



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE ESPECIES DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE SUELOS FORESTALES A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA FORESTAL

AUTORA: ERIKA LISBETH IZURIETA CHERREZ

DIRECTOR: Ing. JUAN HUGO RODRIGUEZ GUERRA MSc.

Riobamba – Ecuador

2021

©2021, Erika Lisbeth Izurieta Cherrez

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

Yo, ERIKA LISBETH IZURIETA CHERREZ, 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 autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 08 noviembre, 2021


A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Erika Lisbeth Izurieta Cherez', with a stylized flourish extending to the right.

Erika Lisbeth Izurieta Cherez

180489698-1

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECUSOS NATURALES
CARRERA INGENIERÍA FORESTAL

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación. **SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE ESPECIES DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE SUELOS FORESTALES A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN**, realizado por la señorita **ERIKA LISBETH IZURIETA CHERREZ**, 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.

	FIRMA	FECHA
Ing. Armando Esteban Espinoza Espinoza PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: ARMANDO ESTEBAN ESPINOZA ESPINOZA	17-11-2021
Ing. Juan Hugo Rodríguez Guerra MSc. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	JUAN HUGO RODRIGUEZ GUERRA Firmado digitalmente por JUAN HUGO RODRIGUEZ GUERRA Fecha: 2021.11.17 13:35:10 -05'00'	17-11-2021
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	PABLO ISRAEL ALVAREZ ROMERO Firmado digitalmente por PABLO ISRAEL ALVAREZ ROMERO	17-11-2021

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad y amor ha estado conmigo durante el caminar de mi vida.

A mis padres Hernán y Mirian 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 esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades.

A mi hermano Paul 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.

Erika Lisbeth Izurieta Cherez

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, quien me abrió las puertas de la enseñanza ayudándome a resolver los problemas que se han presentado durante mi formación académica formándome como un verdadero profesional lleno de virtudes y valores que día a día fueron fomentados

Quiero agradecer a mis tutores de la presente tesis, al Ingeniero Juan Hugo Rodríguez Guerra y al Dr. Pablo Israel Álvarez Romero, ya que ellos me enseñaron con gran virtud y paciencia nuevos conocimientos, por su paciencia, dedicación, motivación y criterio. Pues ustedes más allá de unos buenos docentes, se han convertido en amigos de los estudiantes. Gracias, han hecho fácil lo difícil.

Erika Lisbeth Izurieta Cherrez

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN.....	xiii
SUMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Aspectos generales de <i>Trichoderma</i> spp.....	4
1.1.1. <i>El género de Trichoderma</i>	4
1.2. Clasificación Taxonomía de <i>Trichoderma</i> spp.....	5
1.3. Características morfológicas de <i>Trichoderma</i> spp	5
1.4. Biología	6
1.5. Mecanismos de biocontrol.....	6
1.5.1. <i>Micoparasitismo</i>	7
1.5.1.1. <i>Crecimiento quimiotrófico</i>	7
1.5.1.2. <i>Reconocimiento</i>	7
1.5.1.3. <i>Adhesión y enrollamiento</i>	7
1.5.1.3. <i>Actividad lítica</i>	8
1.5.2. <i>Antibiosis</i>	8
1.5.3. <i>Competencia</i>	8
1.5.4. <i>Inducción de resistencia</i>	8
1.6. Fungicidas utilizados para el manejo de patógenos	9
1.6.1. <i>Fungicida Protectantes</i>	9
1.6.2. Fungicida Sistémicos	9
1.7. <i>Tiabendazol</i>	10
1.8. <i>Tebuconazol</i>	10
1.9. <i>Azoxystrobin</i>	10

1.10.	Fludioxonil.....	11
1.11.1.	<i>Modo de acción</i>	11
1.11.2.	<i>Clasificación</i>	11

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	13
2.1.	Materiales y métodos.....	13
2.1.1.	<i>Característica del lugar</i>	13
2.1.1.1.	<i>Localización</i>	13
2.2.	Materiales y Equipos	13
2.2.1.	<i>Materiales de laboratorio</i>	13
2.2.1.1.	<i>Equipos de laboratorio</i>	13
2.2.1.2.	<i>Reactivos e insumos</i>	13
2.2.1.3.	<i>Materiales y Equipos de oficina</i>	14
2.3.	METODOLOGÍA.....	14
2.3.1.	<i>Aislados de Trichoderma spp</i>	14
2.3.2.	<i>Dosis evaluadas de los diferentes Fungicidas</i>	15
2.3.3.	<i>Preparación del medio de cultivo PDA con fungicidas</i>	15
2.3.4.	<i>Siembra de Trichoderma harzianum y Trichoderma longibrachiatum</i>	15
2.3.5.	<i>VARIABLES evaluadas</i>	15
2.3.6.	<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i>	16

CAPITULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION	17
3.2.	Crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiabendazol	18
3.2.1.	<i>Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de Trichoderma harzianum y Trichoderma longibrachiatum en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiabendazol</i>	20
3.2.2.	<i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de los fungicidas de diferente modo de acción sobre....</i> <i>Trichoderma harzianum y Trichoderma longibrachiatum</i>	23

3.3.	Crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol	24
3.3.1.	<i>Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol.....</i>	<i>26</i>
3.3.2.	<i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de los fungicidas de diferente modo de acción sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i></i>	<i>28</i>
3.4.	Crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Azoxystrobin	30
3.4.1.	<i>Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA enmendado a diferentes dosis de Azoxystrobin</i>	<i>32</i>
3.4.2.	<i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de los fungicidas de diferente modo de acción sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i></i>	<i>34</i>
3.5.	Crecimiento micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Fludioxonil.....	36
3.5.1.	<i>Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA a las diferentes dosis de Fludioxonil.....</i>	<i>38</i>
3.5.2.	<i>Concentración letal 50 (CL₅₀) de los fungicidas de diferente modo de acción sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i></i>	<i>40</i>
	DISCUSIÓN	42
	CONCLUSIONES.....	44
	RECOMENDACIONES.....	45
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp.....	5
Tabla 2-1: Clasificación de los diferentes principios activos usados según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas.....	12
Tabla 3-2: Códigos de Aislados <i>Trichoderma</i> spp. de los diferentes fungicidas comparados en las dosis respectivas	16
Tabla 4-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> promedio y desviación estándar (sd).....	19
Tabla 5-3: Efecto de la dosis 0mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tiabendazol.....	21
Tabla 6-3: Efecto de la dosis 0,1 mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tiabendazol	21
Tabla 7-3: Efecto de la dosis 1mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tiabendazol.....	22
Tabla 8-3: Efecto de la dosis 10mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tiabendazol.....	22
Tabla 9-3: Efecto de la dosis 100mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tiabendazol	22
Tabla 10-3: Concentración letal (CL ₅₀) medios enmendados con concentraciones de Tiabendazol sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i>	23
Tabla 11:-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> promedio y desviación estándar (sd).....	25
Tabla 12-3: Efecto de la dosis 0mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tebuconazol.....	27
Tabla 13-3: Efecto de la dosis 0,1mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tebuconazol	27
Tabla 14-3: Efecto de la dosis 1mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tebuconazol.....	27
Tabla 15-3: Efecto de la dosis 10mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tebuconazol.....	28

Tabla 16-3: Efecto de la dosis 100mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tebuconazol	28
Tabla 17-3: Concentración letal (CL ₅₀) medios enmendados con concentraciones de Tebuconazol sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i>	29
Tabla 18-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> promedio y desviación estándar (sd)	31
Tabla 19-3: Efecto de la dosis 0mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Azoxystrobin.....	33
Tabla 20-3: Efecto de la dosis 0,1mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Azoxystrobin.....	33
Tabla 21-3: Efecto de la dosis 1mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Azoxystrobin.....	33
Tabla 22-3: Efecto de la dosis 10mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Azoxystrobin.....	34
Tabla 23-3: Efecto de la dosis 100mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Azoxystrobin	34
Tabla 24-3: Concentración letal (CL ₅₀) medios enmendados con concentraciones de Azoxystrobin sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i>	34
Tabla 25-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> promedio y desviación estándar (sd)	37
Tabla 26-3: Efecto de la dosis 0mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Fludioxonil.....	39
Tabla 27-3: Efecto de la dosis 0,1mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Fludioxonil	39
Tabla 28-3: Efecto de la dosis 1 mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Fludioxonil.....	39
Tabla 29-3: Efecto de la dosis 10mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Fludioxonil.....	40
Tabla 30-3: Efecto de la dosis 100mg/L en <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Fludioxonil	40
Tabla 31-3: Concentración letal (CL ₅₀) medios enmendados con concentraciones de Fludioxonil sobre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i>	40

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1-3: (A) Crecimiento micelial in vitro y (B) inhibición micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA enmendados con diferentes dosis de Tiabendazol	18
Gráfico 2-3: Tasa de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tiabendazol.....	20
Gráfico 3-3: (A) Crecimiento micelial in vitro y (B) inhibición micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA enmendados con diferentes dosis de Tiabendazol	24
Gráfico 4-3: Tasa de crecimiento diario de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Tebuconazol.....	26
Gráfico 5-3: (A) Crecimiento micelial in vitro y (B) inhibición micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA enmendados con diferentes dosis de Azoxystrobin.	30
Gráfico 6-3: Tasa de crecimiento diario de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Azoxystrobin.....	32
Gráfico 7-3: (A) Crecimiento micelial in vitro y (B) inhibición micelial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en medio PDA enmendados con diferentes dosis de Tiabendazol	36
Gráfico 8-3: Tasa de crecimiento diario de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> enmendados con Fludioxonil.....	38

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CON TIABENDAZOL A LAS DIFERENTES DOSIS.
- ANEXO B:** GELIFICACIÓN DE SOLUCIONES PARA SU POSTERIOR REPITE DE LOS DOS AISLADOS.
- ANEXO C:** SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARA EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO.
- ANEXO D:** SE REGISTRÓ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO ENMENDADOS CON CONCENTRACIONES DE TIABENDAZOL.
- ANEXO E:** PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON CONCENTRACIONES DE TEBUCONAZOL A LAS DIFERENTES DOSIS.
- ANEXO F:** SE REALIZÓ EL RESPECTIVO REPIQUE DE CADA UNO DE LOS AISLADOS.
- ANEXO G:** SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARA EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO.
- ANEXO H:** SE REGISTRÓ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO ENMENDADOS CON CONCENTRACIONES DE TEBUCONAZOL.
- ANEXO I:** PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON CONCENTRACIONES DE AZOXYSTROBIN A LAS DIFERENTES DOSIS.
- ANEXO J:** UNA VEZ SOLIDIFICADO EL MEDIO DE CULTIVO SE PRECEDIÓ AL REPIQUE DE CADA AISLADO.
- ANEXO K:** SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARÁ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO.
- ANEXO L:** SE REGISTRÓ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO EN MEDIO PDA ENMENDADOS CON CONCENTRACIONES DE AZOXYSTROBIN
- ANEXO M:** PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON FLUDIOXONIL PARA LAS DIFERENTES DOSIS
- ANEXO N:** SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARÁ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO
- ANEXO O:** CRECIMIENTO DE *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma harzianum*.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue analizar la sensibilidad de dos especies de hongos *Trichoderma* spp. (*T. harzianum* y *T. longibrachiatum*) aislados de suelos forestales a fungicidas de diferente modo de acción. Los principios activos fueron: tiabendazol, tebuconazol, azoxystrobin, fludioxonil, y las dosis fueron: 0;0,1;1;10;100 mg/L. Los experimentos se hicieron utilizando un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones en donde cada repetición constituida por una caja Petri. Para los análisis se utilizaron diagramas de cajas y bigote y las diferencias de las medias aritméticas fueron establecidas usando los intervalos de confianza al 95%. De los cultivos de los dos hongos de 10 días se tomaron discos de micelio de 5mm de diámetro y se los colocó en medio PDA con su respectivo fungicida, las cajas Petri fueron incubada a una temperatura de 24 ± 2 °C en condiciones de oscuridad. El diámetro micelial fue evaluado en dos direcciones (vertical y horizontal). Se realizó la estimación de concentración letal (CL50) que sirve para conocer la variabilidad entre aislados de una población para medir su potencia fungitóxica. Los resultados obtenidos demuestran que *T. longibrachiatum* presentan mayor tolerancia a los fungicidas de Tiabendazol, Tebuconazol en dosis de 0,1 y 1mg/L. *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* en presencia de Azoxystrobin presento mayor tolerancia en las dosis propuestas del presente ensayo *T. harzianum* presento mayor tolerancia a Fludioxonil en su totalidad, por lo que su inhibición fue de 0%. Por lo que concluimos que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* enmendados con concentración de Tiabendazol y Tebuconazol resultaron ser de alta fungitoxicidad por el contrario las concentraciones de Azoxystrobin y Fludioxonil resultaron sin fungitoxicidad. Por lo tanto, se recomienda efectuar estudios de compatibilidad en campo de los dos aislados con otros principios activos, para contrarrestar los impactos ambientales negativos que causa el uso exclusivo de pesticidas agrícolas.

Palabras clave: <*Trichoderma*>, < FUNGICIDAS>, <HONGO>, <CONCENTRACIÓN LETAL>, <CRECIMIENTO MICELIAL>, < SUELOS FORESTALES>, <ANTAGONISTA >.



Firmado electrónicamente por:
**CRISTHIAN FERNANDO
CASTILLO RUIZ**



2107-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the sensitivity of two species of *Trichoderma* spp. fungi (*T. harzianum* and *T. longibrachiatum*) isolated from forest soils to different modes of action. The active ingredients were: thiabendazole, tebuconazole, azoxystrobin, fludioxonil, and the doses were: 0;0.1;1;10;100 mg/L. The experiments were carried out using a completely randomized design with four replicates, each replicate consisting of a Petri dish. Box-and-whisker plots were used for the analyses and arithmetic mean differences were established using 95% confidence intervals. From the 10-day cultures of the two fungi, mycelial discs of 5 mm diameter were taken and placed in PDA medium with their respective fungicide, the Petri boxes were incubated at a temperature of $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ under dark conditions. The mycelial diameter was evaluated in two directions (vertical and horizontal). The estimation of lethal concentration (CL_{50}) was performed to determine the variability between isolates of a population to measure its fungitoxic potency. The results obtained show that *T. longibrachiatum* have greater tolerance to the fungicides Thiabendazole, Tebuconazole at doses of 0.1 and 1mg/L. *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* in the presence of Azoxystrobin presented greater tolerance in the proposed doses of the present trial. *T. harzianum* presented greater tolerance to Fludioxonil in its totality, so its inhibition was 0%. To conclude, the *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum* amended with concentration of Thiabendazole and Tebuconazole resulted to be of high fungitoxicity on the contrary the concentrations of Azoxystrobin and Fludioxonil resulted without fungitoxicity. Therefore, field compatibility studies of the two isolates with other active ingredients are recommended to counteract the negative environmental impacts caused by the exclusive use of agricultural pesticides.

Key words: <*Trichoderma*>, <FUNGICIDES>, <FUNGI>, <LETHAL CONCENTRATION>, <MICELL GROWTH>, <FOREST SOILS>, <ANTAGONIST>.



Firmado electrónicamente por:
**ELSA AMALIA
BASANTES ARIAS**

SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE ESPECIES DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE SUELOS FORESTALES A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN

INTRODUCCIÓN

Trichoderma spp. es un género de hongos que fue descrito hace 225 años para clasificar un hongo que descompone la madera y produce una gran cantidad de esporas verdes en los extremos de las hifas (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030). *Trichoderma* forma parte de un importante grupo de hongos que tiene un efecto antagónicos sobre microorganismos patógenos de plantas, por lo cual es aprovechado por el ser humano (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030).

La capacidad de producir metabolitos y su fácil adaptación a las condiciones ambientales también son características de este género de hongos (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030). Hay más de 250 especies de *Trichoderma* reconocidas actualmente, la mayoría de las cuales no viven en el suelo tienen una amplia distribución geográfica, pero tienen distribuciones específicas y están compuestas por parásitos Fúngicos macroscópicos y causan de pudrición de madera en bosques tropicales y temperados (Druzhinina et al. 2011, pp. 1–9).

Este fenómeno indica que la capacidad de parasitar otros hongos y de alimentarse de biomasa fúngica muerta representa las características ancestrales de este género, y es compartida por la mayoría de las especies (Kubicek et al. 2011, pp. 1–15).

Aunque, una clara diversidad fisiológica ocurrió durante el crecimiento de las especies de *Trichoderma*, y la capacidad de degradar materiales lignocelulósicos puede haber aparecido después de cambios del hospedero o ‘host jumps’ de basidiocarpos de hongos causantes de pudrición de madera para la propia madera. El apareamiento de host jumps de hongos que causan pudrición en la madera para micoparásitos también parece haber sucedido durante la evolución del género (Druzhinina et al. 2011; Chaverri y Samuels 2013, pp. 749-759).

Por otro lado, la colonización del medio edáfico parece ser más limitada a decenas de especies ambientales oportunistas, las cuales están altamente adaptadas a la vida y competición en el suelo y en la rizósfera y se encuentran distribuidas por toda la tierra (Druzhinina et al. 2011, pp. 1–9).

Las especies de *Trichoderma* consideradas oportunistas ambientales tienen algunas características fenotípicas comunes, como amplia distribución geográfica, un crecimiento rápido y colonización agresiva del suelo y los nichos de la rizósfera, y una gran capacidad de interactuar, por lo que

promueve el crecimiento e induce la resistencia a enfermedades abióticas y al estrés (Harman et al. 2004, pp. 43–56).

De esta manera la mayoría de las formas de *Trichoderma* aisladas, probadas y seleccionadas para el control biológico de enfermedades y promoción del desarrollo, en varias partes del mundo, pertenecen a un grupo limitado de especies (Woo et al. 2014, pp. 71–126).

Dentro de este contexto, el conocimiento generado de este grupo de hongos es esencial para el éxito en la elección de cepas eficientes y el uso seguro de *Trichoderma*.

PROBLEMA

El aumento de enfermedades en plantas ocasionadas por fitopatógenos ha permitido que se busque maneras de controlarlas. *Trichoderma* spp. es un hongo benéfico para las plantas que ha sido utilizado en la investigación de diversas enfermedades procedentes por hongos.

El impacto de los fungicidas en el manejo epidemiológico de la enfermedad, consiste en reducir la tasa epidemiológica, limitando el desarrollo del patógeno y de la enfermedad, sin embargo, hay que conocer las concentraciones adecuadas del producto y su reacción el saber accionar, es decir cuándo, cómo aplicarlos y alcanzar una mejor adaptabilidad con *Trichoderma* spp. para lograr un mejor control de enfermedades y a la vez reduciendo la contaminación de suelos.

Actualmente se desconoce de información relacionada sobre sensibilidad *in vitro* de especies de *Trichoderma* spp. a fungicidas de diferente modo de acción, lo que imposibilita la integración de estas dos formas de manejo integrado de enfermedades.

JUSTIFICACION

El actual estudio propone analizar la sensibilidad de especies de *Trichoderma* spp. obtenidos de suelos forestales a fungicidas de diferente modo de acción. Tomando en cuenta la importancia del hongo *Trichoderma* spp. como agente de control biológico y su integración con fungicidas de diferente modo de acción. Este estudio presenta una gran alternativa para la validación de diferentes productos que puedan utilizarse en conjunto con este antagonista microbiano para el manejo integrado de enfermedades.

Considerando, la ausencia de estudios sobre sensibilidad de especies de *Trichoderma* spp. a fungicidas el actual trabajo se enfocará en estudiar el manejo de estas do formas integradas y de esa

manera proponer información más precisa para el control de enfermedades y el nivel de resistencia a fungicidas por lo tanto se propone los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la sensibilidad *in vitro* de especies de *Trichoderma* spp. aislados de suelos forestales a fungicidas de diferente modo de acción.

Objetivos Específicos

- Determinar la tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medios de cultivo enmendados con fungicidas de diferente modo de acción.
- Establecer la concentración letal 50 (CL₅₀) de los fungicidas de diferente modo de acción sobre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula

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

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 *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Aspectos generales de *Trichoderma* spp.

Trichoderma es un hongo oportunista que presenta capacidad de colonizar diferentes sustratos sobre circunstancias ambientales muy diversas, posee un gran número de enzimas hidrolíticas encontradas en el Reino Fungi, adicionalmente tiene un método muy eficiente de reparación celular lo que le ha permitido desarrollarse en condiciones adversas. La exploración de la capacidad de *Trichoderma* para atacar otros hongos ha permitido el progreso de numerosos agentes de control biológico con eficacia en distintos sistemas productivos (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030).

En los últimos años son cada vez más habituales los estudios describiendo que *Trichoderma* origina el crecimiento de las plantas y la germinación de las plantas y la germinación de semillas, que estimula sistémicamente las defensas de las plantas frente a patógenos y también frente a estrés ambiental. Todo esto compone lo que puede ser llamado “efecto *Trichoderma*” (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030).

Como resultado de *Trichoderma* con las plantas, entran en juego diferentes sistemas de regulación de genes, hacen que las plantas respondan a los estímulos de *Trichoderma*, creciendo más y mejor, adaptándose a las condiciones óptimas del cultivo o defendiéndose por medio de mecanismos de resistencia sistémica. La exploración eficiente de las capacidades de biocontrol y de bioestimulación de *Trichoderma* dependerá de la capacidad de elegir las mejores cepas de este microorganismo y de la capacidad de crear las mejores condiciones de uso (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030).

1.1.1 El género de *Trichoderma*

Persoon 1794, propuso por primera vez como género a *Trichoderma* spp. siendo un hongo microscópico, filamentoso. Después Rifai en 1969 realizó el primer agrupamiento de especies adicionales que en nuestros días se sigue utilizando (Samuels et al. 2006, pp. 146-170) Actualmente se conocen 355 especies registradas (Kirk, 2019). Cabe señalar que su aislamiento es relativamente sencillo en medio de cultivo PDA (Howell 2003, pp. 4–10).

1.2. Clasificación Taxonomía de *Trichoderma* spp.

De acuerdo con el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés NCBI) (2019), el género *Trichoderma* spp. se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp.

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

Fuente: NCBI, 2019.

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2020.

1.3. Características morfológicas de *Trichoderma* spp.

(Samuels et al. 2006, pp. 146-170), señala que los rangos útiles para la caracterización e identificación en otros genero de hongos con frecuencia no son tan útiles para diferenciar especies de *Trichoderma*, generalmente debido al estrecho rango de variación de la morfología o porque los términos descriptivos para discernir la variación de color o patrón no son lo adecuadamente precisos, sin embargo las observaciones morfológicas son a menudo suficientes para la identificación de especies de hongo, al menos en la medida en que los taxones se han diferenciado morfológicamente de manera adecuada .

Los caracteres de ADN del genero *Trichoderma* se convirtieron en una herramienta para los análisis filogenéticos, por lo que las secuencias de múltiples genes se usan para inferir filogenias de taxones en todos los niveles, accediendo el reconocimiento de especies. Sin embargo, no todas las especies que caen dentro del concepto filogenético del género son morfológicamente similares (Samuels et al. 2006, pp. 146-170).

Trichoderma spp. es capaz de degradar sustratos complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros y emplearlos para su crecimiento gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinas y quitinas). Así mismo asimila como fuente de nitrógeno combinados como aminoácidos, urea, nitritos, amoniaco y sulfato de amonio, es un hongo con una

alta capacidad de tolerar un amplio intervalo de temperaturas y consecuentemente una amplia distribución ecológica (Agamez et al. 2008, pp. 23–34).

1.4. Biología

Hongos del género *Trichoderma* son saprófitos componentes activos de la micro biota del suelo, notificando de muchos procesos en ese ambiente. Este género es destacado por ser cosmopolita, encontrado en diversas partes del mundo (América, Europa, Asia, África y Oceanía).

El género *Trichoderma* puede ser encontrado tanto en regiones frías (ejemplo: *Trichoderma aureoviride*, presente apenas en el Reino Unido y Europa) como en regiones de clima tropical (ejemplo: *Trichoderma stromaticum* encontrado solamente en América) (Samuels et al. 2006, pp. 146-170). Existen también reportes de la presencia de *Trichoderma* spp, en escenarios extremas como en el suelo Antártico (Hughes, Bridge y Clark 2007, pp. 539–548).

Esta versatilidad de ocupar diferentes hábitats está relacionada con la plasticidad genética de individuos de ese género, permitiendo su sobrevivencia en diversas localidades y condiciones distintas (Benítez et al. 2004, pp. 249–260). Algunas cepas de *Trichoderma* pueden producir estructuras de resistencia como clamidósporas y microesclerocios, y con esto son capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables. Además, han sido obtenidas cepas de *Trichoderma* con permisible de biocontrol que crecen en altas temperaturas, suelos salinos o alcalinos y sobre condiciones de baja humedad.

Estos hongos se alimentan absorbiendo nutrientes por medio de sus hifas, es por eso que para poder atravesar la pared celular y utilizar los nutrientes, los sustratos de alto peso molecular exigen ser hidrolizados a moléculas más pequeñas, es por esa razón que los hongos liberan enzimas extracelulares que, cuando son más diversas y numerosas suministrarán más ventajas para que los hongos vivan en ambientes con diferentes condiciones (Meyer, m. c.; mazaró, s. m.; silva 2019, pp. 1024–1030).

1.5. Mecanismos de biocontrol

Las especies de género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el manejo de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su capacidad de ajuste a diferentes condiciones edafoclimáticas y su facilidad para ser aislada y cultivadas (Papavizas *et al.*, 1982).

Los principales mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. son:

Micoparasitismo, antibiosis, competencia e inducción de resistencia.

1.5.1. Micoparasitismo

El Micoparasitismo es definido como una simbiosis de tipo parasitismo entre organismos, totalmente están implicadas enzimas extracelulares como la quitinasa y celulosa que son parte de la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parásitos (Infante et al., 2009, pp. 14-21).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de Micoparasitismo crecen quimio tróficamente hacia el micelio del hospedante, se adhiere a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones la degradación de las paredes celulares del hospedante se observan en estos tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógenos (Infante et al., 2009, pp. 14-21). Durante el proceso complejo de la interacción antagonista- patógeno ocurren cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento adhesión – arrollamiento y actividad lítica (Infante et al., 2009, pp. 14-21).

1.5.1.1. Crecimiento quimiotrófico

El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia la estimulación química en el que hay una etapa de localización del hospedador y se ha demostrado que *Trichoderma* spp. Se puede detectar a distancia y sus hifas crecen en la dirección del patógeno en respuesta a un estímulo químico (Chet y Inbar 1994, pp. 37-43).

1.5.1.2. Reconocimiento

La molécula se reconoce en el género *Trichoderma* spp. y el anfitrión, esto se hace a través de interacciones lectinas- carbohidratos. Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y participan en la interacción entre componentes de la superficie celular y su entorno extracelular (Infante et al., 2009, pp. 14-21).

1.5.1.3. Adhesión y enrollamiento

Cuando la respuesta de reconocimiento e positiva las hifas de *Trichoderma* spp. se adhieren a la superficie del huésped a través la formación de estructuras parecidas a ganchos, y los envuelven bajo la medición de procesos enzimáticos (Infante et al., 2009, pp. 14-21).

1.5.1.3. Actividad lítica

La etapa ocurre la elaboración de enzimas líticas extracelulares principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Infante *et al.*, 2009, pp. 14-21).

1.5.2. Antibiosis

Es una interacción biológica que consiste en la imposibilidad de vivir de unos organismos en las inmediaciones de otros, debido a que estos segregan sustancias llamadas antibióticos o metabolitos tóxicos procedentes por un microorganismo sobre otro más sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el primordial mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el peligro de aparición de cepas de los patógenos resistentes al antibiótico. Algunas cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, de los cuales inhiben el progreso de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico y tales sustancias inhibitoras consideradas antibióticos (Infante *et al.*, 2009, pp. 14-21).

1.5.3. Competencia

Las características más relevantes del género *Trichoderma* es su capacidad de parasitar hongos. La habilidad de *Trichoderma virens* para enredarse, penetrar y destruir el contenido citoplasmático de *Rhizoctonia solani* ya fue estudiada hace mucho tiempo (Weindling 1932, pp. 837-845). Algunos estudios eco fisiológicos indicaron que, en mayor o menor escala todas las especies de *Trichoderma* son eficaces parásitos de hongos fitopatógenos y de oomicetos (Druzhinina, Shelest y Kubicek 2012, pp. 1–15).g

1.5.4. Inducción de resistencia

Trichoderma estimula de forma sistémica las defensas de las plantas frente al ataque de patógenos y ambientes edáficos y condiciones adversas, sin la necesidad de establecer contacto directo con el invasor o estar sometido a un estrés previo. Los patógenos atacantes más habitualmente controlados sistémicamente por el efecto *Trichoderma* son hongos filamentosos, oomicetos y bacterias (Shoresh, Harman y Mastouri 2010, pp. 21–43) a pesar que también se ven activadas las defensas frente a nemátodos (De Medeiros *et al.* 2017), insectos (M *et al.* 2017) y virus (Elsharkawy *et al.* 2013, p 193). Por lo tanto, las plantas no perciben *Trichoderma* como un enemigo.

Para alcanzar la condición de “amigo” de las plantas *Trichoderma* necesita desarrollar sus capacidades optimas, utilizar los exudados de la raíz (WA *et al.* 2008, pp. 1984–1985) y superar las respuestasiniciales de la defensa de las plantas (Morán-Diez *et al.* 2009, pp. 1021–1031). Las plantas son capaces de presentar respuestas inmunológicas altamente específicas y mantener una memoria duradera frente alataque de patógenos. La defensa activa se conoce como primera línea a respuesta inmune innata, que

entraen funcionamiento cuando las moléculas de los atacantes, conocidas como patrones moleculares asociados a microorganismos (microbe associated molecular patterns - MAMP), que son evolutivamente muy conservados (beta-glucanos y quitina de la pared celular de los hongos, flagelina y péptido-glucano de las bacterias, etc.), por receptores denominados receptor de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors - PRR), que están localizados en la membrana celular de cada célula vegetal. Igualmente, los PRR también responden a moléculas libres por la acción hidrolítica de los atacantes sobre los tejidos de la planta (ejemplos: oligómeros de la pared celular y restos cuticulares), que se conocen como patrones moleculares asociados al daño (damage-associated molecular patterns - DAMP).

Cuando se estimula un PRR (pattern recognition receptors) se genera una cascada de transducción de señales que dan lugar a una respuesta inmune conocida como inmunidad disparada por MAMPs (MAMP-triggered immunity - MTI). Como resultado, se produce la fortificación de las paredes celulares de la planta con la deposición de calosa y de lignina; la producción de metabolitos secundarios con acción antimicrobiana (Meyer, Mazaro y Silva 2019, pp. 1024–1030).

1.6. Fungicidas utilizados para el manejo de patógenos

El uso de fungicidas no es una práctica económica y ambientalmente sustentable ya que el uso excesivo de estos ha llevado a fuertes problemas ambientales (Wu et al., 2009). (Infante *et al.* 2009, pp. 14-21) menciona que el control químico es uno de los más utilizados y en la mayoría de los casos, causa severos daños al ambiente, su costo es elevado debido a que su control no es selectivo, esto afecta la sobrevivencia de microorganismos antagonistas.

Los fungicidas, herbicidas e insecticidas son plaguicidas que pueden ser sintéticos u obtenidos naturalmente utilizados en la protección de cultivos. Un fungicida es un plaguicida que interviene enfermedades fúngicas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad (McGrath 2004).

1.6.1. Fungicida Protectantes

Conocidos también como fungicidas de contacto, estos productos actúan solamente sobre la superficie de la planta donde el fungicida ha sido situado evitando que los propágulos de los organismos fúngicos germinen e ingresen a las células de los hospederos (Pérez y Forbes 2007, pp. 3–6).

1.6.2. Fungicida Sistémicos

Los fungicidas sistémicos son absorbidos a través del follaje o de las raíces y se congregan a toda la planta (Pérez López y Rodríguez Rodríguez 2019, pp. 334–344).

Entre los fungicidas que más se utilizan para el manejo de fitopatógenos se encuentra Tiabendazol, Tebuconazol, Azoxistrobin y Fludioxonilo (Tabla 2).

1.7. Tiabendazol

El Tiabendazol es un fungicida sistémico perteneciente al grupo de los benzimidazoles, de amplio espectro y eficaz frente a una gran variedad de hongos patógenos. Tiene acción como protectante y curativo. En relación a la planta: Tiabendazol tiene propiedades sistémicas. En relación al hongo: Tiabendazol tiene acción Protectantes (preventiva) y curativa. Actúa impidiendo la división celular del patógeno (Syngenta Crop Protection AG, 2014).

Inhibidor de la biosíntesis del ergosterol, inhibe una enzima que depende del citocromo P-450 responsable de la des metilación del ergosterol. Afecta a la permeabilidad celular del hongo.

También se ha visto que causa daño a la biosíntesis de los lípidos. Particularmente activo contra organismos resistentes a los benzimidazoles; Tiabendazol: Benzimidazol sistémico con actividad fungicida preventiva y curativa por contacto, de amplio campo de acción (MoA FRAC code 1). Absorbe por las raíces y hojas e impide la mitosis al unirse a la tubulina por lo que se altera el aumento del hongo. También actúa sobre algunos nematodos. En el suelo, su vida media puede oscilar de 33 y 120 días según condiciones de humedad y temperatura (De Liñán, C. 2012).

1.8. Tebuconazol

Modo acción: FRAC code 3

Pertenece al grupo químico Triazol sistémico con actividad fungicida preventiva, curativa y erradicativa. Influye sobre el proceso de biosíntesis del ergosterol en los hongos patógenos frenando la formación de las paredes celulares, pero Tebuconazol, en un paso posterior, impide la des hidrogenación con lo que también se produce una acumulación de otros esteroides. Por su actividad sistémica, facilita un buen control no sólo de las enfermedades presentes en la superficie externa de la semilla sino también de las que se localizan en su interior. En la planta se trasloca en sentido acrópeto, de forma que es bien absorbido por el vegetal y trasladado hacia los meristemas terminales en los que se acumula ligeramente (De Liñán, C. 2012).

1.9. Azoxystrobin

Modo acción: FRAC code 11

Fungicida sistémico con actividad traslaminar, efecto preventivo y curativo y traslocación acrópeta lenta, pero con distribución uniforme por toda la hoja. Tiene una buena actividad fungicida contra ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y oomicetos. Es un fuerte inhibidor de la germinación de esporas y, además, impide la evolución micelial y muestra una notable actividad antiesporulante.

impiden la respiración mitocondrial. Diversos estudios han demostrado que estos productos se enlazan en un determinado punto en los citocromos b. Ningún fungicida de uso corriente posee esta propiedad que elimina resistencias cruzadas entre los β -metoxiacrilatos y otras clases de fungicidas. Controla cepas de hongos patógenos resistentes a los inhibidores (De Liñán, C. 2012).

1.10. Fludioxonil

Modo acción: FRAC code 12

Pertenece al grupo químico Fenilpirrol con actividad fungicida por contacto, no sistémico, persistente, adecuado en aplicaciones foliares preventivas. Su estructura está directamente relacionada con el pirrolnitrin. Parece que su actuación bioquímica está ligada a los procesos de intercambios celulares dependientes de la membrana. Estimula la síntesis de glicerol, compuesto que regula la presión osmótica intercelular; su presencia en exceso interfiere con los mecanismos de intercambio celular dependientes de la membrana, en consecuencia, perturba el intercambio de materiales y bloquea el desarrollo de las células del hongo. Imposibilita fuertemente la germinación de las conidias, la formación del tubo germinativo, el incremento micelial y, al mismo tiempo, provoca una disminución instantánea de la absorción de los aminoácidos y azúcares. Es activo contra cepas de patógenos que han disminuido su sensibilidad a los benzimidazoles y Carboxamida. Es muy poco móvil en el suelo, siendo su vida media de 140-350 días. Es poco factible que su degradación produzca acumulación. Es muy difícil que contamine aguas subterráneas. No biodegradable (De Liñán, C. 2012).

1.11. Clasificación de los fungicidas de acuerdo a los modos de acción

1.11.1. Modo de acción

Los fungicidas inhabilitan el crecimiento del hongo afectando procesos celulares importantes. El modo de acción se refiere al proceso celular específico que inhibe cada fungicida en particular (Frac 2016).

1.11.2. Clasificación

La clasificación de los fungicidas de acuerdo a los modos de acción está basada en la resistencia y en los patrones de resistencia cruzada. El objetivo de la codificación de acuerdo al modo de acción, es asegurarse de un adecuado giro de productos para evitar en lo posible que los organismos fungosos generen resistencia a los fungicidas (Frac 2016).

Tabla 2-1: Clasificación de los diferentes principios activos usados según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas.

MODO DE ACCION	CÓDIGO Y PUNTO DE ACCIÓN	NOMBRE DE GRUPO	GRUPO QUIMICO	NOMBRE COMUN
1. Citoesqueleto 2. Proteína motora	B1 Ensamblaje de la β -tubulina en mitosis	Fungicidas MBC (metil Benzimidazol carbamatos).	Benzimidazoles	Tiabendazol
1. Biosíntesis de esteroides en membranas	G1 C14-desmetilasa en esterol biosíntesis	Fungicidas DMI (Desmetilación Inhibidores) (SBI: Clase I)	Triazol	Tebuconazol
1. Respiración	C3 Complejo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa)	Fungicidas QoI (Quinona afuera Inhibidores)	Estrobilurinas Metoxi-acrilatos	Azoxystrobin
1. Transducción de señales	E2 MAP / Histidina quinasa en la transducción de señales osmóticas (os-2, HOG1)	PP-fungicidas (Fenilpirrol)	Fenilpirrol	Fludioxonil

Fuente: FRAC Code List ©*2020

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. *Característica del lugar*

2.1.1.1. *Localización*

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Ubicación geográfica

Lugar: Riobamba, Chimborazo

Altitud: 2622 msnm

Coordenadas UTM

X: 757775

Y: 9817313

Temperatura media anual: 13.8°C

Precipitación media anual: 571.8mm

Humedad relativa: 48,80% (Estación Meteorológica de la ESPOCH)

2.2. Materiales y Equipos

2.2.1. *Materiales de laboratorio*

Envases plásticos, Cajas Petri, Para film, Pipetas, Probeta, Tubos de ensayo, Vasos de precipitación, Papel Aluminio, Puntas de micro pipeta

2.2.1.1. *Equipos de laboratorio*

Autoclave, Cámara de flujo laminar, Incubadora, Mechero de bunsen, Balanza digital

2.2.1.2. *Reactivos e insumos*

- Cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*, papa dextrosa agar (PDA),

NaCl, cloranfenicol, fungicidas sistémicos: Benzimidazol (Tiabendazol), Triazol (Tebuconazol), Estrobilurinas (Azoxystrobin), Fludioxonilo, alcohol antiséptico, agua destilada, antibióticos

2.2.1.3. *Materiales y Equipos de oficina*

- Computadora, impresora, hojas

2.3. METODOLOGÍA

Para el cumplimiento del primer objetivo: Determinar la tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medios de cultivo enmendados con fungicidas de diferente modo de acción, se usó la siguiente metodología.

2.3.1. *Aislados de Trichoderma spp.*

Para la activación de los aislados se utilizaron dos tipos, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*, en los que se mezclaron 45g de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) mezclado con 1000 mL de agua destilada. El pesaje de papa dextrosa agar (PDA), se pesa en una balanza analítica después de esterilizar la mezcla en autoclave, se lleva a la cámara de flujo laminar donde se vacía en cajas Petri de vidrio, una vez solidificada se siembra de los dos tipos de hongos con la ayuda de palillos se ubicó en el medio de cultivo para promover su crecimiento y desarrollo de los aislados.

Según los principios activos de los fungicidas sistémicos, Tiabendazol (Benzimidazol), Tebuconazol (Triazol), Azoxystrobin (Estrobilurinas), Fludioxonil (Fenilpirrol), se preparó la solución madre de cada fungicida y la dosis, se tomó distintas alícuotas para obtener una concentración de 0; 0,1; 1; 10; 100 (mg/L) de principio activo.

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

C_i = concentración inicial

V_i = volumen inicial

C_f = concentración final

V_f = volumen final

2.3.2. *Dosis evaluadas de los diferentes Fungicidas*

Los ingredientes activos Tiabendazol, Tebuconazol, Azoxystrobin y Fludioxonil se utilizaron para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* y las dosis estimadas es la recomendación del producto *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* se realizó cuatro repeticiones y cada uno con su control.

2.3.3. *Preparación del medio de cultivo PDA con fungicidas*

Para el desarrollo de la prueba se utilizó medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), por otro lado, el fungicida a la respectiva dosis se utilizó la micropipeta y para el fungicida solido (Azoxystrobin) se utilizó una balanza analítica y material estéril (papel aluminio y espátulas). Después de que el medio de cultivo este estéril, agregue la dosis correspondiente de fungicida y se vació en la placa de Petri.

2.3.4. *Siembra de Trichoderma harzianum y Trichoderma longibrachiatum*

De cultivos de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* de 10 días se tomaron discos de micelio de 5mm de diámetro y se los colocó en medio PDA con las respectivas concentraciones de cada fungicida con las siguientes concentraciones de 0; 0,1;1; 10; 100 mg/L. Las cajas de Petri fueron incubadas a temperatura de 24±2 °C, en condiciones de oscuridad. El diámetro micelial fue evaluado en dos direcciones (vertical y horizontal), utilizando un calibrador digital ROHS Compliant Electronic Digital Caliper.

2.3.5. *Variables evaluadas*

Por cada tratamiento se determinó el promedio del diámetro de crecimiento micelial a las 24, 48, 72, 96, 120, 144h de las dos especies de *Trichoderma* evaluadas. Con estos datos se determinó la tasa de crecimiento micelial para lo cual se utilizó la siguiente formula Se evaluó el crecimiento micelial a los 6 días después al montaje del ensayo para lo cual fue necesario el cálculo con la siguiente formula:

$$\text{Crecimiento micelial} = \frac{\text{diámetro medio a las 144 horas}}{\text{número de días a 6 días}}$$

Adicionalmente también se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio, para la inhibición del crecimiento micelial se utilizó la siguiente formula:

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

Para poder identificar las dosis se procedió a etiquetar cada una de las cajas Petri de la siguiente manera:

Tabla 3-2: Códigos de Aislados *Trichoderma* spp. de los diferentes fungicidas comparados en las dosis respectivas.

Dosis	Tiabendazol	Tebuconazol	Azoxystrobin	Fludioxonil
0	CMA-THR1	TCMA-THR1	ACMA-THR1	FCMA-THR1
0,1	CMB-THR1	TCMB-THR1	ACMB-THR1	FCMB-THR1
1	CMC-THR1	TCMC-THR1	ACMC-THR1	FCMC-THR1
10	CMD-THR1	TCMD-THR1	ACMD-THR1	FCMD-THR1
100	CME-THR1	TCME-THR1	ACME-THR1	FCME-THR1

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021

Para conocer la sensibilidad de las dos especies de *Trichoderma* se realizó la estimación de concentración letal 50 (CL₅₀) que sirve para conocer la variabilidad entre aislados de una población a un grupo de fungicidas y para medir la potencia fungitóxicas, de las mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial se usó para calcular el crecimiento o germinación relativa al testigo por cada dosis de fungicida y por cada aislamiento y se calculó usando la regresión de los valores de inhibición de crecimiento micelial versus al log₁₀ de la concentración de los fungicidas.

2.3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por tratamiento. Los datos se analizaron con el programa R. versión 4.1, utilizando análisis exploratorio mediante el uso de diagramas de cajas y bigote, medidas de resumen (promedio, desviación estándar) y para la separación de los diferentes tratamientos se compararon usando los intervalos de confianza al 95%.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Sensibilidad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* a los principios activo X, Y, W y Z.

Los resultados alcanzados en el presente ensayo indicaron que los tratamientos (control) de las especies *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*. mostraron rápido crecimiento micelial. El momento en el que al menos una repetición de estos cubrió el 100 % del medio de cultivo PDA dependió del aislado; para el caso de CMA-TH la dosis 0,1 el llenado se presentó a los seis días, mientras que CMD-TH, CMD-TL y CME-TH, CME-TL no llegaron a su máximo crecimiento hasta los seis días (Gráfico 1-A).

3.2. Crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiabendazol.

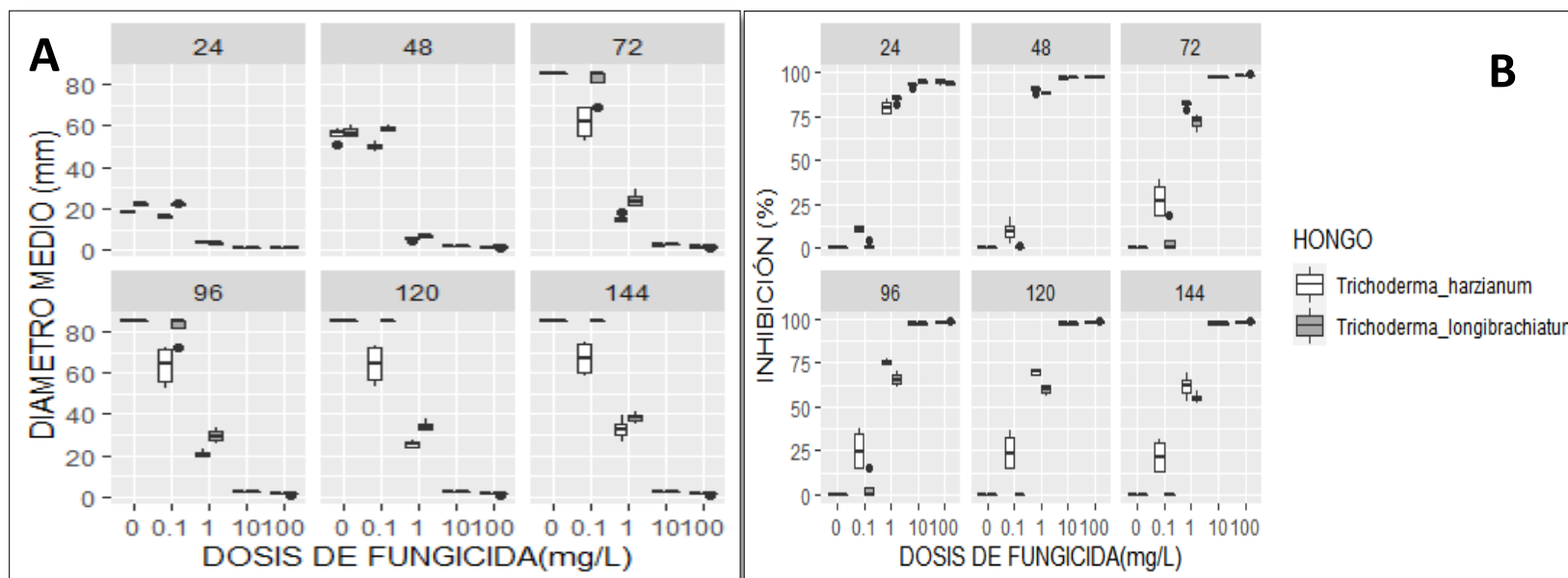


Gráfico 1-3: (A) Crecimiento micelial in vitro y (B) inhibición micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiabendazol.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Tabla 4-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de *Trichoderma harzianum* y *T.longibrachiatum*, obtenidos en medio PDA enmendados con diferentes dosis de Tiabendazol.

HONGO	DOSIS (mg/L)	TIEMPO (h)	DIAMETRO (mm)		INHIBICION(%)	
			Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<i>T. harzianum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	0,1	144	66,8	8,61	21,41	10,14
<i>T. harzianum</i>	1	144	32,83	5,63	61,36	6,63
<i>T. harzianum</i>	10	144	2,46	0,30	97,10	0,36
<i>T. harzianum</i>	100	144	1,7	0,40	98	0,47
<i>T. longibrachiatum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	0,1	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	1	144	38,27	2,40	54,97	2,82
<i>T. longibrachiatum</i>	10	144	2,45	0,10	97,11	0,12
<i>T. longibrachiatum</i>	100	144	1,55	0,20	98,17	0,24

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

El diámetro de crecimiento micelial (mm) tanto de *Trichoderma harzianum* como de *Trichoderma longibrachiatum* en medios enmendados con concentraciones de Tiabendazol de 10 y 100 mg/L fue el menor durante todo el tiempo evaluado con un promedio de crecimiento de 2,19 mm para *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*. A una dosis 1 mg/L se evidenció una reducción en el crecimiento tanto para *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* con valores promedios 32,87mm y 38,27 mm respectivamente. A la dosis de 0,1 mg/L se observó crecimiento en la especie de *T. longibrachiatum* de 85 mm a las 144 h alcanzando su máximo crecimiento, por otro lado, se evidencio una pequeña reducción de *Trichoderma harzianum* de 66,8 mm a la 144 h. A las dosis 0 mg/L ninguna de las dos especies presentó diferencia de las dos especies de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*, alcanzando a las 72 h un crecimiento de 85 mm (Gráfico 1A).

Por lo tanto, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* no tolero a la presencia de Tiabendazol en las dosis de 10; 100 mg/L durante el tiempo evaluado por lo que inhibió el 98 % del crecimiento del micelio en las dos especies. En la dosis 1 mg/L existió mayor inhibición de *Trichoderma harzianum* con valor promedio de 61,36 % en relación de *T. longibrachiatum* con 54,97%. En la dosis 0,1 mg/L *Trichoderma longibrachiatum* tolero esta concentración de Tiabendazol en el medio a diferencia de *Trichoderma harzianum* que fue inhibido 21,46 % (Gráfico 1B).

3.2.1. Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiabendazol.

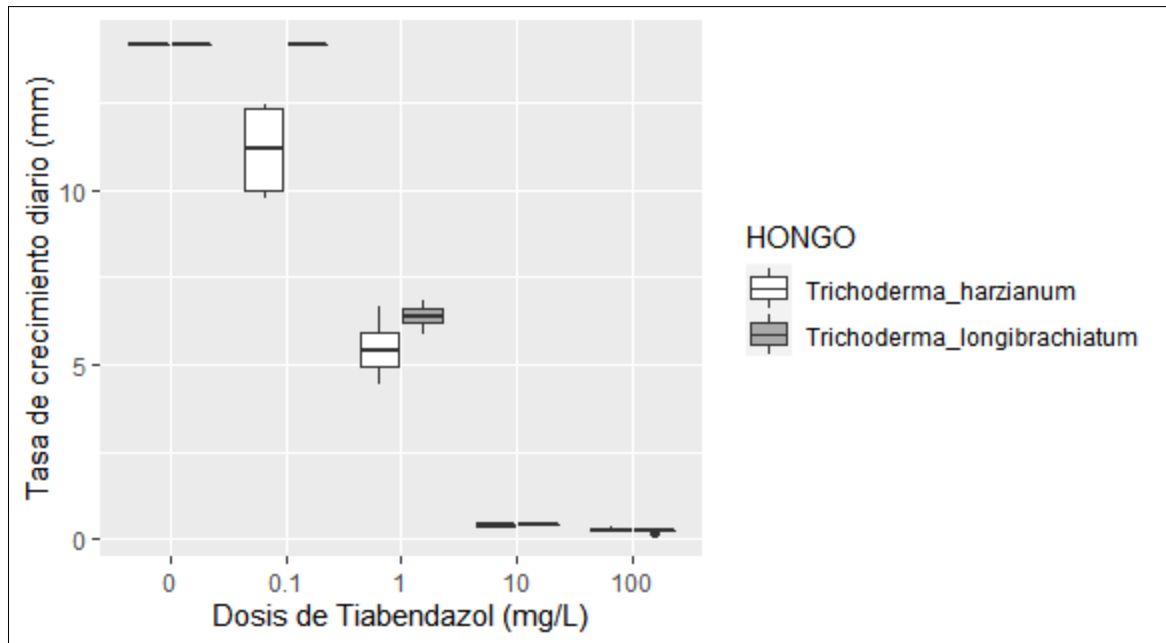


Gráfico 2-3: Tasa de crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendados con Tiabendazol.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Se evidenció un efecto de las dosis en la tasa de crecimiento (**Gráfico 2-3**). Las dosis 100 y 10 mg/L redujeron el crecimiento de las dos especies de *Trichoderma*. La dosis 1mg/L redujo la tasa de crecimiento, el promedio de la tasa de crecimiento del micelio fue de 5,47 mm para *Trichoderma harzianum* y para *T. longibrachiatum* fue de 6,38 mm. En la dosis 0,1 mg/L se observó una reducción en la tasa de crecimiento exclusivamente en la especie de *Trichoderma harzianum* con una tasa de crecimiento 11,13 mm/día. En términos generales solamente en la dosis 0,1mg/L se evidenció una diferencia significativa de la tasa de crecimiento de las dos especies de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*. A continuación, en las siguientes tablas se detalla la tasa de crecimiento micelial en diferentes dosis de Tiabendazol:

Tabla 5-3: Efecto de la dosis 0 mg/L de Tiabendazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 6-3: Efecto de la dosis 0,1 mg/L de Tiabendazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,1	11,13 b	1,43	8,85	13,42
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,1	14,17 a*	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 7-3: Efecto de la dosis 1 mg/L de Tiabendazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	5,47 a*	0,94	3,98	6,97
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1	6,38 a	0,4	5,74	7,02

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza 95%

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 8-3: Efecto de la dosis 10 mg/L de Tiabendazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	10	0,41 a*	0,05	0,33	0,49
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10	0,4 a	0,02	0,38	0,44

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 9-3: Efecto de la dosis 100 mg/L de Tiabendazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0,28 a*	0,07	0,18	0,39
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	0,26 a	0,03	0,20	0,31

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

3.2.2. Concentración letal 50 (CL₅₀) enmendados con principio activo Tiabendazol sobre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

La CL₅₀ de Tiabendazol para *Trichoderma harzianum* fue menor en comparación con la CL₅₀ para *T. longibrachiatum*. De acuerdo al criterio de clasificación de sensibilidad de los aislados y fungitoxicidad de los fungicidas usando la escala propuesta por Edgington et al. (1971), se determinó que las dos especies de *Trichoderma* estudiados son muy sensibles al Tiabendazol (Tabla 10-3)

Tabla 10-3: Concentración letal 50 (CL₅₀) de Tiabendazol sobre *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*.

Hongo	Promedio (mg/L)	Desviación estándar	Escala de CL ₅₀	Sensibilidad del hongo	Fungitoxicidad
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,52	0,14	<1	Muy sensible	Alta Fungitoxicidad
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,89	0,05	<1	Muy sensible	Alta fungitoxicidad

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021.

3.3. Crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol.

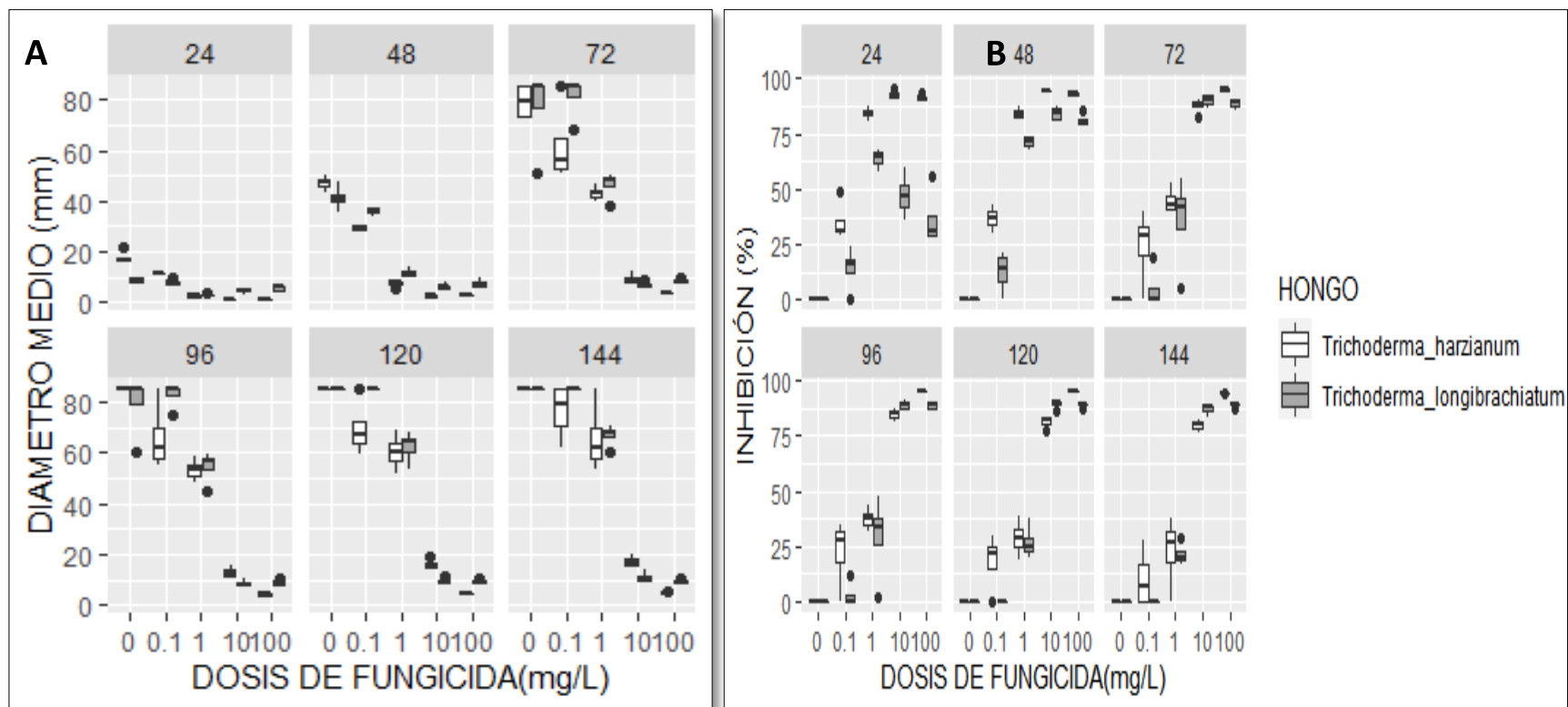


Gráfico 3-3: (A) Crecimiento micelial *in vitro* y (B) inhibición micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tiabendazol.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Tabla 11-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de *Trichoderma harzianum* y *T.longibrachiatum*, obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol.

HONGO	DOSIS (mg/L)	TIEMPO (h)	DIAMETRO(mm)		INHIBICION(%)	
			Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<i>T. harzianum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	0,1	144	76,28	11,14	10,25	13,11
<i>T. harzianum</i>	1	144	65,52	13,76	22,91	16,18
<i>T. harzianum</i>	10	144	17,17	2,38	79,79	2,80
<i>T. harzianum</i>	100	144	4,78	0,14	94,36	0,17
<i>T. longibrachiatum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	0,1	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	1	144	66,77	4,26	21,44	5,01
<i>T. longibrachiatum</i>	10	144	10,98	2,00	87,07	2,35
<i>T. longibrachiatum</i>	100	144	9,27	1,06	89,08	1,24

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

El diámetro de crecimiento micelial (mm) de *Trichoderma harzianum* como de *Trichoderma longibrachiatum* en medios enmendados con Tebuconazol. A una dosis 100 mg/L el crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum* 9,27 mm a las 144h y *T. harzianum* fue de 4,78 mm. A la dosis 1mg/L observó que *Trichoderma longibrachiatum* tuvo un crecimiento promedio de 66,77 mm y *T. harzianum* 65,52 mm a las 144h. A una dosis de 0,1 mg/L se observó un crecimiento mayor de la especie de *T. longibrachiatum* de 85 mm y por parte de *T. harzianum* una pequeña reducción de 76,28 mm durante el tiempo evaluado. A la dosis de 0mg/L en las especies de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* a las 96h alcanzando su máximo crecimiento fue de 85mm (Gráfico 2A).

De esta manera, las especies de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* resulto ser sensible a la presencia de Tebuconazol en las dosis más altas 10 y 100 mg/L por tanto sus porcentajes de inhibición fue de 94,36 % y de 89,08 % respectivamente. En la dosis 1 mg/L existió mayor inhibición de *Trichoderma harzianum* con valor promedio de 22,91 % en relación de *T. longibrachiatum* 21,44%. En la dosis 0,1mg/L existe mayor tolerancia por parte de *Trichoderma longibrachiatum* a diferencia de *T. harzianum* que su inhibición fue de 10,25 % (Gráfico 2B).

3.3.1. Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol.

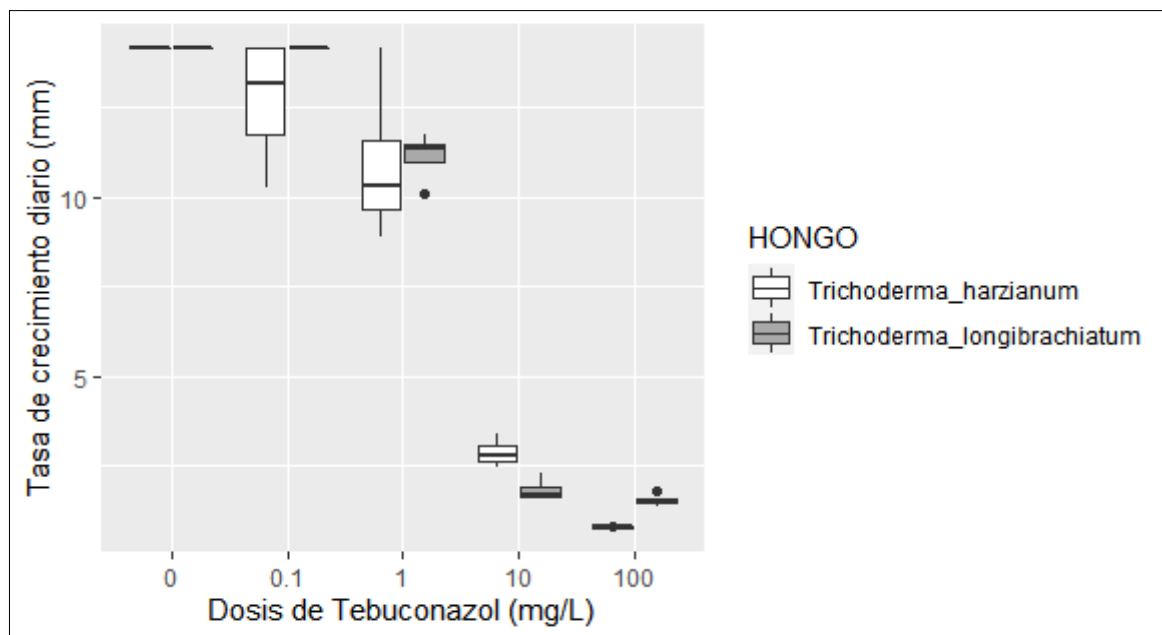


Gráfico 4-3: Tasa de crecimiento diario de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Tebuconazol.

Realizado por: Izurieta, E. 2021

Se mostró el efecto de la dosis en la tasa de crecimiento en medios de cultivo PDA, enmendado con concentraciones de Tebuconazol (**Gráfico 4-3**). En las dosis de 100 mg/L se observó que *Trichoderma harzianum* tuvo un crecimiento de 0,79 mm/día y *T. longibrachiatum* que tuvo un crecimiento de 1,55 mm/día. La dosis 1 mg/L redujo la tasa de crecimiento, el promedio de la tasa de crecimiento fue de 10,92 mm/día para *Trichoderma harzianum* y de 11,13 mm/día para *T. longibrachiatum*. A una dosis de 0,1 mg/L se observó una reducción de crecimiento exclusivamente en la especie de *Trichoderma harzianum* con una tasa de crecimiento 12,71. En términos generales en la dosis 100mg/L estadísticamente se observó diferencia significativa con respecto a las diferentes dosis. A continuación, en las siguientes tablas se detalla la tasa de crecimiento micelial en diferentes dosis de Tebuconazol:

Tabla 12-3: Efecto de la dosis 0 mg/L de Tebuconazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 13-3: Efecto de la dosis 0,1 mg/L de Tebuconazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,1	12,71 a*	1,86	9,76	15,67
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,1	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 14-3: Efecto de la dosis 1 mg/L de Tebuconazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	10,92 a*	2,294	7,27	14,57
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1	11,13 a	0,711	10,00	12,26

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 15-3: Efecto de la dosis 10 mg/L de Tebuconazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	10	2,86 a*	0,40	2,23	3,50
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10	1,83 a	0,33	1,30	2,36

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 16-3: Efecto de la dosis 100 mg/L de Tebuconazol en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	100	0,80 b	0,02	0,76	0,84
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	1,55 a*	0,18	1,26	1,83

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

3.3.2. Concentración letal 50 (CL_{50}) enmendado con principio activo Tebuconazol sobre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

De acuerdo al criterio de clasificación de sensibilidad de los aislados y fungitoxicidad de los fungicidas usando la escala propuesta por Edgington et al. (1971). Se determinó que las dos especies de *Trichoderma* estudiadas son moderadamente sensibles al Tebuconazol.

Tabla 17-3: Concentración letal 50 (CL₅₀) de Tebuconazol sobre *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*.

Hongo	Promedio (mg/L)	Desviación estándar	Escala de CL₅₀	Sensibilidad del hongo	Fungitoxicidad
<i>Trichoderma harzianum</i>	3,81	5,94	1-10	Moderadamente sensible	Moderada fungitoxicidad
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	2,56	0,75	1-10	Moderadamente sensible	Moderada fungitoxicidad

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021.

3.4. Crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Azoxystrobin.

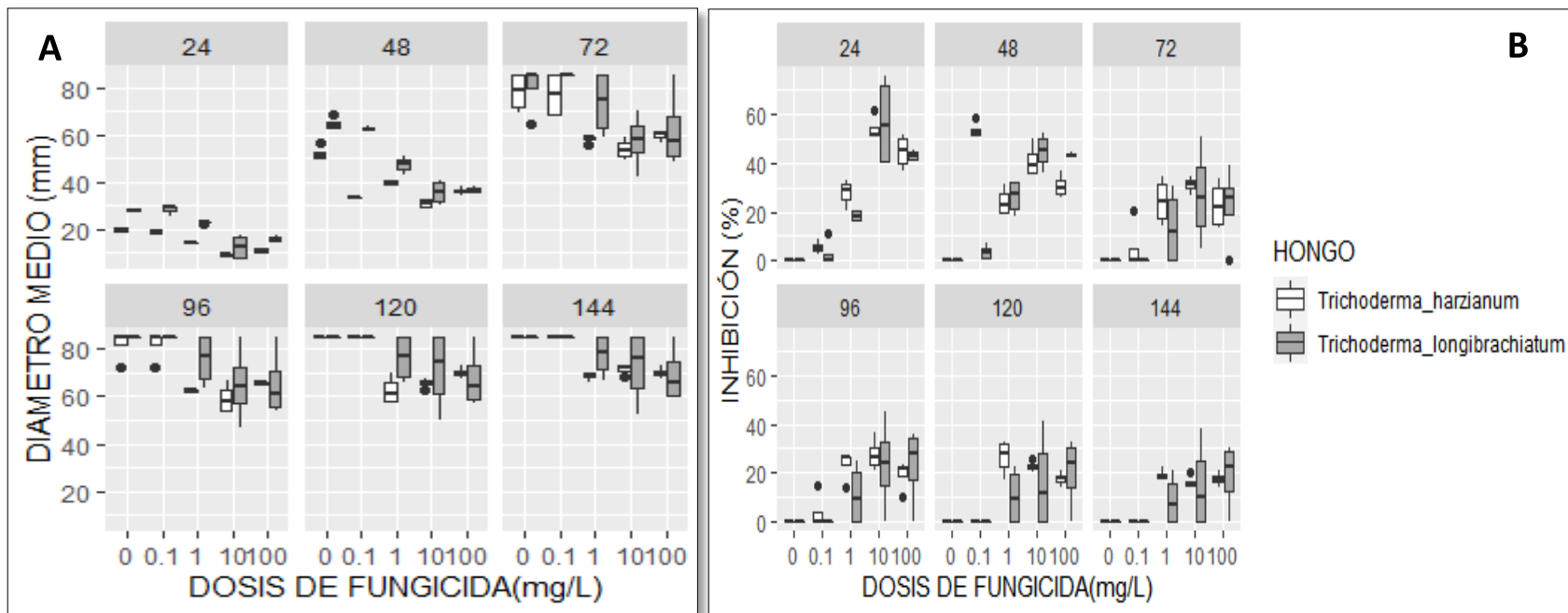


Gráfico 5-3: (A) Crecimiento micelial *in vitro* y (B) inhibición micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Azoxystrobin.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Tabla 18-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de *Trichoderma harzianum* y *T.longibrachiatum*, obtenidos en medio PDA enmendado a diferentes dosis de Azoxystrobin.

HONGO	DOSIS (mg/L)	TIEMPO (h)	Diámetro (mm)		Inhibición(%)	
			Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<i>T. harzianum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	0,1	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	1	144	70,12	6,18	19,18	7,27
<i>T. harzianum</i>	10	144	53,78	4,27	16,21	3,40
<i>T. harzianum</i>	100	144	69,10	2,35	17,54	2,76
<i>T. longibrachiatum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	0,1	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	1	144	81,50	9,03	8,82	10,62
<i>T. longibrachiatum</i>	10	144	65,13	15,95	14,71	18,77
<i>T. longibrachiatum</i>	100	120	70,16	12,60	18,70	14,83

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Trichoderma longibrachiatum en la dosis de 100 mg/L tuvo un crecimiento de 70,16 mm y *T. harzianum* su crecimiento fue de 69,10 mm. En la dosis de 1 mg/L la especie *Trichoderma longibrachiatum* tuvo un crecimiento de 81,50 mm y *T. harzianum* un crecimiento de 70,12 mm. A una dosis de 0,1 mg/L las especies *Trichoderma harzianum* y *T longibrachiatum* tuvieron un crecimiento micelial de 85 mm. (Gráfico 3A).

Por lo tanto, las especies *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* resultaron tolerar las diferentes concentraciones de Azoxystrobin. A una dosis de 100 mg/L de Azoxystrobin los porcentajes de inhibición de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* fueron de 17,54 % y 18,70 %. En la dosis de 10 mg/L la especie *Trichoderma harzianum* fue más sensible a Azoxystrobin con una inhibición de 16,21% a diferencia de *T. longibrachiatum* con una inhibición de 14,71% a las 144h. A una dosis de 1 mg/L en la especie *Trichoderma harzianum* existió mayor inhibición de crecimiento con un valor de 19,18% en relación a *T. longibrachiatum* que su inhibición promedio fue de 8,82%. En la dosis 0,1mg/L existió tolerancia por parte de las dos especies de *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* (Gráfico 3B)

3.4.1. Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado a diferentes dosis de Azoxystrobin.

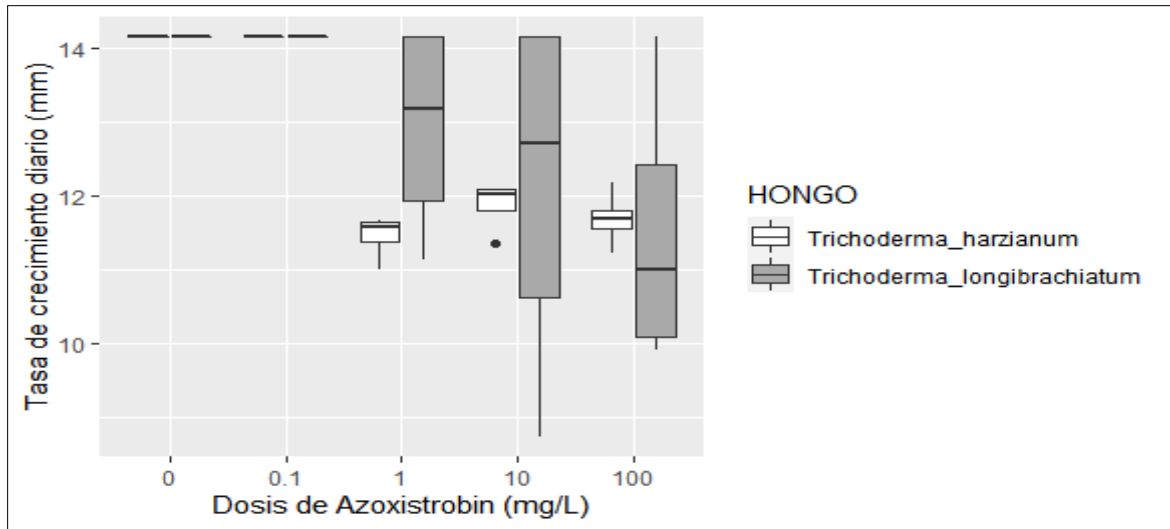


Gráfico 6-3: Tasa de crecimiento diario de *Trichoderma harzianum* y *T.longibrachiatum* en medio PDA enmendados a diferentes dosis de Azoxystrobin.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Se evidenció un efecto de las diferentes dosis de Azoxystrobin en la tasa de crecimiento de las dos especies de *Trichoderma* spp. (**Gráfico 2-3**). Se observó una mayor tasa de crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum*, asociándose con una mayor tolerancia a este principio activo a diferencia de *Trichoderma harzianum* que presentó menor crecimiento a diferentes dosis de Azoxystrobin. En la dosis de 0,1 mg/L alcanzaron una tasa de crecimiento promedio de 14,17 mm las dos especies de *Trichoderma* spp, en las dosis de 1 y 10 mg/L existió un crecimiento promedio de 12,92 mm/día para *Trichoderma longibrachiatum* y 11,44 mm/día para *Trichoderma harzianum*, en la dosis de 100 mg/L se observó mayor tasa de crecimiento para *Trichoderma harzianum* con una media de 11,69 mm/día. A continuación, en las siguientes tablas se detalla la tasa de crecimiento micelial en diferentes dosis de Azoxystrobin.:

Tabla 19-3: Efecto de la dosis 0 mg/L de Azoxystrobin en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 20-3: Efecto de la dosis 0,1 mg/L de Azoxystrobin en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,1	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,1	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 21-3: Efecto de la dosis 1 mg/L de Azoxystrobin en la tasa de crecimiento *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	11,45 a*	0,31	10,95	11,95
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1	12,92 a	1,51	10,52	15,31

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 22-3: Efecto de la dosis 10 mg/L de Azoxystrobin en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	10	11,87 a*	0,35	11,31	12,43
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10	12,08 a	2,62	7,92	16,25

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

Tabla 23-3: Efecto de la dosis 100 mg/L de Azoxystrobin en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	100	11,69 a*	0,39	11,07	12,32
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	11,52 a	1,97	8,39	14,65

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

3.4.2. Concentración letal 50 (CL₅₀) con principio activo Azoxystrobin sobre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

De acuerdo con los cálculos correspondientes, se obtuvo la concentración letal 50 de Azoxystrobin (CL₅₀) para *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*, para la clasificación de sensibilidad de los aislados y toxicidad fungicida, se utilizó la escala propuesta por Edgington et al. (1971)

La CL₅₀ de Azoxystrobin para *Trichoderma harzianum* fue de 293,8 mg/L y para *T. longibrachiatum* fue 323,35mg/L, se consideran sin fungitoxicidad observándose que *T. longibrachiatum* tolero un 10,06% más Azoxystrobin que *T. harzianum*.

Tabla 24-3: Concentración letal 50 (CL₅₀) de Azoxystrobin sobre *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*.

Hongo	Promedio (mg/L)	Desviación estándar	Escala de CL₅₀	Sensibilidad del hongo	Fungitoxicidad
<i>Trichoderma harzianum</i>	293,82	609,03	>50	Insensible	Sin fungitoxicidad
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	323,35	363,23	>50	Insensible	Sin fungitoxicidad

Realizado por: Izurieta Cherrez, Erika, 2021.

3.5. Crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* obtenido en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Fludioxonil.

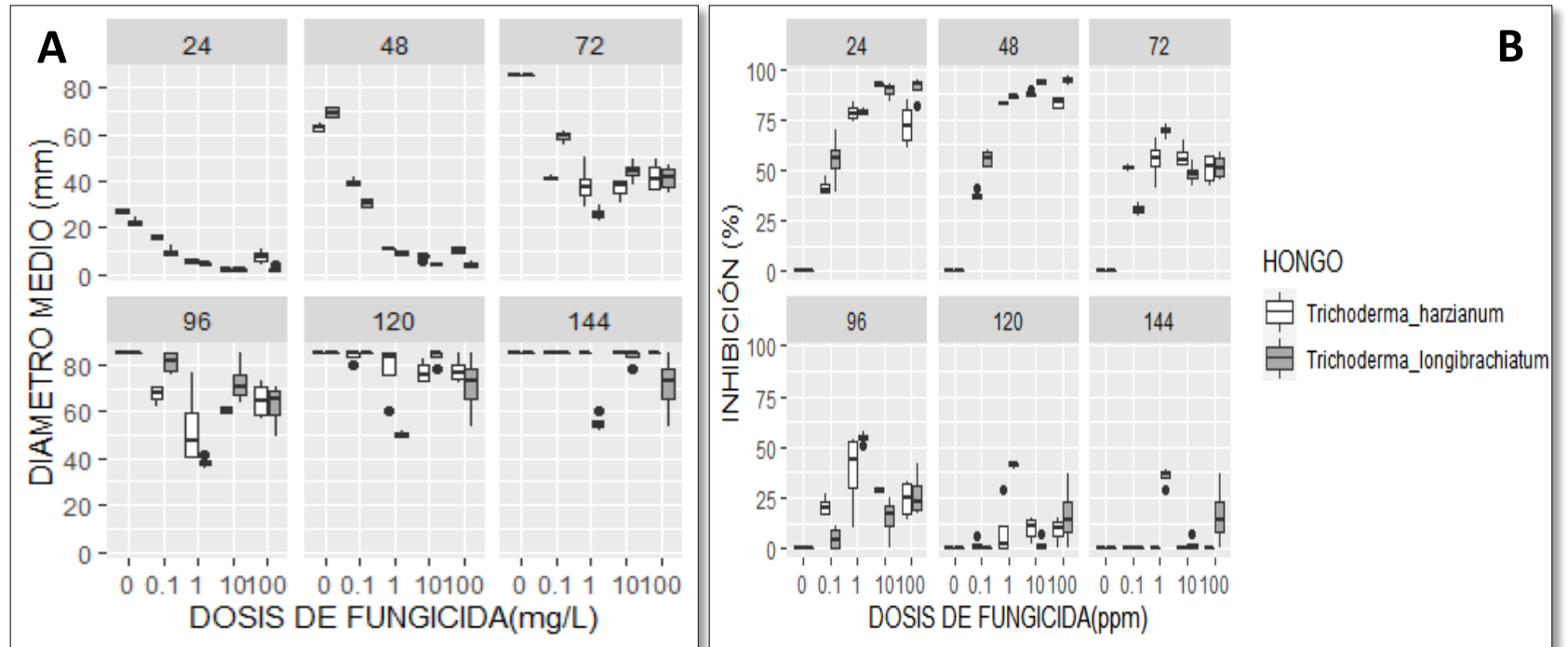


Gráfico 7-3: (A) Crecimiento micelial *in vitro* y (B) inhibición micelial de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Fludioxonil..

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Tabla 25-3: Diámetro (mm) e Inhibición (%) de *Trichoderma harzianum* y *T.longibrachiatum*, obtenidos en medio PDA enmendado con diferentes dosis de Fludioxonil.

HONGO	DOSIS (mg/L)	TIEMPO (h)	DIAMETRO (mm)		INHIBICION(%)	
			Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<i>T. harzianum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	0,1	144	83,68	2,49	1,54	2,93
<i>T. harzianum</i>	1	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	10	144	85	0	0	0
<i>T. harzianum</i>	100	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	0	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	0,1	144	85	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	1	144	54,98	3,49	35,30	4,11
<i>T. longibrachiatum</i>	10	144	83,41	3,17	1,86	3,73
<i>T. longibrachiatum</i>	100	144	71,26	13,16	16,16	15,48

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

A las 24 h del experimento se observó que *T. longibrachiatum* en la dosis de 100 mg/L crecimiento fue de 2,03 mm y *T. harzianum* su crecimiento fue de 7,48 mm, al término del experimento se observó que en *T. longibrachiatum* a la misma dosis alcanzó su máximo crecimiento de 71,26 mm y *T. harzianum* su crecimiento máximo fue de 85mm. En la dosis 1 mg/L a las 24h *T. longibrachiatum* mostró un crecimiento de 4,63 mm y *T. harzianum* de 5,78 mm, su máximo crecimiento a las 144 h de *T. longibrachiatum* fue de 55 mm y *T. harzianum* 85 mm. En la dosis 0,1 mg/L *T. longibrachiatum* presento crecimiento a las 24h fue de 9,69 mm y *T. harzianum* fue de 15,74 mm, su máximo crecimiento a las 144 h de *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* fue de 85mm. En los controles *T. longibrachiatum* presentó un crecimiento a las 24 h de 26,7 mm y *T. harzianum* un crecimiento de 26,94 mm, a las 144 h *T. longibrachiatum* y *T. harzianum* alcanzó su máximo crecimiento de 85 mm (Gráfico 4A).

En el caso de *Trichoderma longibrachiatum* no mostró sensibilidad a Fludioxonil en las dosis 1;100 mg/L a las 144h con los cuales el porcentaje de inhibición fue apenas de 33,30% y 16,16% respectivamente a diferencia de *Trichoderma harzianum* que presentó inhibición de 0% por lo que toleró más Fludioxonil. (Gráfico 4B).

3.5.1. Tasa de crecimiento micelial (mm/día) de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA a las diferentes dosis de Fludioxonil.

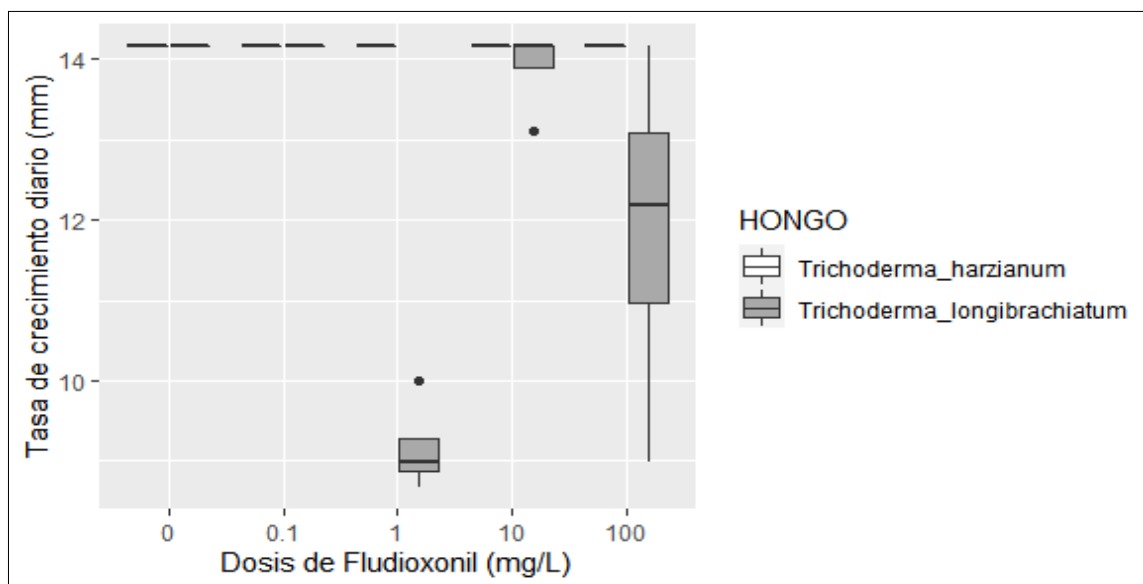


Gráfico 8-3: Tasa de crecimiento diario de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en medio PDA a las diferentes dosis de Fludioxonil.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

Se evidenció un efecto de diferentes dosis en la tasa de crecimiento de las dos especies de *Trichoderma* (**Gráfico 8-3**). Se observó mayor crecimiento de *Trichoderma harzianum* asociándose a mayor tolerancia a Fludioxonil presentando medias de tasa de crecimiento de 14, 17 mm/día a las diferentes dosis, a diferencia de *Trichoderma longibrachiatum* que presentó diferentes tasas de crecimiento en las dosis 1;10;100 mg/L con medias de 9,16; 13,90; 11,88 mm/día. A continuación, en las siguientes tablas se detalla la tasa de crecimiento micelial en diferentes dosis de Fludioxonil:

Tabla 26-3: Efecto de la dosis 0 mg/L de Fludioxonil en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021.

Tabla 27-3: Efecto de la dosis 0,1 mg/L de Fludioxonil en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,1	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,1	14,17 a	0	14,17	14,17

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021

Tabla 28-3: Efecto de la dosis 1 mg/L de Fludioxonil en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1	9,16 b	0,58	8,24	10,09

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021

Tabla 29-3: Efecto de la dosis 10 mg/L de Fludioxonil en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis (mg/L)	Tasa de crecimiento promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	10	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10	13,90 a	0,53	13,06	14,74

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021.

Tabla 30-3: Efecto de la dosis 100 mg/L de Fludioxonil en la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Hongo	Dosis	Tasa de crecimiento Promedio (mm/día)	Desviación estándar	Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza superior
<i>Trichoderma harzianum</i>	100	14,17 a*	0	14,17	14,17
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100	11,88 a	2,19	8,39	15,37

*Promedios con letras diferentes son estadísticamente diferentes según los intervalos de confianza al 95%.

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021.

3.5.2. Concentración letal 50 (CL₅₀) del principio activo de Fludioxonil sobre *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

De acuerdo con los cálculos correspondientes, se obtuvo la concentración letal 50 de Fludioxonil (CL₅₀) para *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*, para el criterio de clasificación de sensibilidad de los aislados y toxicidad fungicida, se utilizó la escala propuesta por Edgington et al. (1971). La concentración de Fludioxonil tanto para *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* fue >100mg/L.

Tabla 31-3: Concentración letal 50 (CL₅₀) de Fludioxonil sobre *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*.

Hongo	Promedio (mg/L)	Desviación estándar	Escala de CL₅₀	Sensibilidad del hongo	Fungitoxicidad
<i>Trichoderma harzianum</i>	467,82	708,03	>50	Insensible	Sin fungitoxicidad
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	545,35	976,23	>50	Insensible	Sin fungitoxicidad

Realizado por: Izurieta Cherez, Erika, 2021.

DISCUSIÓN

La utilización combinada de fungicidas y cepas tolerantes de *Trichoderma* a agroquímicos es una estrategia aplicable para el manejo integrado de enfermedades de las plantas.

La CL₅₀ de Tiabendazol tanto para *Trichoderma harzianum* como para *T. longibrachiatum* fue de <1 mg/L lo que según Edgington et al. (1971) se considera altamente fungitóxico, y por esta razón no se lo recomendaría para su uso en combinación con estas dos especies de *Trichoderma*. Según el modo de acción el Tiabendazol, este actúa en proteínas motoras y del citoesqueleto en el ensamblaje de la β -tubulina (microtúbulos-citoesqueleto) que es una molécula importante en la formación y segregación de cromosomas en la división celular, estos grupos químicos se componen de distintos principios activos (Castillo Pérez, B y Castillo Bermeo, 2020, pp. 3–6). El Bencimidazol es la sustancia precursora de la familia de fungicidas sistémicos conocidos como bencimidazoles que incluye al Tiabendazol, Carbendazim y Benomilo (Coruña A, 2016).

La CL₅₀ de Tebuconazol para *Trichoderma harzianum* fue de 3,81 mg/L y para *T. longibrachiatum* fue 2,56 mg/L, lo que según Edgington et al. (1971) se consideran moderadamente fungitóxicas observándose que *T. harzianum* toleró un 48,83% más Tebuconazol que *T. longibrachiatum*. El Tebuconazol tiene como modo de acción la inhibición del ergosterol, los esteroides como el ergosterol están localizados en las membranas celulares de algunos hongos (Ascomicetos y Basidiomicetos) confiriendo estabilidad y control de la permeabilidad celular (Adriana y Quintana 2018).

La CL₅₀ de Azoxystrobin para *Trichoderma harzianum* fue de 293,8 mg/L y para *T. longibrachiatum* fue de 323,35mg/L, lo que según Edgington et al. (1971) se consideran sin fungitoxicidad observándose que *T. longibrachiatum* tolero un 10,06% más Azoxystrobin que *T. harzianum*. El Azoxystrobin es un producto que afecta la respiración mitocondrial de los hongos. La inhibición mitocondrial de la respiración celular es un complejo proceso oxidativo que conserva la energía liberada por el catabolismo de las moléculas tales como carbohidratos a través de la producción de ATP y de ADP (Chávez 2018).

La CL₅₀ de Fludioxonil para *Trichoderma harzianum* fue de 467,82 mg/L y para *T. longibrachiatum* fue 545,35mg/L, lo que según Edgington et al. (1971) se consideran sin fungitoxicidad observándose que *T. longibrachiatum* tolero un 16,57% más Fludioxonil que *T. harzianum*. El Fludioxonil tiene como modo de acción la inhibición de los mecanismos metabólicos que permiten a la célula adaptarse a su entorno (Pavez Badilla et al. 2015).

Debido a la no fungitoxicidad encontrada para *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum* para los principios activos Azoxystrobin y Fludioxonil se sugiere el uso en combinación de fungicidas basados en estos principios activos y las dos especies de *Trichoderma* para el manejo integrado de enfermedades de plantas.

CONCLUSIONES

Los principios activos Tiabendazol y Tebuconazol tuvieron las menores CL_{50} tanto para *Trichoderma harzianum* como para *Trichoderma longibrachiatum*, inhibiendo el crecimiento micelial en un 71,15% y 48,83 % respectivamente.

Los principios activos Azoxystrobin y Fludioxonil mostraron los mayores valores de CL_{50} para las dos especies de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento micelial 10,06% y 16,57 % respectivamente, y por lo tanto estos productos podrían utilizarse en combinación con los antagonistas microbianos estudiados para el manejo integrado de enfermedades.

RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, no se recomienda utilizar fungicidas que posean los principios activos Tiabendazol ni Tebuconazol en combinación con *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* para el manejo de Fitopatógenos, debido a la sensibilidad que mostraron las dos especies estudiadas a estos ingredientes activos.

Efectuar estudios de sensibilidad *in vitro* de las especies *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* con otros principios activos diferentes a los utilizados en este estudio, con el propósito de generar información y proponer métodos de manejo integral para contrarrestar los impactos ambientales negativos que causa el uso exclusivo de pesticidas agrícolas.

GLOSARIO

Antagonista: Buenos competidores por nutrientes y presentan un sistema enzimático especializado para parasitar diversos hongos fitopatógenos. Los hongos antagonistas son componentes naturales del suelo, encontrándose en materiales vegetales en estado de descomposición en numerosos suelos de uso agrícola y tiene la capacidad de adaptarse a varios ambientes, (Fernández-Larrea, O. 2001).

Biocontrol: Enfocado en el estudio y uso de microorganismos aislados de forma única a partir de suelo o de la planta afectada, y así hacer un manejo de las plagas y enfermedades (Instituto de Ecología, A.C. INECOL 2010).

Concentración letal: Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50%, expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado (Raimondo, J. 2016).

Concentración: Una disolución es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolución o, a veces, de disolvente; donde el soluto es la sustancia que se disuelve, el solvente es la sustancia que disuelve al soluto, y la disolución es el resultado de la mezcla homogénea de las dos anteriores. Por menor proporción de soluto disuelto en el solvente, menos concentrada está la solución, y a mayor proporción más concentrada (Echegaray y Herrera 2007).

Esporas: Son células que producen ciertos hongos, plantas (musgos, helechos) y bacterias. Las esporas participan en la reproducción. Esporas tienen paredes gruesas. Pueden resistir las altas temperaturas, la humedad y otras condiciones del medioambiente (National Library of Medicine 2018).

Fitopatógenos: Organismo, en general microorganismo, que genera enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, toxinas y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento (Agrios, G. G. 1997).

Fungitoxicidad: Impedir el crecimiento o eliminar los hongos para las plantas. Los fungicidas, por más eficaces que sean, si se utilizan en exceso puede causar daños fisiológicos a la planta. Inhibición del crecimiento radial en placas y determinación del porcentaje de inhibición e inhibición zonal del desarrollo de hifas (Quiroga, E.N&Soberón, J.2006).

Hifas: Cada uno de los filamentos delgados semejantes a fibras de algodón, que se desarrollan a partir de las esporas de los hongos y que reunidos en una densa ramificación individual, constituyen el micelio.

In vitro: Es de origen latín que significa “dentro del vidrio”. En consideración la técnica que se realiza fuera del organismo, dentro de un tubo de ensayo, en un medio de cultivo, o en cualquier otro ambiente artificial. Como tal, la expresión “*in vitro*” es una locución latina que señala a todos los estudios o experimentos que se realizan fuera del organismo (Altuna, B.; Almeida, G 1996).

Ingrediente activo: Los ingredientes activos son los químicos en los productos pesticidas que matan, controlan o repelen plagas. A menudo, los ingredientes activos constituyen la menor parte de todo el producto. Las etiquetas de los pesticidas incluyen el nombre de cada ingrediente activo y su concentración en el producto (National pesticide information center 2015).

Sensibilidad: La razón fundamental de una prueba de sensibilidad es la de realizar una predicción a través de una prueba *in vitro*, observar la respuesta y detectar una resistencia relevante del organismo que está causando este proceso (Herrera, L 1999).

BIBLIOGRAFÍA

- ADRIANA, K. & QUINTANA, R.** Evaluación de riesgo ambiental asociado al difenoconazol en los cultivos de fresa de una finca piloto en la vereda la estancia en madrid cundinamarca. [en línea],2018. Disponible en:
<https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/15363/2019cristianrojas.pdf?sequence=5&isAllowed=y>.
- AGAMEZ, ZAPATA, OVIEDO & BARRERA.** Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp . Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing *Trichoderma* sp . spores. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 2008 vol. X, no. 2, pp. 23–34. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/776/77610204.pdf>.
- BARAKAT, R.M., et al.** Effect of *Trichoderma harzianum* in Combination with Fungicides in Controlling Gray Mould Disease (*Botrytis cinerea*) of Strawberry. *American Journal of Plant Sciences* [en línea], 2017 vol. 8, no. 4, pp. 651–665. [Consulta: 20 enero 2021]. DOI 10.4236/AJPS.2017.84045. Disponible en:
<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=74547>.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* [en línea], 2004 vol. 7, no. 4, pp. 249–260. ISSN 16181905. DOI 10.2436/im.v7i4.9480. Disponible en:
<https://scielo.isciii.es/pdf/im/v7n4/Benitez.pdf>.
- CHÁVEZ, J.D.C., UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.** [en línea], 2018. Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14588/1/T-UCE-0004-A66-2018.pdf>.
- CASTILLO, G. C., PÉREZ, A. & LOVATO, E. A.** “Compatibilidad “*in vitro*” de aislados de *Trichoderma* spp. con fungicidas usados normalmente en el control de patógenos de suelo”. Científico-Técnica de Biología de Suelos- Corrientes [en línea] 2017 [Argentina] Aerotecnia, 25, 0328-4077. [Consulta: 20 enero 2021] ISSN (Papel): 0328-4077 ISSN (on-line):2545-8906. Disponible en: <https://revistas.unne.edu.ar>

CHAVERRI, P. & SAMUELS, G.J. Evolution Of Habitat Preference And Nutrition Mode In A Cosmopolitan Fungal Genus With Evidence Of Interkingdom Host Jumps And Major Shifts In Ecology. *Evolution*, [en línea], 2013 ISSN 00143820. DOI 10.1111/evo.12169. [Consulta: 20 de enero 2021] Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24094336/>

CHET, I. & INBAR, J., Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology 1994 48:1* [en línea], 1994. vol. 48, no. 1, pp. 37–43. [Consulta: 8 julio 2021]. ISSN 1559-0291. DOI 10.1007/BF02825358. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02825358>.

COSTA, P.F. Efeito De Diferentes Óleos Essenciais Associados a Biofilmes No Controle Da Antracnose E Qualidade De Frutos Do Mamoeiro. [en línea], 2017 no. December 2014, pp. 100. Disponible en: http://repositorio.uft.edu.br/bitstream/11612/963/1/Priscila_Fonseca_Costa_-_Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf.

DE LIÑÁN C. Vademécum de agroquímicos de México. *Tecnoagícola de México* 4, 766 p [Consulta: 20 enero 2021] Disponible en : <https://www.buscador.portaltecnologica.com/vademecum/esp/producto/TEYCER%20C%20Conservaci%C3%B3n%20I%20B%20GLP>

DE MEDEIROS, H.A., et al. Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. Commercial Formulates of *Trichoderma* Induce Systemic Plant Resistance to *Meloidogyne incognita* in Tomato and the Effect Is Additive to That of the Mi- Scientific Reports, ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep40216.

DRUZHININA, I.S., SHELEST, E. & KUBICEK, C.P. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiology Letters* [en línea], 2012 vol. 337, no. 1, pp. 1–9. [Consulta: 20 enero 2021]. ISSN 0378-1097. DOI 10.1111/J.1574-6968.2012.02665.X. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/337/1/1/599853>.

DRUZHININA, I.S., & otros. “*Trichoderma*: the genomics of opportunistic success”. *Nature Reviews Microbiology* [en línea], 2011 vol. 9, no. 10, pp. 749-759. ISSN 1740-1526. DOI 10.1038/nrmicro2637. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2637>.

DRUZHININA, I.S., & otros. “Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts”. *PLoS genetics* [en línea], 2018 vol. 14, no. 4, pp. e1007322. ISSN 1553-7404. DOI 10.1371/journal.pgen.1007322. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29630596>

ELSHARKAWY, M.M., SHIMIZU, M., TAKAHASHI, H., OZAKI, K. & HYAKUMACHI, M. Induction of Systemic Resistance against Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *The Plant Pathology Journal* [en línea], 2013 vol. 29, no. 2, pp. 193. [Consulta: 20 enero 2021]. DOI 10.5423/PPJ.SI.07.2012.01. Disponible en: </pmc/articles/PMC4174775/>.

FRAC, 2020. Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. Disponible en: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2

FRANCO, O. B. M. & ORREGO, F. A. L. Compatibilidad in vitro de aislados nativos de *Trichoderma* spp. con fungicidas para el tratamiento de semillas. *Investigación Agraria*, [en línea] 2013 [Consulta: 20 enero 2020] vol. 15 Núm. 1 (2013)15(1), 15-22. Disponible: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2305-06832013000100003

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:1 [en línea], 2004 vol. 2, no. 1, pp. 43–56. [Consulta: 20 enero 2021]. ISSN 1740-1534. DOI 10.1038/nrmicro797. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro797>.

HERMOSA, R., & otros. “The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense”. *International Microbiology* [en línea], 2013 16(2), pp. 69-80 [Consultado: 20 enero 2021] ISSN 16181905.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* [en línea], 2003 vol. 87, no. 1, pp. 4–10. ISSN 01912917. DOI 10.1094/PDIS.2003.87.1.4. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>.

HUGHES, K.A., BRIDGE, P. & CLARK, M.S. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of The Total Environment*, 2007 vol. 372, no. 2–3, pp. 539–548. ISSN 0048-9697. DOI 10.1016/J.SCITOTENV.2006.09.016.

INFANTE, D., & otros. “Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatogenos”. *Revista de Protección Vegetal* [en línea], 2009, (La Habana) Vol. 24 No. 1 (2009): pp. 14-21 [Consulta: 21 enero 2021] versión impresa ISSN 1010-2752 versión On-line ISSN 2224-4697. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

KESWANI, C., & otros “Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp”. *Applied microbiology and biotechnology* [en línea], 2014. 98(2), pp. 533-544 [Consulta: 20 enero 2021] Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5344-5>

KIRK, P. M., & otros. Catalogue of life, 2019 Annual Checklist. Obtenido de Catalogue of life, 2019 Annual Checklist: <http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2019/search/all.15/05/2019>

KUBICEK, C.P., et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* 2011 12:4 [en línea], 2011 vol. 12, no. 4, pp. 1–15. [Consulta: 20 enero 2021]. ISSN 1474-760X. DOI 10.1186/GB-2011-12-4-R40. Disponible en: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-4-r40>.

May, LL; Kimati, H. Controle de *Phytophthora parasítica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma*. *Summa Phytopathologica* [en línea] 2000,. 26(1): 52-57 Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=157176&pid=S2305-0683201300010000300015&lng=en

M, C., P & MC, D. *Trichoderma harzianum* enhances tomato indirect defense against aphids. *Insect science* [en línea], 2017 vol. 24, no. 6, pp. 1025–1033. [Consulta: 8 julio 2021]. ISSN 1744-7917. DOI 10.1111/1744-7917.12475. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28475289/>.

MCGRATH, M.T., 2004. What are Fungicides? *The Plant Health Instructor*, DOI 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J.C. *Mofo-branco em soja - ensaios cooperativos* [en línea], 2019 S.l.: s.n. ISBN 978-85-7035-943-8. Disponible en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/208230/1/livro-trichoderma-online-06.01.20.pdf>.

MORÁN-DIEZ, E, et al. The ThPG1 Endopolygalacturonase Is Required for the *Trichoderma harzianum*–Plant Beneficial Interaction. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1021> [en línea], 2009 vol. 22, no. 8, pp. 1021–1031. [Consulta: 20 enero 2021]. DOI 10.1094/MPMI-22-8-1021. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-22-8-1021>.

MONTE, E. “Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology” *International Microbiology*, [en línea] 2001 (4), 1-4. [Consulta: 20 enero 2021]. ISSN 1139-6709. Disponible en: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=journal&issn=1139-6709>

MUÑO, B., & DÍAZ, I. Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo de tabaco. *Redalyc*, 2010 vol. 15, no. 73, pp. 29. ISSN 1696-0866.

National Center for Biotechnology Information 2019. Taxonomy Browser. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HW816241.1.18-06-2019>.

PÉREZ LÓPEZ, E. & RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, R.A. Comparación de dos métodos cromatográficos para determinar clorotalonil en un fungicida comercial. *UNED Research Journal* [en línea], 2019 vol. 11, no. 3, pp. 334–344. ISSN 1659-4266. DOI 10.22458/urj.v11i3.2627. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/5156/515663493010/515663493010.pdf>.

PÉREZ, W. & FORBES, G. ¿Qué es un fungicida? [en línea], 2007 pp. 3–6. Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/003862.pdf>.

REYES, Y; INFANTE & otros. Compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz (en línea) 2012. *Revista de Protección Vegetal*. 27(1): 45-53. Consultado 1 oct. 2012. Disponible en

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000100008

RESENDE, L & otros. “Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento”, *Ciência e Agrotecnologia* [en línea] 2004 56(1) vol.28 no.4 [Consulta: 15 marzo 2021] ISSN. 1413-7054 Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542004000400010

SAMUELS, G., & otros. “*Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*” *Mycologia* [en línea], 2006 94(1), pp. 146-170. [Consulta: 20 enero 2021] ISSN 0027-5514. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15572536.2003.11833257>.

SHORESH, M., HARMAN, G.E. & MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450> [en línea], 2010 vol. 48, pp. 21–43. [Consulta: 10 diciembre 2021]. DOI 10.1146/ANNUREV-PHYTO-073009-114450. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>.

SILVA, A.C.F. da, ROSA, C.R.E. da & MELO, I.S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. *Ciência Rural* [en línea], 1999 vol. 29, no. 3, pp. 395–399. [Consulta: 19 marzo 2021]. ISSN 0103-8478. DOI 10.1590/S0103-84781999000300003. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/cr/a/ffrQbYvdzfJMFb7M4PHb88k/?lang=pt>.

Syngenta Crop Protection AG. (2014). Hoja de Información de Seguridad. [Consulta: 20 enero 2021] Disponible en: https://www.syngenta.com.co/sites/g/files/zhg481/f/mertect_500_sc_0.pdf?token=1573681947

WA, V., S, D., SA, S. & CM, K. Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *The Journal of biological chemistry* [en línea], 2008 vol. 283, no. 28, pp. 19804–19815. [Consulta: 5 febrero 2021]. ISSN 0021-9258. DOI 10.1074/JBC.M802724200. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18487198/>.

WEINDLING, R., “*Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi”. *Phytopathology*, 1932 22(8), pp. 837-845 [Consulta: 22 enero 2021] Disponible en: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjt55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?Refe](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjt55))/reference/ReferencesPapers.aspx?Refe)

WOO, S.L., at al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The Open Mycology Journal* [en línea], 2014 vol. 8, no. 1, pp. 71–126. ISSN 18744370. DOI 10.2174/1874437001408010071. Disponible en: <https://benthamopen.com/contents/pdf/TOMYCJ/TOMYCJ-8-71.pdf>.

ZEILINGER, S., & otros. “Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics”. *Fungal biology reviews* [en línea] 2016 30(2) pp. 74-90 [Consulta: 20 enero 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1749461316300082>



Firmado electrónicamente por:

**CRISTHIAN
FERNANDO
CASTILLO RUIZ**

ANEXOS

ANEXO A: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CON TIABENDAZOL A LAS DIFERENTES DOSIS.




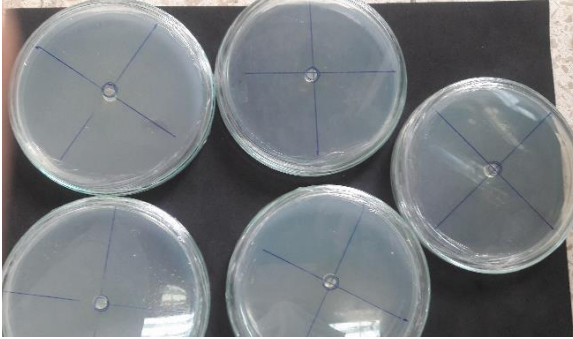
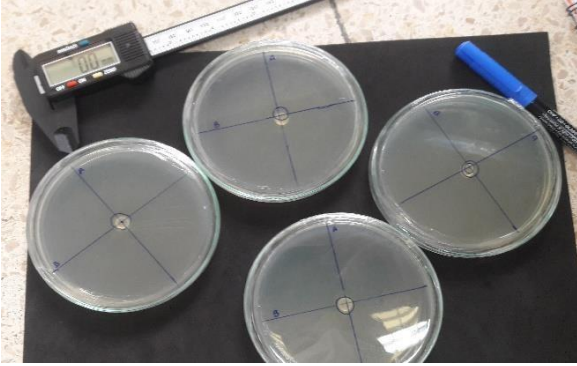
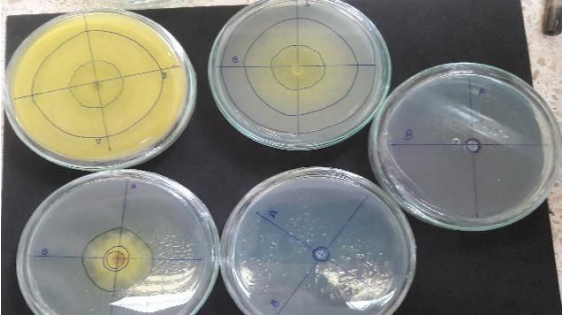
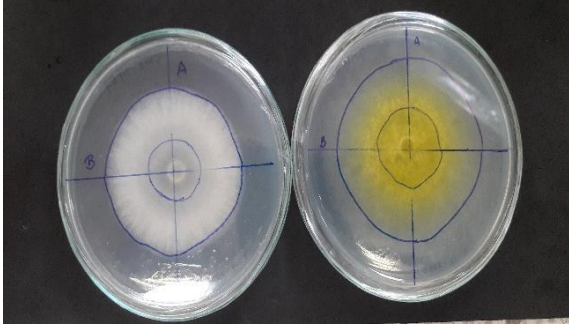
Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO B: GELIFICACION DE SOLUCIONES PARA SU POSTERIOR REPITE DE LOS DOS AISLADOS.




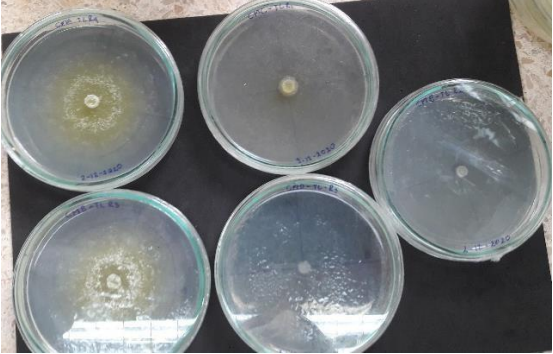
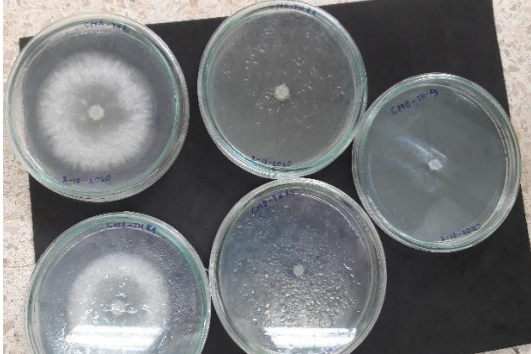
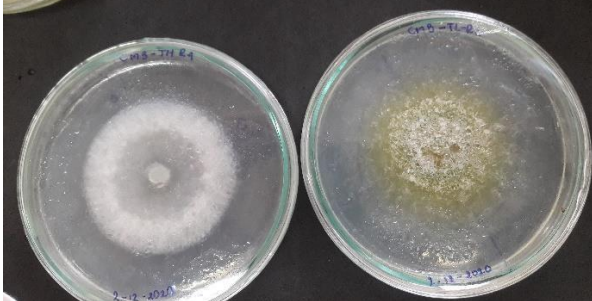

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO C: SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARA EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO.

<p>Verificar el margen del crecimiento</p>	
	
	

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO D: SE REGISTRÓ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO ENMENDADOS CON CONCENTRACIONES DE TIABENDAZOL.

<p>Verificar el margen del crecimiento</p>	
 <p>Crecimiento de <i>T. longibrachiatum</i> enmendado principio activo de Tiabendazol</p>	 <p>Crecimiento de <i>T. harzianum</i> enmendado principio activo de Tiabendazol</p>
 <p><i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> Dosis 0.1 mg/L de principio activo Tiabendazol</p>	 <p><i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> Dosis 1 mg/L de principio activo Tiabendazol</p>

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

**ANEXO E: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON CONCENTRACIONES DE
TEBUCONAZOL A LAS DIFERENTES DOSIS.**

<p>Preparación de solución con fungicida Tebuconazol</p>	
	
	

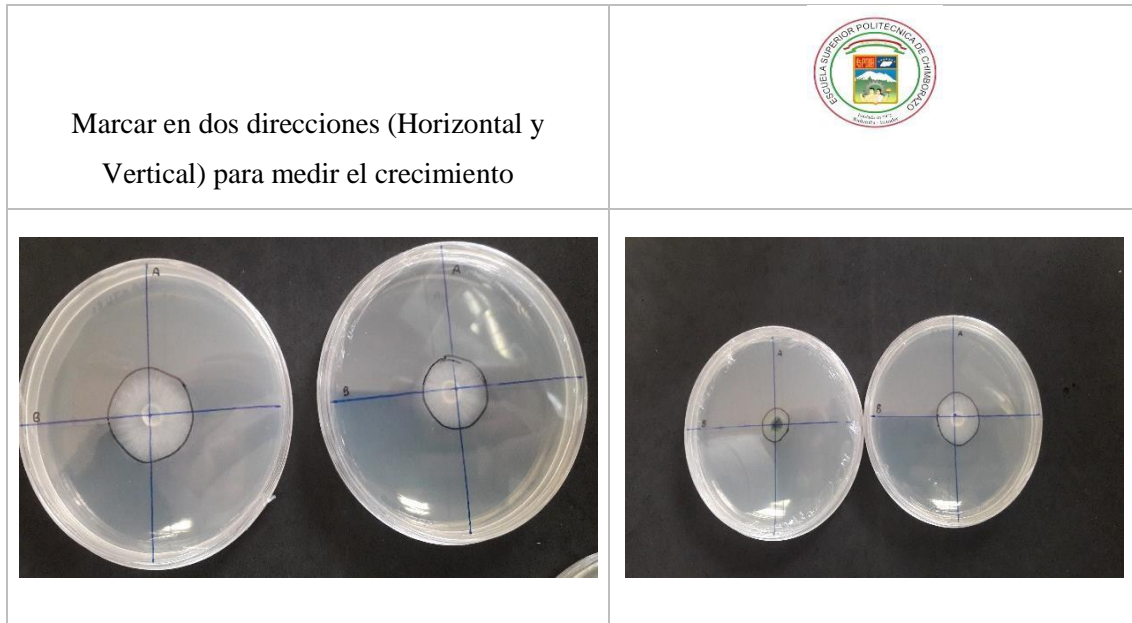
Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO F: SE REALIZÓ EL RESPECTIVO REPIQUE DE CADA UNO DE LOS AISLADOS.



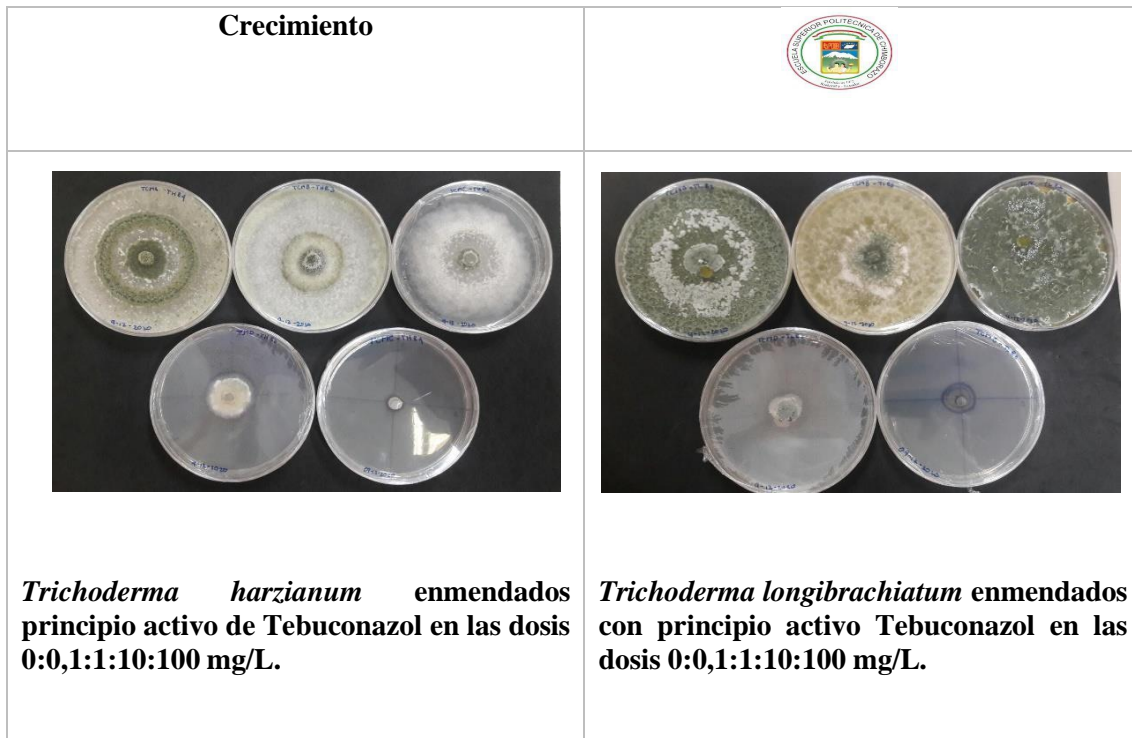
Realizado por: Izurieta, E. 2021.

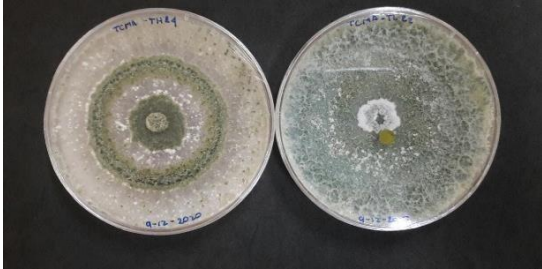

ANEXO G: SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARA EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO.




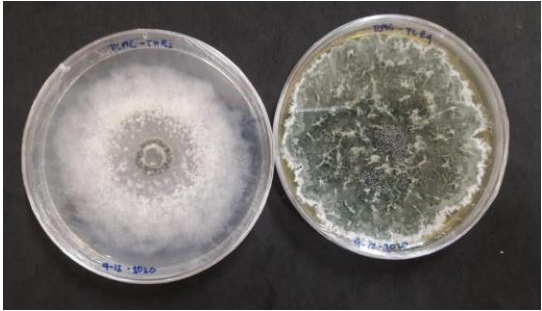

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

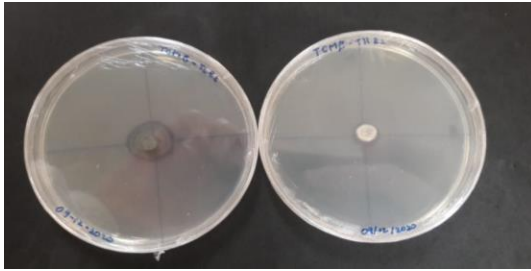
ANEXO H: SE REGISTRÓ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO ENMENDADOS CON CONCENTRACIONES DE TEBUCONAZOL.



 <p data-bbox="337 625 764 716"><i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> Testigos</p>	 <p data-bbox="873 611 1360 730"><i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i> A la Dosis 0.1 mg/L de principio activo Tebuconazol</p>
---	--

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

<p data-bbox="326 1094 773 1129">Verificar el margen del crecimiento</p>	
 <p data-bbox="315 1541 802 1661"><i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i> A la Dosis 1 mg/L de principio activo Tebuconazol en medio PDA</p>	 <p data-bbox="922 1541 1370 1661"><i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i> Dosis 10 mg/L principio activo Tebuconazol en medio PDA</p>



T. longibrachiatum* y *T. harzianum
Dosis 100 mg/L de principio activo
Tebuconazol en medio PDA

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO I: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON CONCENTRACIONES DE AZOXYSTROBIN A LAS DIFERENTES DOSIS.

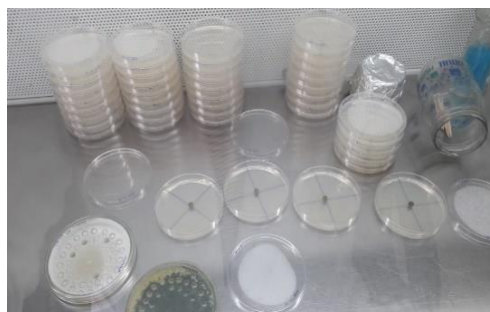
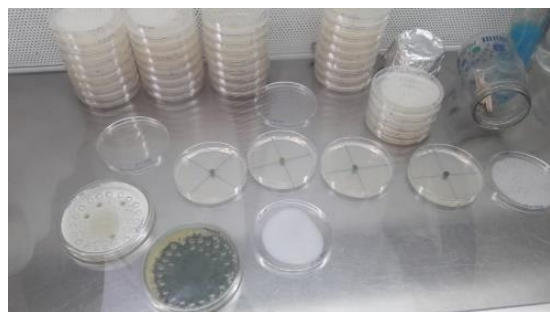
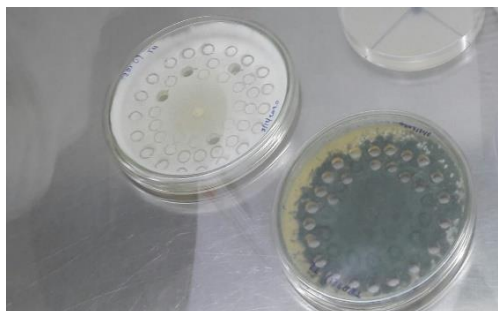
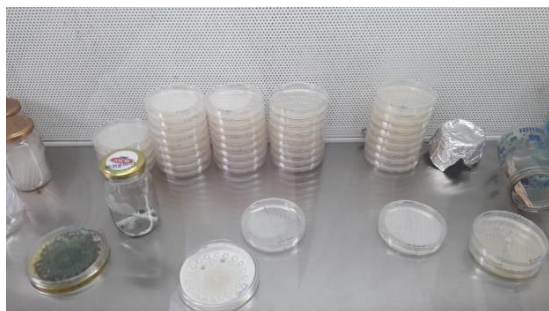
Preparación de solución con fungicida
Azoxystrobin



Realizado por: Izurieta, E. 2021.


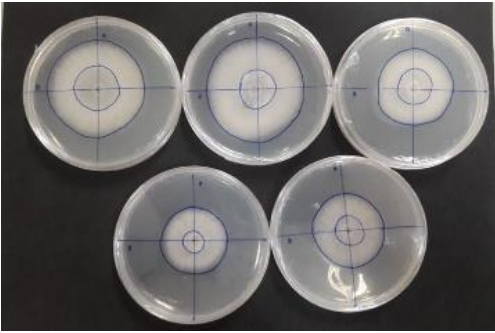
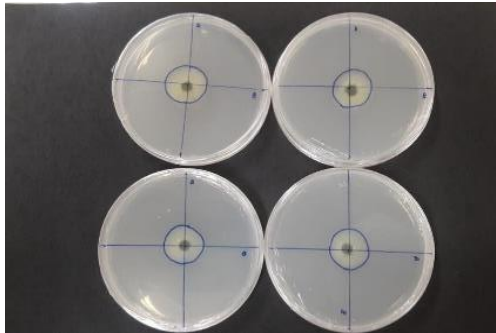
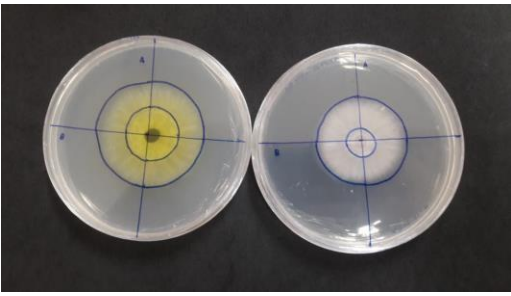
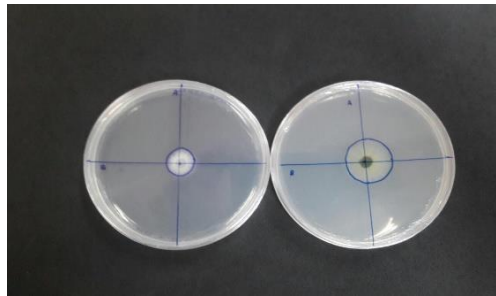
ANEXO J: UNA VEZ SOLIDIFICADO EL MEDIO DE CULTIVO SE PRECEDIÓ AL REPIQUE DE CADA AISLADO.

Repique de aislados *Trichoderma harzianum* y *T. longibrachiatum*




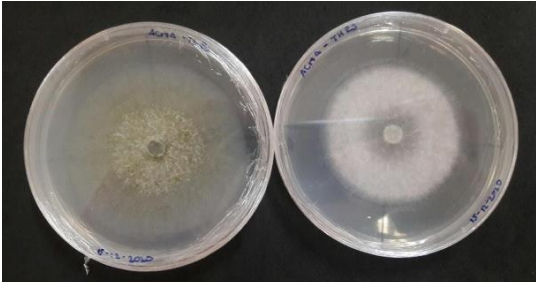
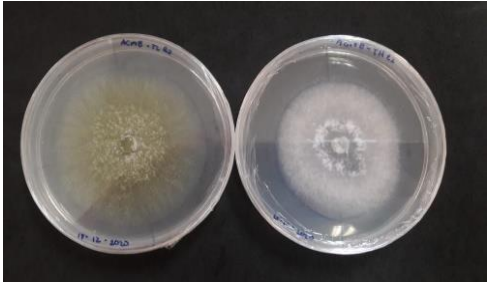


Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO K: SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARÁ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO.

<p>Se marcó el margen de crecimiento en dirección Horizontal y Vertical de los dos aislados</p>	
	
	

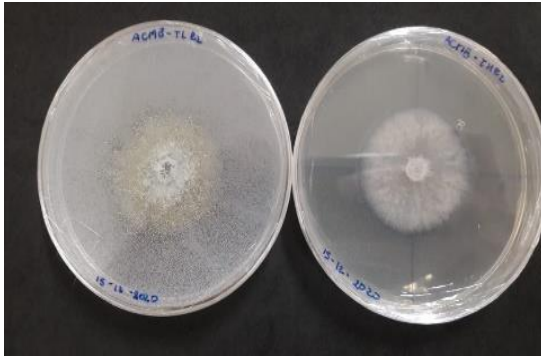
Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO L: SE REGISTRÓ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO EN MEDIO PDA ENMENDADOS CON CONCENTRACIONES DE AZOXYSTROBIN.

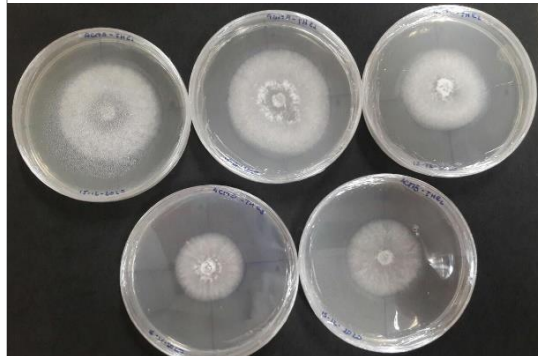
<p>Crecimiento</p>	
 <p>Testigos <i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i></p>	 <p><i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i> Dosis 0,1 mg/L de principio activo Azoxystrobin en medio PDA</p>
 <p><i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i> Dosis 1 mg/L de principio activo Azoxystrobin en medio PDA</p>	 <p><i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i> Dosis 10 mg/L de principio activo Azoxystrobin en medio PDA</p>

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

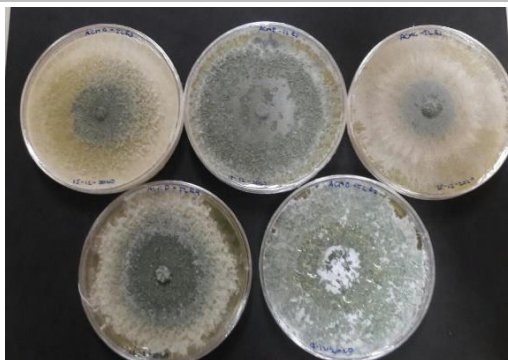
Crecimiento



T. longibrachiatum y *T. harzianum*
Dosis 100mg/L principio activo
Azoxystrobin en medio PDA



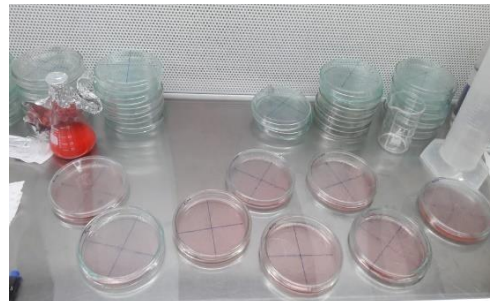
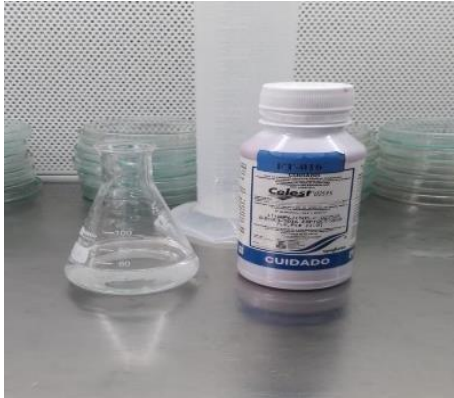
Crecimiento de *Trichoderma harzianum* a
las dosis 0:0,1:1:10:100 mg/l de principio
activo Azoxystrobin en medio PDA a las
144h



Crecimiento de *Trichoderma*
longibrachiatum a las dosis 0: 0,1: 1: 10: 100
144h de principio activo Azoxystrobin en
medio PDA a las 144h


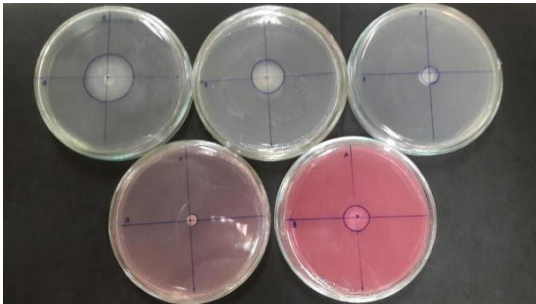
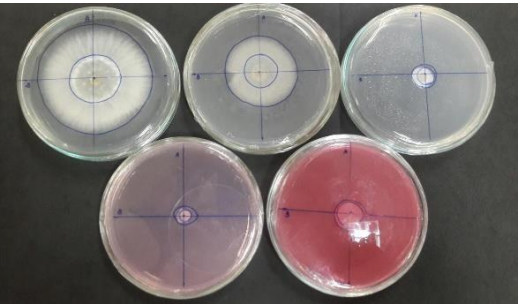
ANEXO M: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CON FLUDIOXONIL PARA LAS DIFERENTES DOSIS.

**Preparación de solución con fungicida
Fludioxonilo**


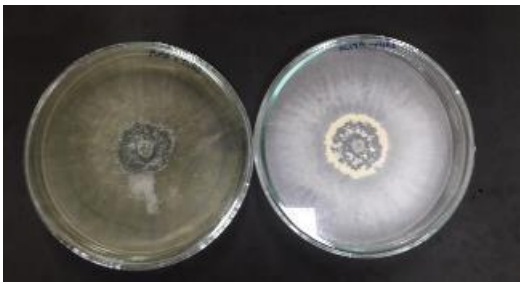
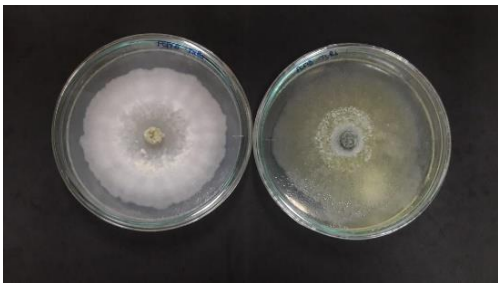


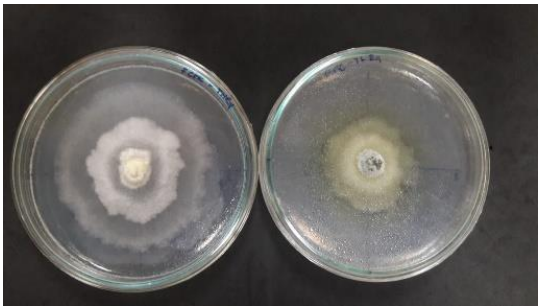
Realizado por: Izurieta, E. 2021.

ANEXO N: SE PROCEDE A MARCAR EN DOS DIRECCIONES Y SE REGISTRARÁ EL CRECIMIENTO DE CADA AISLADO

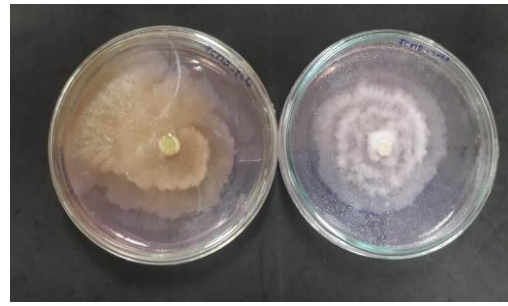
<p>Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> en diferentes dosis de principio activo Fludioxonil</p>	
	

ANEXO O: CRECIMIENTO DE *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma harzianum*.

	
 <p>Testigos <i>T. longibrachiatum</i> y <i>T. harzianum</i></p>	 <p><i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> Dosis 0,1 mg/L de principio activo Fludioxonil.</p>



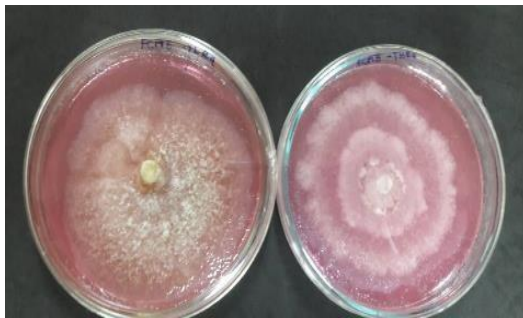
T. harzianum y *T. longibrachiatum*
Dosis 1 mg/L de principio activo
Fludioxonil.



T. longibrachiatum y *T. harzianum*
Dosis 10 mg/L de principio activo
Fludioxonil.

Realizado por: Izurieta, E. 2021.

**Crecimiento de *Trichoderma harzianum* y
T. longibrachiatum en diferentes dosis de
principio activo Fludioxonil**



T. longibrachiatum y *T. harzianum*
Dosis 100 mg/L de principio activo
Fludioxonil.



Trichoderma longibrachiatum
Dosis 0: 0,1: 1: 10: 100 mg/L de
principio activo Fludioxonil a la 144h



Trichoderma harzianum

Dosis 0: 0,1: 1: 10: 100 mg/L de principio activo Fludioxonil a la 144h

Realizado por: Izurieta, E. 2021.