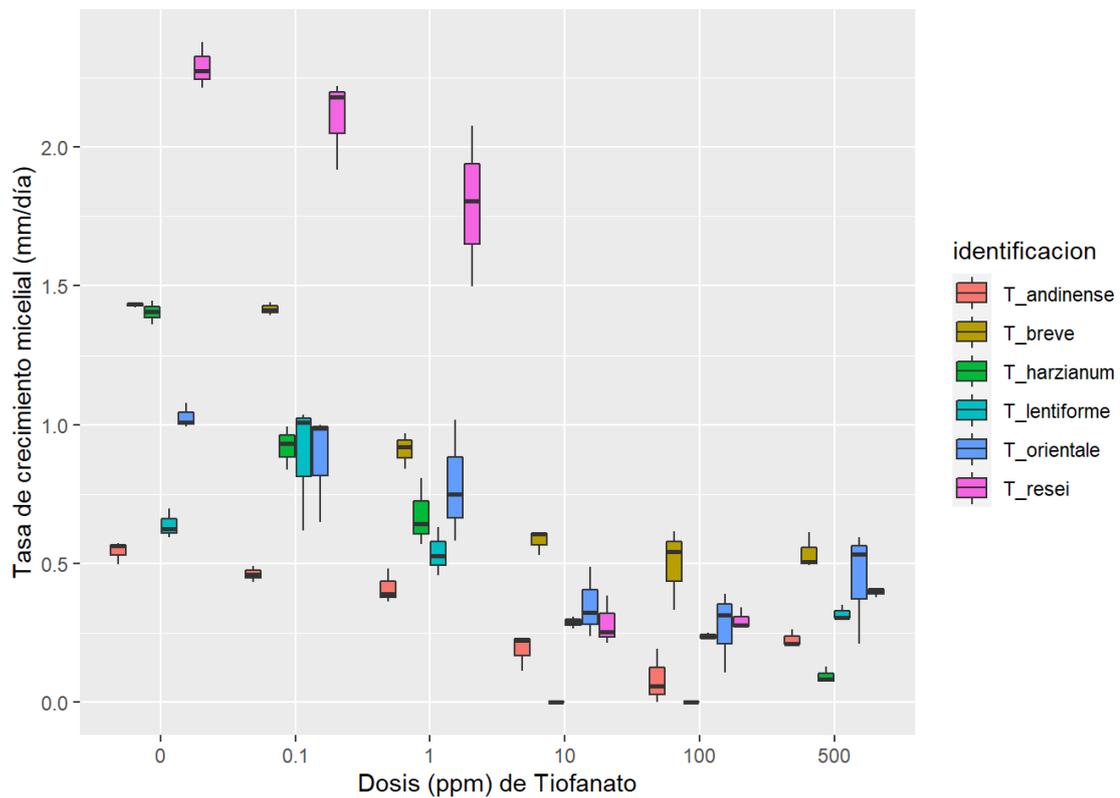
**Tabla 4-4:** Test de Tukey al 5% de la DL<sub>50</sub> de los seis diferentes aislados de *Trichoderma* con diferentes dosis de Tebuconazol

Aislados	DL <sub>50</sub>	Rango de Significancia <sup>1</sup>
<i>T_harzianum</i>	8,66	a
<i>T_andinense</i>	3,27	b
<i>T_lentiforme</i>	2,83	b
<i>T_orientale</i>	1,04	b
<i>T_resei</i>	0,52	b
<i>T_breve</i>	0,43	b

Realizado por: Paredes José, 2022

La prueba Tukey al 5% en diferentes aislados de *Trichoderma* (Tabla 4-4) mostró dos grupos estadísticos; en el grupo “a” se encuentra el aislado *Trichoderma harzianum*; y en el grupo “b” se encuentran los aislados *Trichoderma andinense*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma resei* y *Trichoderma breve*, en donde el aislado *Trichoderma harzianum* con una mayor DL<sub>50</sub> que por su valor calculado es levemente resistente a diferencia del aislado *Trichoderma breve* con la menor DL<sub>50</sub> considerado como sensible al fungicida Tebuconazol.

#### 4.3. Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiofanato

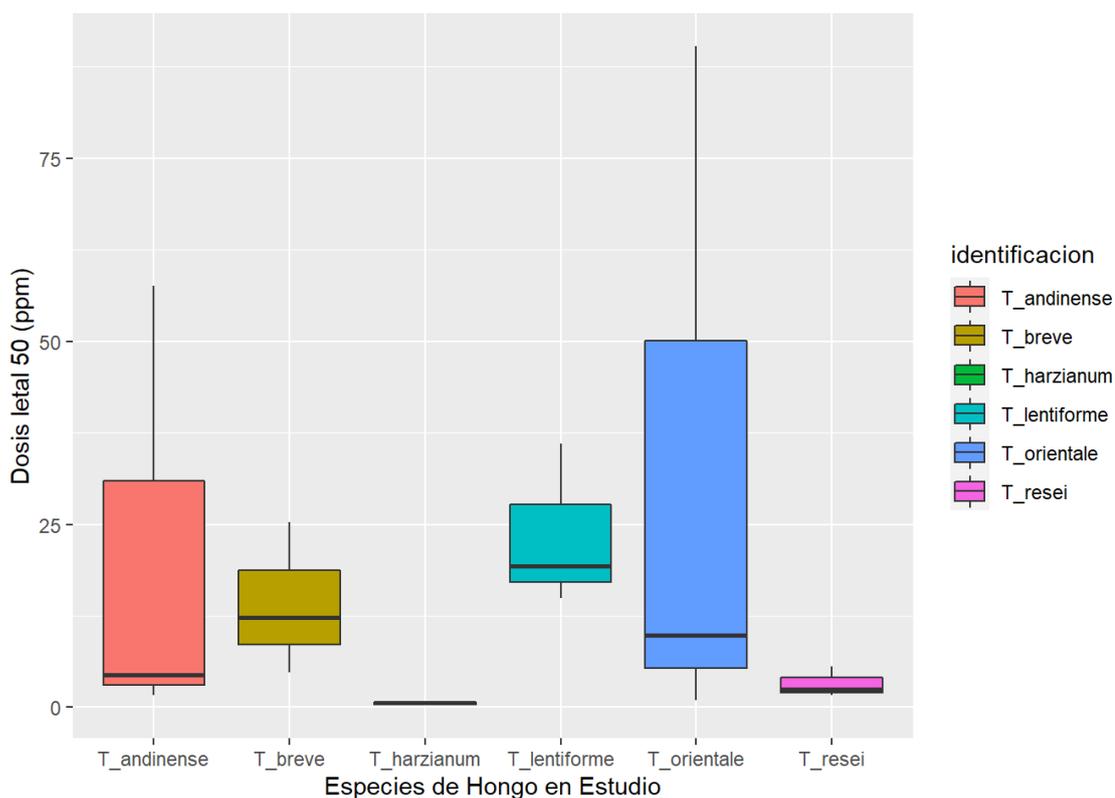


**Ilustración 5-4:** TCM de seis aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con Tiofanato en diferentes dosis

**Realizado por:** Paredes José, 2022

De acuerdo a la Ilustración 5-4, la Tasa de Crecimiento Micelial en las dosis 0 (Tratamiento control); 0,1; y 1; ppm nos muestra que los aislados correspondientes a *Trichoderma andinense*, presentaron el menor crecimiento, opuesto a lo presentado por los aislados de *Trichoderma resei* que presentaron el mayor crecimiento micelial en las dosis mencionadas; mientras que en las dosis 10; 100; y 500 ppm muestran que los aislados correspondientes a *Trichoderma harzianum* presentaron el menor crecimiento opuesto a lo presentado por *Trichoderma breve* con un mayor crecimiento micelial.

### 4.3.1. Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de Tiofanato para los diferentes aislados de *Trichoderma*



**Ilustración 6-4:** DL<sub>50</sub> de Tiofanato para seis aislados de *Trichoderma*

**Realizado por:** Paredes José, 2022

El aislado *Trichoderma orientale* requiere mayor DL<sub>50</sub> de Tiofanato para su control, a diferencia del aislado *Trichoderma harzianum* que requiere menor DL<sub>50</sub> de Tiofanato para su control.

**Tabla 5-4:** Análisis de varianza para la DL<sub>50</sub> de diferentes aislados de *Trichoderma* enmendado con Tiofanato

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(>F)
Aislados	5	2401	480,3	0,789	0,577
Error	12	7303	608,6		

**Realizado por:** Paredes José, 2022

Códigos de significancias: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

El análisis de varianza (ANOVA), indicó que no existe diferencia significativa en el factor estudiado con un valor de P=0,577 (Tabla 5-4).

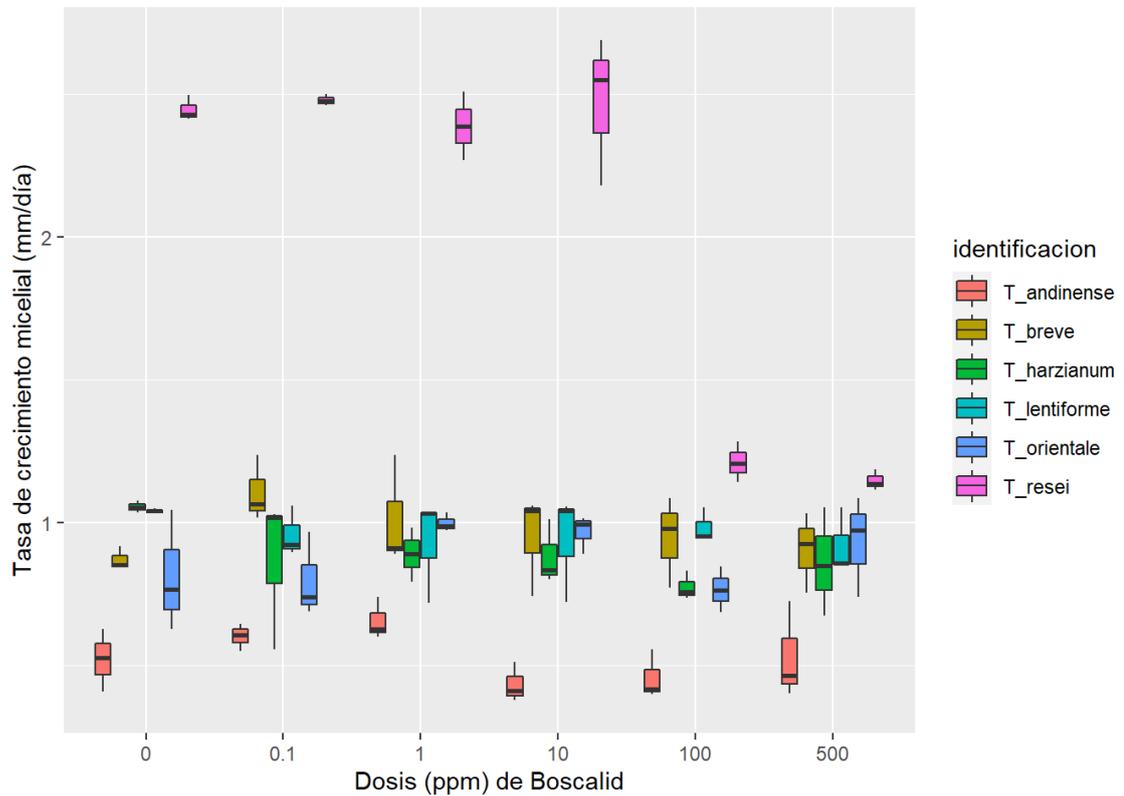
**Tabla 6-4:** Test de Tukey al 5% de la DL50 de los seis diferentes aislados de *Trichoderma* con diferentes dosis de Tiofanato

Aislados	DL <sub>50</sub>	Rango de Significancia <sup>1</sup>
<i>T_orientale</i>	33,70	a
<i>T_lentiforme</i>	23,42	a
<i>T_andinense</i>	21,20	a
<i>T_breve</i>	14,13	a
<i>T_resei</i>	3,23	a
<i>T_harzianum</i>	0,55	a

Realizado por: Paredes José, 2022

La prueba Tukey al 5% en diferentes aislados de *Trichoderma* (Tabla 6-4) mostró un grupo específico para todos los aislados, esto quiere decir que no presenta diferencia significativa en sus muestras en donde el aislado *Trichoderma orientale* con una mayor DL<sub>50</sub> y un grado de sensibilidad de moderadamente resiste según la escala de Edgington a diferencia del aislado *Trichoderma harzianum* con una menor DL<sub>50</sub> considerado como sensible al principio activo de tiofanato metil por su menor valor.

#### 4.4. Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Boscalid

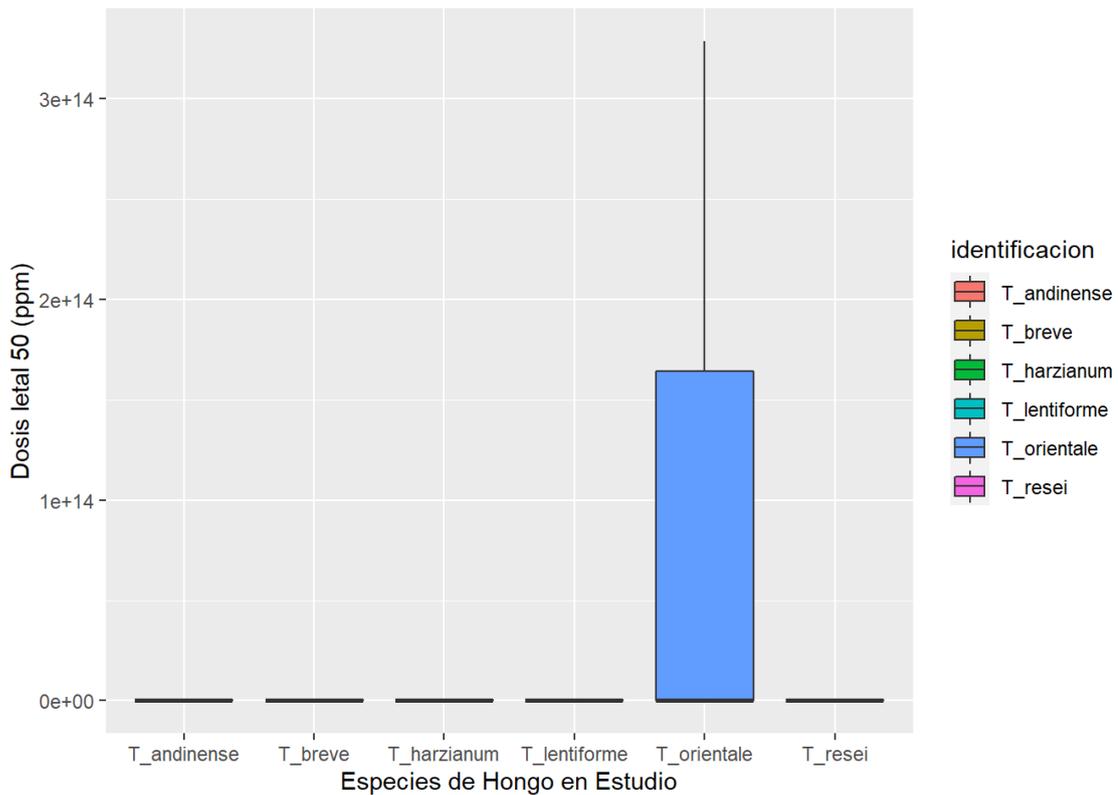


**Ilustración 7-4:** TCM de seis aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con Boscalid en diferentes dosis

**Realizado por:** Paredes José, 2022

De acuerdo a la Ilustración 7-4, la Tasa de Crecimiento Micelial en todas las dosis evaluadas 0; 0,1; 1; 10; 100; y 500 ppm nos muestra que los aislados correspondientes a *Trichoderma andinense*, presentaron el menor crecimiento, diferente a lo presentado por los aislados de *Trichoderma resei* que obtuvieron el mayor crecimiento micelial en todas las dosis mencionadas.

**4.4.1. Dosis letal ( $DL_{50}$ ) de Boscalid para los diferentes aislados de *Trichoderma*.**



**Ilustración 8-4:** DL50 de Boscalid para seis aislados de *Trichoderma*

Realizado por: Paredes José, 2022

El aislado *Trichoderma orientale* requiere mayor  $DL_{50}$  de Boscalid para su control, a diferencia del resto de aislados que requiere menor  $DL_{50}$  de Boscalid para su control.

**Tabla 7-4:** Análisis de varianza para la  $DL_{50}$  de diferentes aislados de *Trichoderma* enmendado con Boscalid

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(>F)
Aislados	5	3,002e+28	6.003e+27	1	0,458
Error	12	7,204e+28	6.003e+27		

Realizado por: Paredes José, 2022

Códigos de significancias: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

El análisis de varianza (ANOVA), indicó que no existe diferencia significativa en el factor estudiado con un valor de  $P=0,458$  (Tabla 7-4).

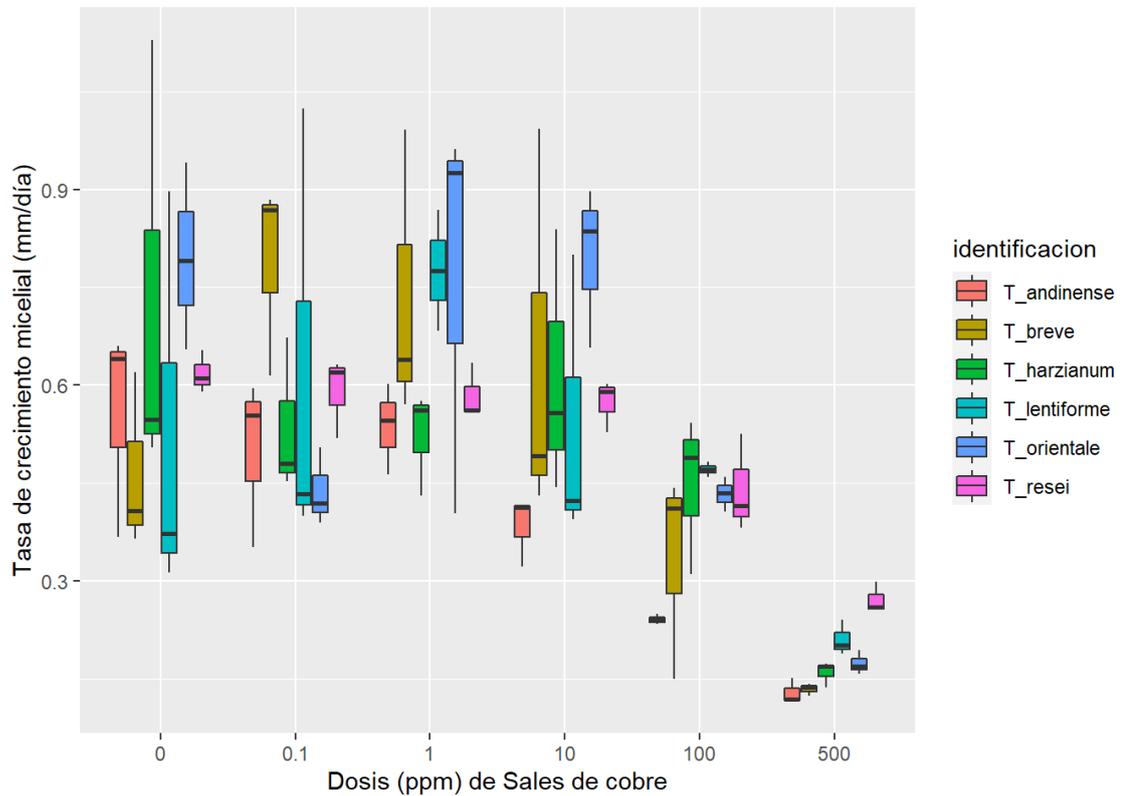
**Tabla 8-4:** Test de Tukey al 5% de la DL<sub>50</sub> de los seis diferentes aislados de *Trichoderma* con diferentes dosis de Boscalid

Aislados	DL <sub>50</sub>	Rango de Significancia <sup>1</sup>
<i>T_orientale</i>	Más de mil	a
<i>T_andinense</i>	9.603117e+02	a
<i>T_breve</i>	7.573384e+02	a
<i>T_harzianum</i>	2.380014e+02	a
<i>T_resei</i>	2.140224e+02	a
<i>T_lentiforme</i>	2.139229e+02	a

Realizado por: Paredes José, 2022

La prueba Tukey al 5% en diferentes aislados de *Trichoderma* (Tabla 8-4) manifestó un grupo determinado para todos los aislados, la cual no demuestra diferencia significativa ya que sus valores no varían en la dosis letal 50, el aislado *Trichoderma orientale* con mayor DL<sub>50</sub> mostrándose resistente al igual que el resto de especies de *Trichoderma* en estudio analizando que todos los aislados son resistentes al fungicida Boscalid.

#### 4.5. Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Sales de Cobre

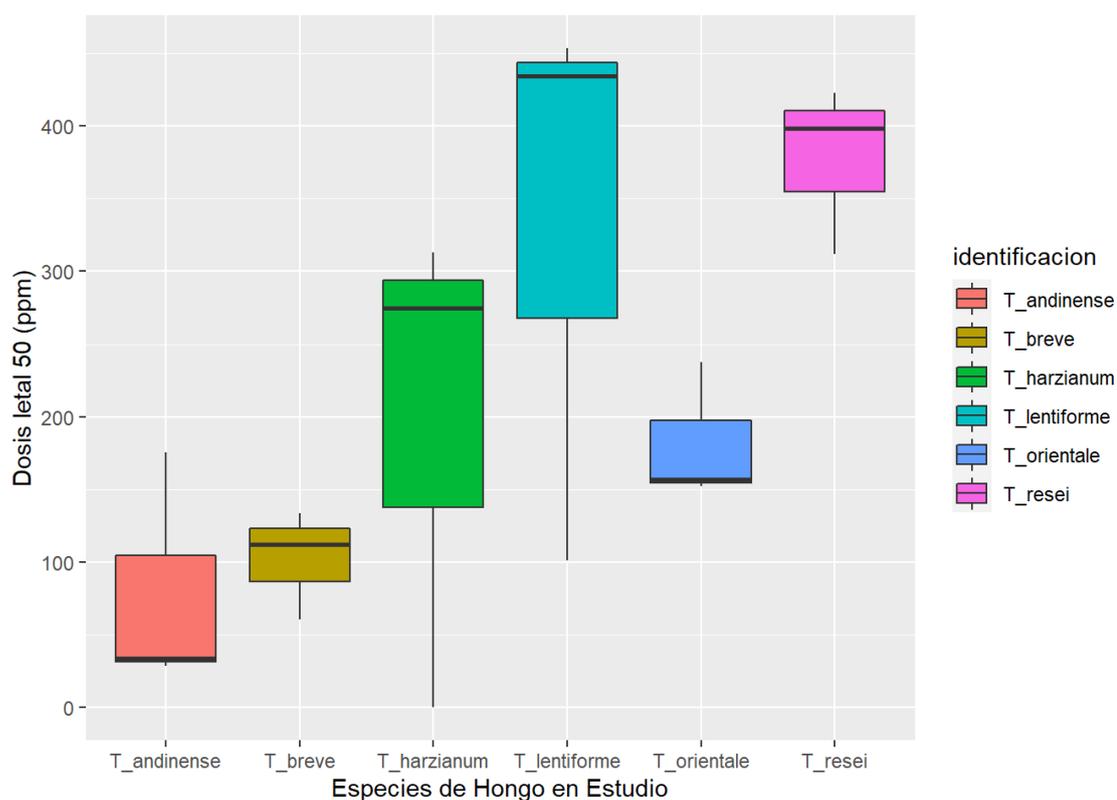


**Ilustración 9-4:** TCM de seis aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con Sales de Cobre en diferentes dosis

**Realizado por:** Paredes José, 2022

De acuerdo a la Ilustración 9-4, la Tasa de Crecimiento Micelial en la dosis 0 ppm (control), se puede observar que el aislado *Trichoderma lentiforme* presenta menor crecimiento, a diferencia de *Trichoderma orientale* con el mayor crecimiento, en la dosis 0,1 ppm quien obtuvo el menor crecimiento fue el aislado *Trichoderma orientale* y con el mayor crecimiento *Trichoderma breve*, mientras tanto en la dosis 1 y 10 ppm el menor crecimiento fue los aislados de *Trichoderma andinense* y con mayor crecimiento los aislados de *Trichoderma orientale*, por último la dosis 500 con un menor crecimiento en el aislado de *Trichoderma breve* mientras que el aislado *Trichoderma resei* con un mayor crecimiento micelial.

#### 4.5.1. Dosis letal ( $DL_{50}$ ) de Sales de cobre para los diferentes aislados de *Trichoderma*



**Ilustración 10-4:** DL<sub>50</sub> de Sales de Cobre para seis aislados de *Trichoderma*

Realizado por: Paredes José, 2022

El aislado *Trichoderma lentiforme* requiere mayor DL<sub>50</sub> de Sales de Cobre para su control, a diferencia del aislado *Trichoderma andinense* que requiere menor DL<sub>50</sub> de Sales de cobre para su control.

**Tabla 9-4:** Análisis de varianza para la DL<sub>50</sub> de diferentes aislados de *Trichoderma* enmendado con Sales de Cobre

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(>F)
Aislados	5	216088	43218	3,145	0,0482*
Error	12	164904	13742		

Realizado por: Paredes José, 2022

Códigos de significancias: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

El análisis de varianza (ANOVA), indicó que existe diferencia significativa en el factor estudiado con un valor de  $P=0,0482$  (Tabla 9-4).

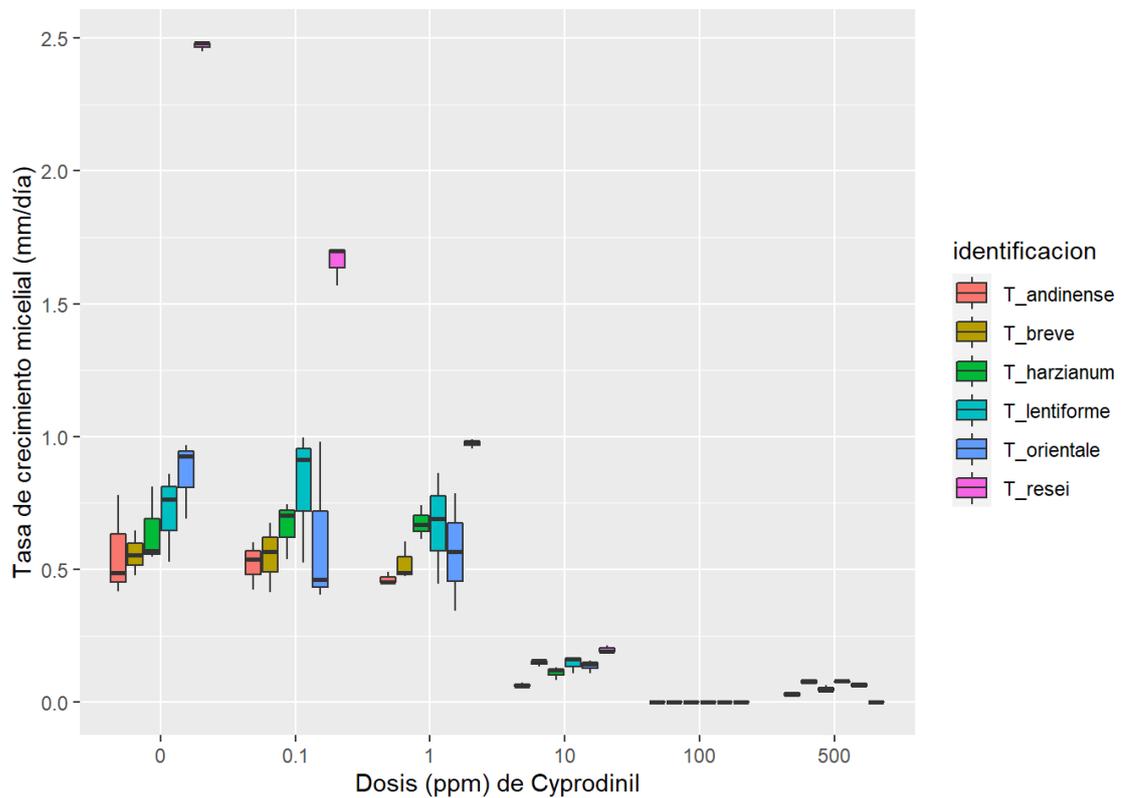
**Tabla 10-4:** Test de Tukey al 5% de la DL<sub>50</sub> de los seis diferentes aislados de *Trichoderma* con diferentes dosis de Sales de Cobre

Aislados	DL <sub>50</sub>	Rango de Significancia <sup>1</sup>
<i>T_resei</i>	377,59	a
<i>T_lentiforme</i>	329,61	a
<i>T_harzianum</i>	195,98	a
<i>T_orientale</i>	182,24	a
<i>T_breve</i>	102,19	a
<i>T_andinense</i>	79,41	a

Realizado por: Paredes José, 2022

La prueba Tukey al 5% en distintos aislados de *Trichoderma* (Tabla 10-4) presentó un solo rango de significancia para todos los aislados, mostrándose sin diferencias significativas en sus muestras donde los aislados de *Trichoderma resei*, *Trichoderma lentiforme*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma breve*, y *Trichoderma andinense* presentan resistencia debido a sus altos valores en la DL<sub>50</sub> considerando que todos los aislados son resistentes al principio activo Sales de Cobre.

#### 4.6. Tasa de crecimiento micelial de diferentes aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Cyprodinil

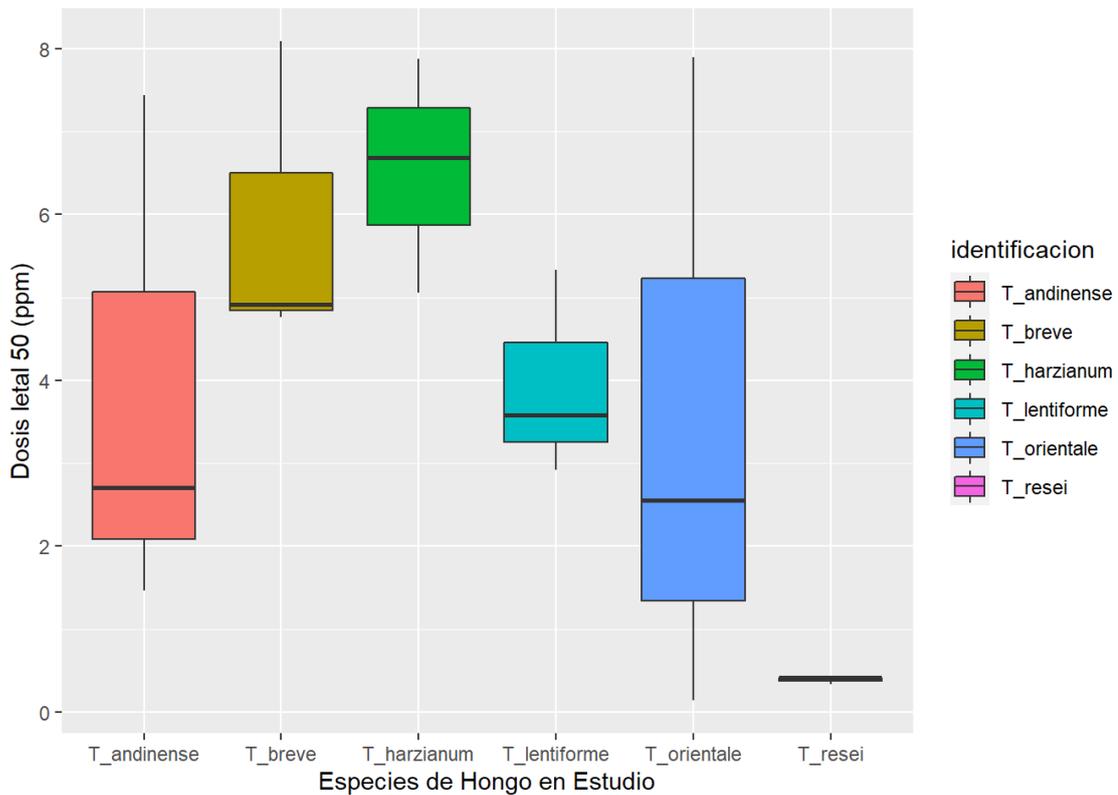


**Ilustración 11-4:** TCM de seis aislados de *Trichoderma* en medio PDA enmendado con Cyprodinil en diferentes dosis

**Realizado por:** Paredes José, 2022

De acuerdo a la Ilustración 11-4, la TCM en la dosis 0 ppm (tratamiento control) nos evidencia que el aislado perteneciente a *Trichoderma andinense* presenta un menor crecimiento, en comparación a su inverso el aislado *Trichoderma resei* con un evidente mayor crecimiento, por otro lado, en la dosis 0,1 ppm el aislado que obtuvo un menor crecimiento fue *Trichoderma orientale* y con mayor crecimiento micelial *Trichoderma resei*, mientras tanto en la dosis 1 y 10 ppm los aislados con menor crecimiento fueron los de *Trichoderma andinense*, opuesto a los aislados de *Trichoderma resei* quienes obtuvieron un mayor crecimiento; finalmente en las dosis 100 y 500 ppm en donde los aislados no obtuvieron un crecimiento significativo.

#### 4.6.1. Dosis letal ( $DL_{50}$ ) de Cyprodinil para los diferentes aislados de *Trichoderma*



**Ilustración 12-4:**  $DL_{50}$  de Cyprodinil para seis aislados de *Trichoderma*

Realizado por: Paredes José, 2022

El aislado *Trichoderma harzianum* requiere mayor  $DL_{50}$  de Cyprodinil para su control, a diferencia del aislado *Trichoderma resei* que requiere menor  $DL_{50}$  de Cyprodinil para su control.

**Tabla 11-4:** Análisis de varianza para la  $DL_{50}$  de diferentes aislados de *Trichoderma* enmendado con Cyprodinil

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	PR(>F)
Aislados	5	70,29	14,058	2,574	0,0834
Error	12	65,53	5,461		

Realizado por: Paredes José, 2022

Códigos de significancias: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

El análisis de varianza (ANOVA), indicó que existe diferencia significativa en el factor estudiado con un valor de  $P=0,0834$  (Tabla 11-4).

**Tabla 12-4:** Test de Tukey al 5% de la DL<sub>50</sub> de los seis diferentes aislados de *Trichoderma* con diferentes dosis de Cyprodinil

Aislados	DL <sub>50</sub>	Rango de Significancia <sup>1</sup>
<i>T_harzianum</i>	6,54	a
<i>T_breve</i>	5,92	a
<i>T_lentiforme</i>	3,94	a
<i>T_andinense</i>	3,86	a
<i>T_orientale</i>	3,53	a
<i>T_resei</i>	0,38	a

Realizado por: Paredes José, 2022

La prueba Tukey al 5% en distintos aislados de *Trichoderma* (Tabla 12-4) presentó un grupo concreto para todos los aislados, donde es evidente que el aislado *Trichoderma harzianum* con una mayor DL<sub>50</sub> con el rango de levemente resistente por su valor calculado a diferencia de la especie *Trichoderma andinense*, con un menor valor en la DL<sub>50</sub>, considerando que el mismo es sensible al principio activo Cyprodinil.

**Tabla 13-4:** Resumen de los resultados obtenidos

Principio activo	Aislados	DL <sub>50</sub>	Sensibilidad
<b>Azoxystrobin</b>	<i>T_breve</i>	398,32	Resiste
	<i>T_harzianum</i>	389,29	Resiste
	<i>T_andinense</i>	250,64	Resiste
	<i>T_orientale</i>	153,32	Resiste
	<i>T_lentiforme</i>	140,79	Resiste
	<i>T_resei</i>	26,43	Moderadamente resistente
<b>Tebuconazol</b>	<i>T_harzianum</i>	8,66	Levemente resistente
	<i>T_andinense</i>	3,27	Levemente resistente
	<i>T_lentiforme</i>	2,83	Levemente resistente
	<i>T_orientale</i>	1,04	Levemente resistente
	<i>T_resei</i>	0,52	Sensible
	<i>T_breve</i>	0,43	Sensible
<b>Tiofanato</b>	<i>T_orientale</i>	33,70	Moderadamente resistente
	<i>T_lentiforme</i>	23,42	Moderadamente resistente
	<i>T_andinense</i>	21,20	Moderadamente resistente
	<i>T_breve</i>	14,13	Moderadamente resistente

	<i>T_resei</i>	3,23	Levemente resistente
	<i>T_harzianum</i>	0,55	Sensible
<b>Boscalid</b>	<i>T_orientale</i>	Más de mil	Resistente
	<i>T_andinense</i>	9,60E+08	Resistente
	<i>T_breve</i>	7,57E+08	Resistente
	<i>T_harzianum</i>	2,38E+08	Resistente
	<i>T_resei</i>	2,14E+08	Resistente
	<i>T_lentiforme</i>	2,14E+08	Resistente
<b>Sales de Cobre</b>	<i>T_resei</i>	377,59	Resiste
	<i>T_lentiforme</i>	329,61	Resiste
	<i>T_harzianum</i>	195,98	Resiste
	<i>T_orientale</i>	182,24	Resiste
	<i>T_breve</i>	102,19	Resiste
	<i>T_andinense</i>	79,41	Resiste
<b>Cyprodinil</b>	<i>T_harzianum</i>	6,54	Levemente resiste
	<i>T_breve</i>	5,92	Levemente resiste
	<i>T_lentiforme</i>	3,94	Levemente resiste
	<i>T_andinense</i>	3,86	Levemente resiste
	<i>T_orientale</i>	3,53	Levemente resiste
	<i>T_resei</i>	0,38	Sensible

Realizado por: Paredes José, 2022

#### 4.7. Discusión de resultados

Tanto Stefanova (2012, p. 510), como Infante (2009, pp. 14-21), en la literatura especializada sobre el género *Trichoderma*, plantean la compatibilidad del hongo para sobrevivir en sustancias con trazas y residuos de agroquímicos. Sin embargo, Franco y Orrego (2013, pp. 15-22) mencionan que cada cepa de *Trichoderma* puede presentar un nivel de tolerancia diferente. Como consecuente es importante estudiar las características individuales sobre los aislados nativos para su utilización endógena, que tendría como resultado una respuesta a futuro para el manejo integral de plagas con recursos locales.

En el presente estudio se comprobó la sensibilidad de los aislados de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma resei*, *Trichoderma andinense*, *Trichoderma orientale*, *Trichoderma lentiforme*, y *Trichoderma breve* ante los principios activos fúngicos Azoxystrobin, Tebuconazol, Tiofanato-

metil, Boscalid, Sales de Cobre, y Cyprodinil, los cuales aciertan en los ingredientes activos más utilizados para el control de enfermedades según su modo de acción (Frac, 2019, párr. 3).

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que el aislado de *Trichoderma resei* presenta baja sensibilidad y alta compatibilidad con los principios activos estudiados Según Atanasova et al. (2010, p. 7260), *Trichoderma resei* ha sido encontrado en suelos tropicales del sureste de Asia, Suramérica y regiones del sur del Pacífico, donde su reproducción es ideal entre los 25–30 °C. Druzhinina et al. (2010, p. 2), demostraron que *Trichoderma resei* es un antagonista moderado contra los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata* y *Botritis cinerea* y que se ha encontrado también en Centroamérica y Suramérica.

Por su parte como resultados de la compatibilidad de *T. harzianum* con los principios activos en estudio, estos se mostraron sobre la media, determinando que son eficientes para la combinación químico-biológica (*Trichoderma harzianum* + Fungicida químico) y se recomienda su uso en el manejo integrado de enfermedades. Esto concuerda con lo analizado por González y Pineda (2020, p. 96), que en su estudio de sensibilidad de *Trichoderma harzianum* ante dos fungicidas carbendazim y mancozeb obtuvo como resultado una alta tasa de compatibilidad ante dichos principios activos acertando efectivamente lo estudiado.

Existe la posibilidad, que la especie *Trichoderma harzianum* manifieste una disposición de poca sensibilidad y consecuente una alta compatibilidad con los fungicidas, de allí algunos de sus interesantes investigaciones en el ámbito biotecnológicos para el manejo y control de plagas y enfermedades (Infante et al., 2009, pp. 14-21). No obstante, esta peculiaridad no es una regla determinada, debido a que el origen de cada aislado limita algunas características genéticas como la resistencia y sensibilidad a la manifestación química tanto en patógenos como en antagonistas (Agris, 2005, pp. 117-121).

Finalmente, el aislado que presentó mayor resistencia a fungicidas de diferente modo de acción fue *Trichoderma andinense* el cual en el factor químico-biológica no presentó mayor crecimiento, siendo su combinación no recomendable en el manejo de enfermedades

## CONCLUSIONES

La tasa de crecimiento micelial (TCM) mostró diferencias evidentes entre los principios activos, la especie que mostró una alta resistencia y mayor crecimiento ante los diferentes principios activos fue *Trichoderma resei* siendo compatible con los productos de diferente modo de acción fúngicos investigados, seguido de *Trichoderma harzianum* que mostró un comportamiento similar ante la combinación química-biológica, los aislados antes mencionados se recomiendan en el manejo integral de enfermedades por su alta compatibilidad fúngica, por otro lado el aislado que presentó menor resistencia a diferentes fungicidas fue *Trichoderma andinense* evidenciando que su crecimiento fue bajo, el cual no es compatible con los principios activos estudiados.

Los principios activos Azoxystrobin, Sales de Cobre, y Boscalid tuvieron las mayores  $DL_{50}$ , para las seis especies de *Trichoderma* permitiendo el crecimiento micelial. Los principios activos Tebuconazol, Tiofanato-metil y Cyprodinil mostraron los menores valores de  $DL_{50}$  para las seis especies de *Trichoderma* con un menor crecimiento micelial respectivamente, y por lo tanto estos principios activos podrían utilizarse en combinación con los aislados de *Trichoderma* estudiados para el manejo integrado de enfermedades.

## **RECOMENDACIONES**

Efectuar estudios de sensibilidad de las especies *Trichoderma resei* y *Trichoderma andinense* con otros principios activos diferentes a los utilizados en esta investigación, ya que existe poca información referente a dichos aislados, con el propósito de generar información y proponer métodos de manejo integral de plagas y enfermedades

Implementar y evaluar la combinación de *Trichoderma* y principios activos estudiados a nivel de viveros forestales.

## GLOSARIO

**Auxinas:** Hormona vegetal que ayuda al crecimiento y desarrollo de la planta (AGRAN, 2012, párr. 1).

**Celulasas:** Enzima hidrolasa que realiza la hidrólisis de la celulosa en moléculas de glucosa libre (Nutritienda, 2009, párr. 8).

**Citoquininas:** O citosinas, son hormonas vegetales, fitohormonas, imprescindibles en la regulación del desarrollo y mantenimiento de los tejidos vegetales (Contreras, 2013, párr. 2).

**Conidióforos:** Similar a una célula conidiógena, término se emplea para referirse a una hifa corta o diversamente ramificada (Asturnatura, 2022, párr. 4).

**Esporangios:** Estructura en forma de cápsula o saco, presente en plantas y hongos, dentro de la cual se forman y se almacena las esporas reproductoras (Lifeder, 2019, párr. 3).

**Hifas:** Estructuras cilíndricas filamentosas que constituyen el cuerpo de los hongos multicelulares (Lifeder, 2022, párr. 2).

**Lectinas:** Proteínas presentes de forma natural en la mayor parte de vegetales y en algunos productos de origen animal (BBVAOPENMIND, 2017, pp. 4-10).

**Micelio:** Talo de los hongos, formado comúnmente de filamentos muy ramificados y que constituye el aparato de nutrición (RAE, 2022a, p. 45).

**Penachos:** Disposición de hojas o flores que salen de un punto común y que caen hacia un lado de la planta (Infojardin, 2020, p. 28).

**Proteasas:** Enzima que descompone proteínas en proteínas más pequeñas o unidades proteínicas más pequeñas (Clinicalinfo, 2015, p. 14).

**Saprófito:** Planta o microorganismo que se alimenta de materias orgánicas en descomposición (RAE, 2022b, p. 12).

## BIBLIOGRAFÍA

**AGRAN.** *Auxinas: ¿Qué son y para qué se utilizan?* [en línea]. Madrid-España: AGRAN, 2012. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://agran.es/auxinas-que-son-y-para-que-se-utilizan/>.

**AGRIOS, G.** *Efecto de Antagonistas y Extractos Vegetales en el Control de Protea Marchitamiento (F. oxysporum)* [en línea]. Londres-Inglaterra: Elsevier Inc., 2014, pp. 117-121. [Consulta: 02 agosto 2022]. ISBN: 0-12-044565-4. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=CnzbgZgby60C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Agrios,+G.+\(2005\).+Plant+Pathology.+Elsevier+Academic+Press.+Fifth+edition.+London.+UK.&ots=FrFksb0Emi&sig=1XtxcQtzXgd8W74oEXFxcXvql4#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=CnzbgZgby60C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Agrios,+G.+(2005).+Plant+Pathology.+Elsevier+Academic+Press.+Fifth+edition.+London.+UK.&ots=FrFksb0Emi&sig=1XtxcQtzXgd8W74oEXFxcXvql4#v=onepage&q&f=false).

**ÁLVAREZ, M.** *Tebuconazole* [en línea]. Chia-Colombia: DVA Group, 2020. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://dva.com.co/producto/tebuconazole/>.

**ARCE, J.** Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos agrícolas de Galápagos a diferentes hongos patógenos (Trabajo de integración curricular) (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Carrera Ingeniería Forestal. Riobamba-Ecuador. 2022, pp. 1-61.

**ASTURNATURA.** *Conidiófono* [en línea]. Diccionario de la naturaleza, 2022. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/naturaleza/diccionario/conidioforo-1341.html>.

**ATANASOVA, L.; et al.** “Clonal species *Trichoderma para reesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina/T. reesei*”. Applied and Environmental Microbiology [en línea], 2010, (Austria) 76(21), pp. 7259-7267. [Consulta: 01 agosto 2022]. ISSN: 0099-2240. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AEM.01184-10>.

**BBVAOPENMIND.** *Lectinas: el nuevo producto alimenticio bajo sospecha* [en línea]. BBVAOPENMIND, 2017. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://www.bbvaopenmind.com/ciencia/biociencias/lectinas-el-nuevo-producto-alimenticio-bajo-sospecha/>.

**CASTRO, Á.; & RIVILLAS, C.** *Trichoderma spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café* [en línea]. Chinchiná-Colombia: ©FNC-Cenicafé, 2012, pp. 7-15. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: [https://www.cenicafe.org/es/publications/Boletin\\_38\\_FINAL2014.pdf](https://www.cenicafe.org/es/publications/Boletin_38_FINAL2014.pdf).

**CHIRIBOGA, H.; et al.** *Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades* [en línea]. Asunción-Paraguay: IICCA, 2015, pp. 2-20. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf;jsessionid=5D65A612D65B9D9548FEB0389BDF88D2?sequence=1>.

**CIATL**. *No renovación de la sustancia activa Metil Tiofanato en Unión Europea* [en línea]. 2020. [Consulta: 21 julio 2022]. Disponible en: [https://ciati.com.ar/?articulos\\_seccion\\_3/cat\\_4/id\\_92/no-renovaci%EF%BF%BDn-de-la-sustancia-activa-metil-tiofanato-en-uni%EF%BF%BDn-europea](https://ciati.com.ar/?articulos_seccion_3/cat_4/id_92/no-renovaci%EF%BF%BDn-de-la-sustancia-activa-metil-tiofanato-en-uni%EF%BF%BDn-europea).

**CLINICALINFO**. *Proteasa* [en línea]. ClinicalInfo, 2015. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://clinicalinfo.hiv.gov/es/glossary/proteasa>.

**CONTRERAS, R.** *Hormonas vegetales: Citoquininas* [en línea]. La guía de Biología, 2013. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/fisiologia-vegetal/hormonas-vegetales-citoquininas>.

**DC.ESPOCH**. *ESPOCH estudia el Trichoderma spp para disminuir el uso de químicos en producción agrícola* [en línea]. Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2022. [Consulta: 29 noviembre 2022]. Disponible en: <https://www.esepoch.edu.ec/index.php/component/k2/item/6188-esepoch-estudia-el-trichoderma-spp-para-disminuir-el-uso-de-qu%C3%ADmicos-en-producci%C3%B3n-agr%C3%ADcola.html>.

**DOMINGO, A.** *Conceptos básicos sobre disoluciones, concentraciones y diluciones* [en línea]. Cuaderno de Laboratorio, 2020. [Consulta: 12 junio 2022]. Disponible en: <https://cuadernolab.web.uah.es/web/tecnicas/disoluciones/>.

**DRUZHININA, I.; et al.** “Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it”. PLoS ONE [en línea], 2010, (Austria) 5(2), pp. 1-15. [Consulta: 20 julio 2022]. ISSN: 1932-6203. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0009191&type=printable>.

**FRAC.** *Modos de acción* [en línea]. Buenos Aires-Argentina: Frac, 2019. [Consulta: 02 agosto 2022]. Disponible en: <https://frac-argentina.org/modos-de-accion/>.

**FRAC Code List.** *Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on producto labels)* [en línea]. FRAC, 2022. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2).

**FRANCO, B.; & ORREGO, A.** “Compatibilidad in vitro de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas”. *Investigación Agraria* [en línea] 2013, (Paraguay) 15(1) pp. 15-22. [Consulta: 01 agosto 2022]. ISSN: 2305-0683. Disponible en: <https://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/2/2>.

**GARCÍA, H.; et al.** “Caracterización morfológica y molecular de cepas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*”. *Revista mexicana de fitopatología* [en línea], 2017, (México) 35(1), pp. 58-79. [Consulta: 10 junio 2022]. ISSN: 2007-8080. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v35n1/2007-8080-rmfi-35-01-00058.pdf>.

**GONZÁLEZ, H.; & PINEDA, M.** “Sensibilidad de una cepa nativa *Trichoderma harzianum* Rifai a dos fungicidas”. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* [en línea], 2020 (Venezuela) 5(2), pp. 95-100. [Consulta: 20 julio 2022]. ISSN: 1900-0863. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/353714672\\_Sensibilidad\\_de\\_una\\_cepa\\_nativa\\_Trichoderma\\_harzianum\\_Rifai\\_a\\_dos\\_fungicidas](https://www.researchgate.net/publication/353714672_Sensibilidad_de_una_cepa_nativa_Trichoderma_harzianum_Rifai_a_dos_fungicidas).

**GUIGÓN, C.; et al.** “Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos”. *Revista mexicana de fitopatología* [en línea], 2010, (México) 28(2), pp. 87-96. [Consulta: 11 junio 2022]. ISSN: 2007-8080. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092010000200002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092010000200002&script=sci_arttext).

**HERNÁNDEZ, D.; et al.** “*Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial”. *Chil. J. agric. Anim. Sci.* [en línea], 2019 (México) 35(1), pp. 98-112. [Consulta: 20 julio 2022]. ISSN: 0719-3890. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902019005000205&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-38902019005000205&script=sci_arttext).

**INFANTE, D.; et al.** “Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos”. Revista de Protección de Vegetal [en línea], 2009, (Cuba) 24(1), pp. 14-21. [Consulta: 10 junio 2022]. ISSN: 2224-4697. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>.

**INFOJARDIN.** *Penacho – definición* [en línea]. Infojardin, 2020. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://www.infojardin.com/glosario/peciolado/penacho.htm>.

**IQVAGRO.** *El descubrimiento de las propiedades fungicidas del Cobre se remonta a fines del siglo XIX* [en línea]. Barcelona-España: Matholding group, 2019. [Consulta: 20 de julio 2022]. Disponible en: <https://iqvagro.es/cobre/>.

**LIFEDER.** *Hifas* [en línea]. Lifeder, 2019. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/hifas/>.

**LIFEDER.** *Esporangio: características, partes y funciones* [en línea]. Lifeder, 2022. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/esporangio/>.

**MASQUIZA, C.** Caracterización morfológica y molecular de hongos asociados a la rizosfera de plantas de café en la isla Santa Cruz–Galápagos (Trabajo de titulación) (Ingeniería) [en línea]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Carrera de Ingeniería Agronómica. Quito-Ecuador. 2019, pp.1-41. [Consulta: 13 noviembre 2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18721/1/T-UCE-0004-CAG-093.pdf>.

**MARTÍNEZ, D.; et al.** “Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera”. Anales de Biología [en línea], 2015, (Argentina) 37(1), pp. 1-10. [Consultado 11 junio 2022]. ISSN: 1989-2128. Disponible en: [https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/37/PDF/37\\_2015\\_01.pdf](https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/37/PDF/37_2015_01.pdf).

**MCGRATH, M.** *What are Fungicides. The Plant Health Instructor* [en línea]. St. Paul-Estados Unidos: The American Phytopathological Society (APS), 2004. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/Fungicides.aspx>.

**MESA, A., et al.** “Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas”. Actualidades Biológicas [en línea], 2019, (Colombia) 41(111), pp. 32-44. [Consulta: 10 junio 2022]. ISSN: 2145-7166. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/341271/pdf>.

**MONTE, E.; & LLOBELL, A.** *V Congreso Mundial del Aguacate* [en línea]. Madrid-España: Newbiotechnic, 2013, pp. 725-733. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: [http://avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5\\_p725.pdf](http://avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p725.pdf).

**MONTESINOS, E.** “La resistencia a fungicidas y bactericidas. factores de riesgo asociados al mecanismo de acción y al potencial evolutivo del patógeno”. *Phytohemeroteca* [en línea], 2005, (España) 173(1), párr. 1-17. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/173-noviembre-2005/la-resistencia-a-fungicidas-y-bactericidas-factores-de-riesgo-asociados-al-mecanismo-de-accion-y-al-potencial-evolutivo-del-patgeno>.

**MUKHERJEE, P.; et al.** “*Trichoderma* Research in the Genome Era”. *Annual Review of Phytopathology* [en línea], 2013, (India) 51(1), pp. 105-129. [Consulta: 10 junio 2022]. ISSN: 1545-2107. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/51716120\\_Secondary\\_metabolism\\_in\\_Trichoderma\\_-\\_A\\_genomic\\_perspective](https://www.researchgate.net/publication/51716120_Secondary_metabolism_in_Trichoderma_-_A_genomic_perspective).

**NCBI.** *Trichoderma sp.* [en línea]. Bethesda-Estados Unidos: Centro Nacional para la Información Biotecnológica, 2020. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1715253>.

**NUTRITIENDA.** *¿Pará que sirve la Celulada? Beneficios y propiedades* [blog]. Nutritienda, 2009. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://blog.nutritienda.com/celulasa/>.

**PÉREZ, W.; & FORBES, G.** *¿Qué es un fungicida?* [en línea]. Lima-Perú: Centro Internacional de la Papa, 2018, p. 1. [Consulta: 10 junio 2022]. ISBN: 978-92-9060-320-7. Disponible en: <https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/documents/2018sept3queesunfungicida.pdf>

**RAE.** *Micelio* [en línea]. Madrid-España: Real Academia Española, 2022a. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://dle.rae.es/micelio>.

**RAE.** *Saptófito* [en línea]. Madrid-España: Real Academia Española, 2022b. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <https://dle.rae.es/saprofito>.

**SÁNCHEZ, L.; & ANDRADE, A.** Determinación de la concentración letal media (CL50-96) del cianuro, por medio de bioensayos sobre alevinos de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Trabajo de titulación) (Ingeniería) [En línea]. Universidad de la Salle, Facultad de Ingeniería

Ambiental y Sanitaria. Bogotá-Colombia. 2009, p. 35. [Consulta: 11 junio 2022]. Disponible en: [https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1584&context=ing\\_ambiental\\_sanitaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1584&context=ing_ambiental_sanitaria).

**SÁNCHEZ, M.; et al.** “Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aislados de suelos de importancia agrícola”. Revista de Ciencias y Tecnología El Higo [en línea], 2021, (Nicaragua) 11(1), pp. 26-42. [Consulta: 10 junio 2022]. ISSN: 2413-1911. Disponible en: <https://www.camjol.info/index.php/elhigo/article/view/11715/13542>.

**STEFANOVA, M.; et al.** “Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo”. Revista De La Facultad De Agronomía De La Universidad Del Zulia [en línea], 2012, (Cuba) 16(5), pp. 509-516. [Consulta: 01 agosto 2022]. ISSN: 0378-7818. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26280/26905>.

**SYNGENTA.** *Cyprodinil* [en línea]. 2019. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: [https://www.syngenta.com.mx/sites/g/files/zhg501/f/media/2019/09/09/switch\\_62.5\\_wg.pdf?token=1568059751](https://www.syngenta.com.mx/sites/g/files/zhg501/f/media/2019/09/09/switch_62.5_wg.pdf?token=1568059751).

**SYNGENTA CROP PROTECTION.** *Amistar top* [en línea]. 2022. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: [https://www.syngenta.com.ec/sites/g/files/zhg486/f/ec\\_ficha\\_tecnica\\_amistar\\_top\\_marz17.pdf?token=1535984039](https://www.syngenta.com.ec/sites/g/files/zhg486/f/ec_ficha_tecnica_amistar_top_marz17.pdf?token=1535984039).

**TERRALIA.** *Azoxistrobin* [en línea]. Madrid-España: Ediciones Agrotécnicas S.L., 2018a. [Consultado: 20 julio 2022]. Disponible en: [https://www.terralia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/view\\_trade\\_mark?book\\_id=1&trademark\\_id=14193](https://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_trade_mark?book_id=1&trademark_id=14193).

**TERRALIA.** *Boscalid* [en línea]. Madrid-España: Ediciones Agrotécnicas S.L., 2018b. [Consultado: 20 julio 2022]. Disponible en: [https://www.terralia.com/vademecum\\_de\\_productos\\_fitosanitarios\\_y\\_nutricionales/view\\_composition?book\\_id=1&composition\\_id=694](https://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/view_composition?book_id=1&composition_id=694)

**TOLEDO, A.** *Vademécum agrícola* [en línea]. 5ta Edición, Quito-Ecuador: Edifarm, 2018, p. 409. [Consulta: 21 julio 2022]. Disponible en: [https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm\\_quickagro/pdfs/productos/THIOFANATO%20METIL](https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/THIOFANATO%20METIL)

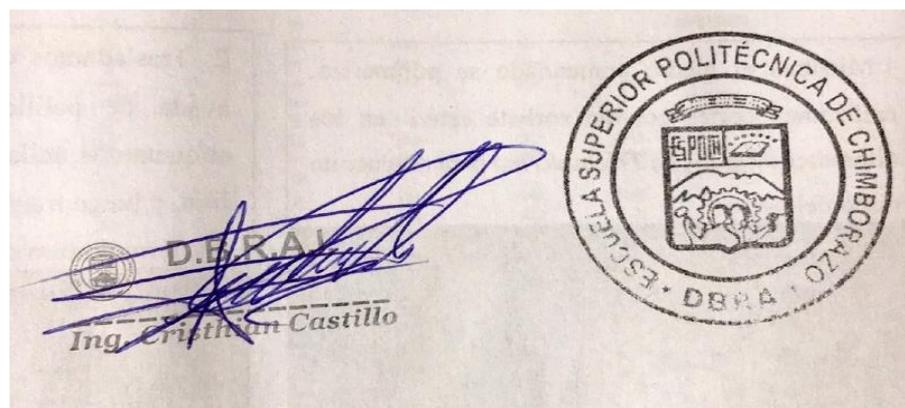
%2070%20WP%20&%2361474%3B%20NOVAK%AE%2050%25%20SC-20181107-100823.pdf.

**TOVAR, J.** Evaluación de la capacidad antagonista “*in vitro*” de aislamientos de *Trichoderma* sp. frente al hongo fitopatogeno *Rhizoctonia solani* (Trabajo de titulación) (Microbiología) [en línea]. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Escuela de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá-Colombia. 2008, pp. 18-21. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8951/tesis98.pdf?sequence=1>.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA.** *Tebuconazol* [en línea]. Heredia-Costa Rica: Universidad Nacional de Costa Rica, 2022. [Consulta: 20 julio 2022]. Disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/513-tebuconazol>.

**UTRILLA, G.** *Trichoderma* sp. como alternativa frente a los agroquímicos (Trabajo de titulación) (Ingeniería) [en línea]. Universidad Científica del Sur, Facultad de Ciencias Ambientales, Carrera profesional de Ingeniería Ambiental. Lima-Perú. 2021, pp. 9-10. [Consulta: 10 junio 2022]. Disponible en: <https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1873/TB-Utrilla%20G.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

**YUMBO, Y.** Sensibilidad *in vitro* de *Neoscytalidium* spp. agente causal del cáncer de la pitahaya a fungicidas de diferentes modos de acción (Trabajo de integración curricular) (Ingeniería) [en línea]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Carrera Agronomía. Riobamba-Ecuador. 2022, p. 33. [Consulta: 12 junio 2022]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/16551/1/13T00983.pdf>.



## ANEXOS

### ANEXO A: PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA CON FUNGICIDAS EN SUS RESPECTIVAS DOSIS

1. Preparación de medio de cultivo PDA 40g por cada envase de 1000mL



2. Preparación de las dosis calculadas (500; 100; 10; 1; 0,1; 0 ppm)



3. Colocar la cantidad necesaria de medio de PDA, al igual que la cantidad de solución del fungicida dependiendo la dosis en el medio



4. Dispensamos el medio enmendado en las cajas petri y las dejamos en la cámara de flujo laminar hasta que se gelifique el medio



### ANEXO B: SIEMBRA DE LOS DISCOS DE MICELIO CON AISLADOS DE *Trichoderma* EN LAS CAJAS PETRI ENMENDADO CON FUNGICIDAS

1. Mientras el medio enmendado se polimeriza, realizamos cortes con un sorbete estéril en los diferentes aislados de *Trichoderma* para obtener un disco del hongo

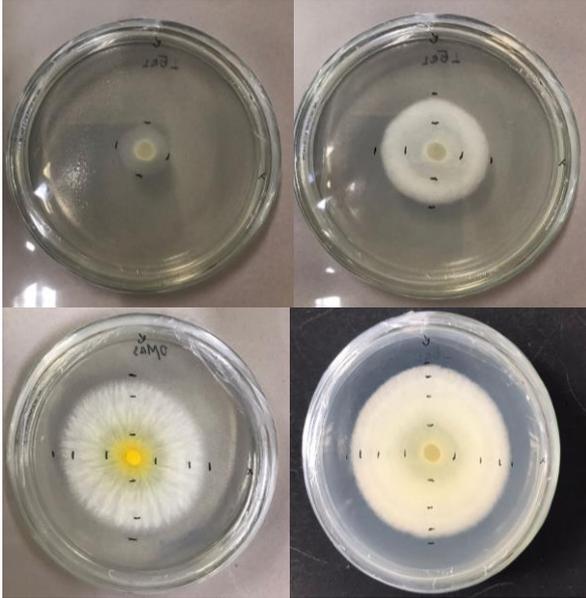


2. Trasladamos con mucho cuidado y con ayuda de palillos al medio enmendado, etiquetamos, sellamos envolviendo con papel film, y luego transportamos a la incubadora a una temperatura de 25+2 °C



## ANEXO C: RECOLECCIÓN DE DATOS

1. Toma de datos cada 24; 48; 72; y 96 horas



2. Medición del crecimiento micelial de *Trichoderma* con la ayuda de un calibrador digital

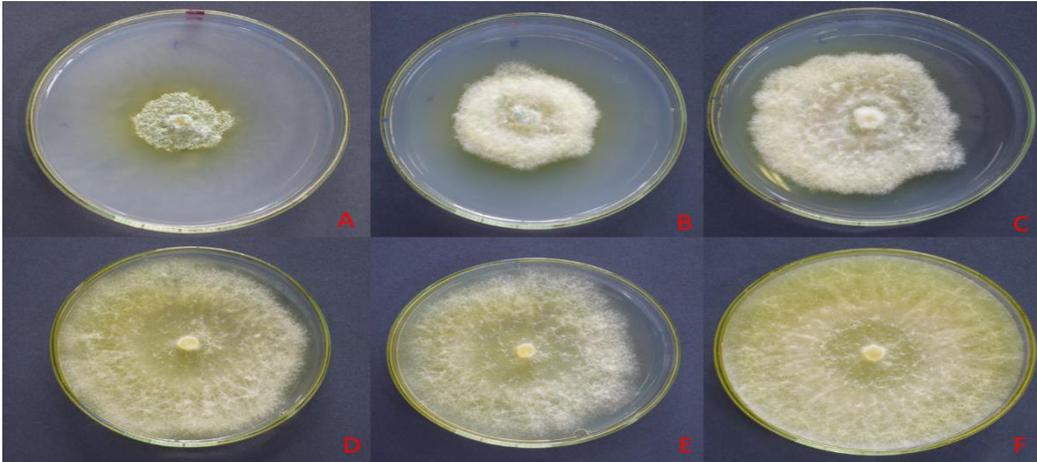


3. Clasificación de los datos de acuerdo al principio activo, concentración y diferentes parámetros estudiados

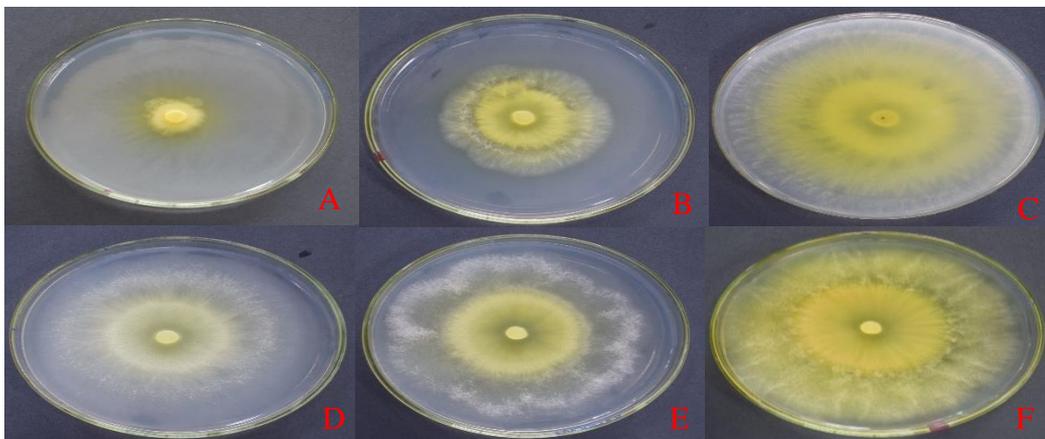
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
principio activo	cepa	identificación	dosis	repetición	tiempo(horas)	diametro_H_(mm)	diametro_V_(mm)	diametro_M	ta de crecimiento mical	inhibición
1	azoxystrobin	y	500	1	24	17,2	17,2	17,2		
2	azoxystrobin	y	500	1	48	23,7	21,5	22,6		
3	azoxystrobin	y	500	1	72	29,6	25,4	27,5		
4	azoxystrobin	y	500	1	96				0,214583333	
5	azoxystrobin	y	500	2	24	13	11,6	12,3		
6	azoxystrobin	y	500	2	48	24,4	22,6	23,5		
7	azoxystrobin	y	500	2	72	27,5	27,3	27,4		
8	azoxystrobin	y	500	2	96				0,314583333	
9	azoxystrobin	y	500	3	24	12,9	11,4	12,15		
10	azoxystrobin	y	500	3	48	24,7	21,2	22,95		
11	azoxystrobin	y	500	3	72	29,8	24,7	27,25		
12	azoxystrobin	y	500	3	96				0,314583333	
13	azoxystrobin	y	100	1	24	17,5	16,1	16,8		
14	azoxystrobin	y	100	1	48	32,4	30,6	31,5		
15	azoxystrobin	y	100	1	72	39,3	38,1	38,7		
16	azoxystrobin	y	100	1	96				0,45625	
17	azoxystrobin	y	100	2	24	17,1	15,8	16,45		
18	azoxystrobin	y	100	2	48	33,9	30,7	32,3		
19	azoxystrobin	y	100	2	72	42,8	38,6	40,7		
20	azoxystrobin	y	100	2	96				0,505208333	
21	azoxystrobin	y	100	3	24	17,5	14,6	16,05		
22	azoxystrobin	y	100	3	48	31,8	30,2	31		
23	azoxystrobin	y	100	3	72	40	38,5	39,25		
24	azoxystrobin	y	100	3	96				0,483333333	
25	azoxystrobin	v	100	3	96					

**ANEXO D: CRECIMIENTO DE LOS 6 AISLADOS DE *Trichoderma* CON EL PRINCIPIO ACTIVO AZOXYSTROBIN**

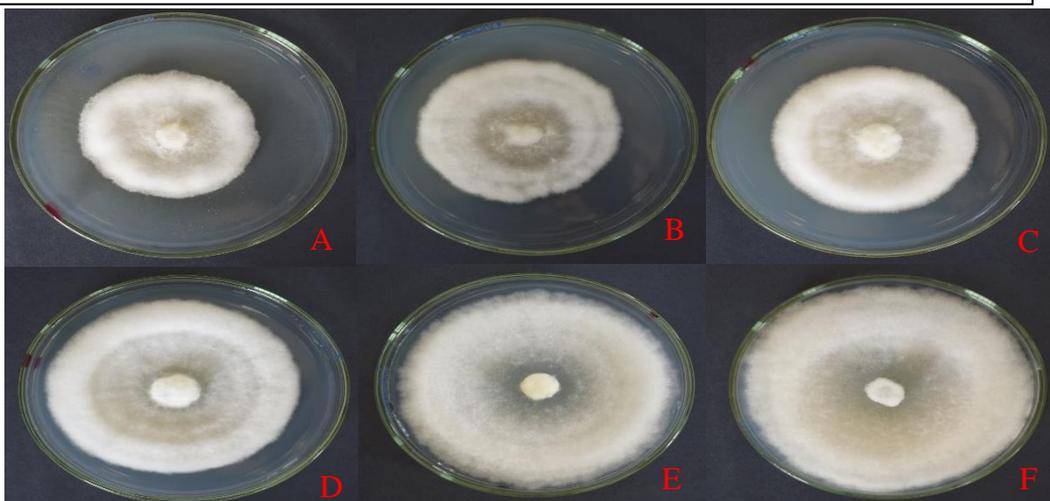
1. *Trichoderma resei* (y). A) dosis 500 B) dosis 100 C) dosis 10 D) dosis 1 E) dosis 0,1 F)



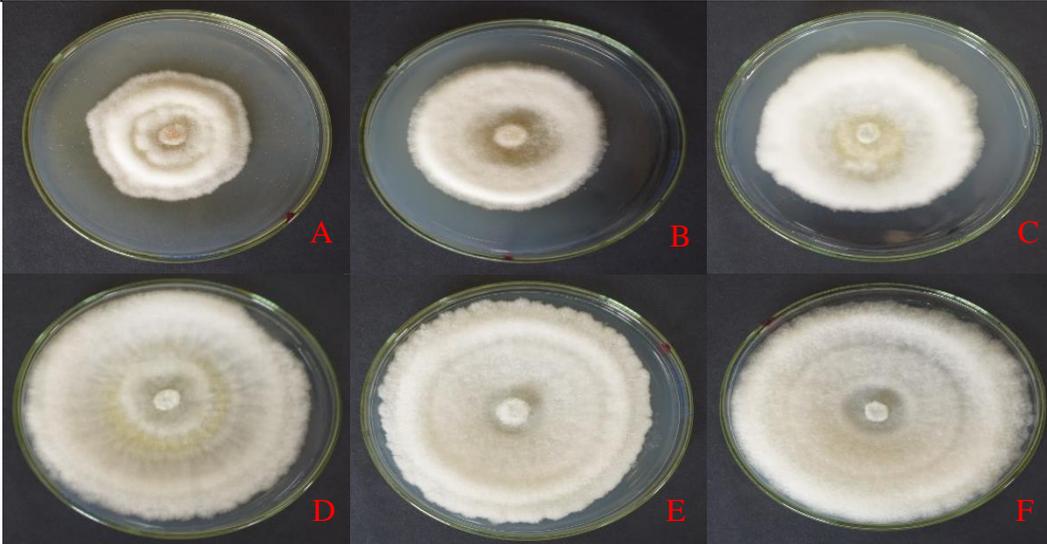
2. *Trichoderma orientale* (O). A) dosis 500 B) dosis 100 C) dosis 10 D) dosis 1 E) dosis 0,1 F) Testigo



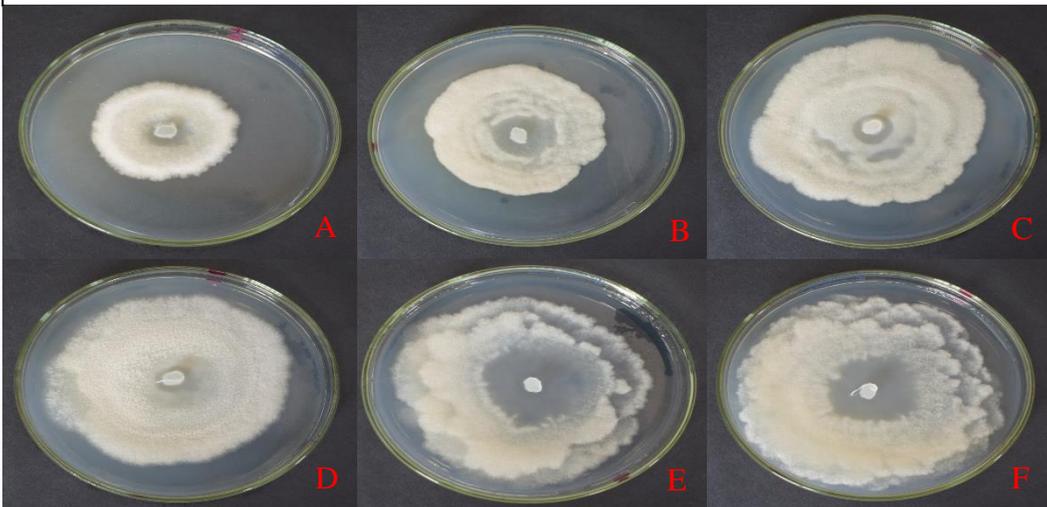
3. *Trichoderma harzianum* (M). A) dosis 500 B) dosis 100 C) dosis 10 D) dosis 1 E) dosis 0,1 F) Testigo



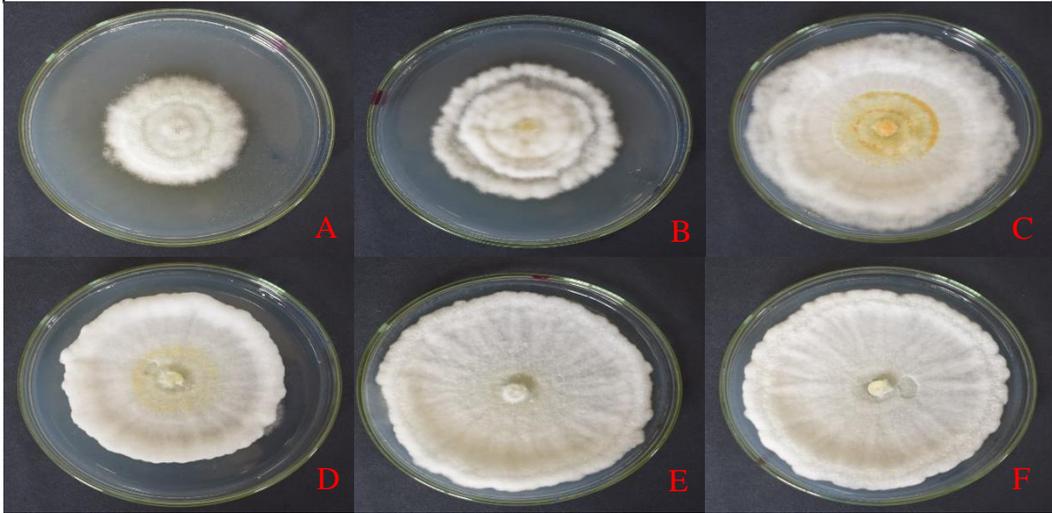
4. *Trichoderma breve* (E). A) dosis 500 B) dosis 100 C) dosis 10 D) dosis 1 E) dosis 0,1 F) Testigo



5. *Trichoderma andinense* (R). A) dosis 500 B) dosis 100 C) dosis 10 D) dosis 1 E) dosis 0,1 F) Testigo



5. *Trichoderma lentiforme* (H). A) dosis 500 B) dosis 100 C) dosis 10 D) dosis 1 E) dosis 0,1 F) Testigo





epoch

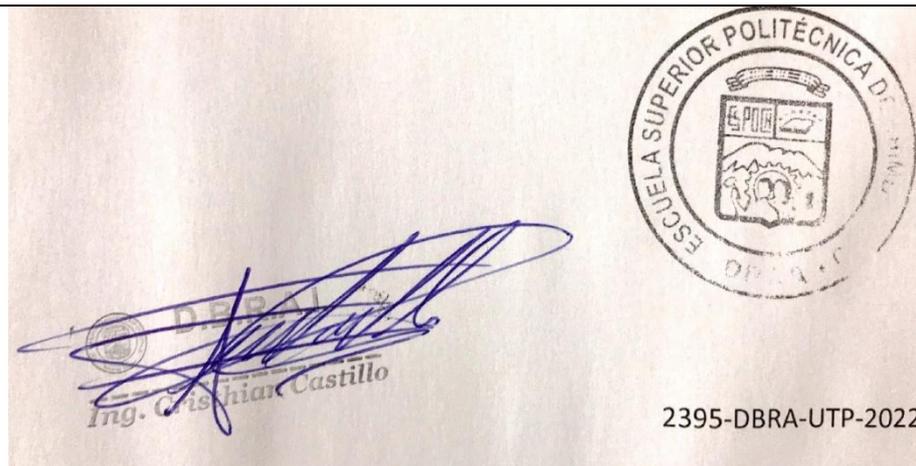
Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 16 / 12 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> José Eduardo Paredes Espín
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Recursos Naturales
<b>Carrera:</b> Ingeniería Forestal
<b>Título a optar:</b> Ingeniero Forestal
<b>f. responsable:</b> Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



2395-DBRA-UTP-2022