

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE *Trichoderma harzianum*
SOBRE LA INCIDENCIA DE *Fusarium* sp EN EL CULTIVO DE CLAVEL (*Dianthus
caryophyllus*) EN LA EMPRESA ELITE FLOWERS FARMERS S.A.S.**

Mónica Liliana Tribiño Sánchez

Cód. 1.094.271.763.

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Ingeniería Agronómica

Programa de Agronomía

Pamplona

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE *Trichoderma harzianum*
SOBRE LA INCIDENCIA DE *Fusarium* sp EN EL CULTIVO DE CLAVEL (*Dianthus
caryophyllus*) EN LA EMPRESA ELITE FLOWERS FARMERS S.A.S.**

Monica Liliana Tribiño Sánchez

1.094.271.763

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero

Agrónomo

Director:

I.A, Dr. Ana Francisca González Pedraza

Docente Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Ingeniería Agronómica

Programa de Agronomía

Pamplona

Contenido

2. Problema.....	2
2.1 Planteamiento del problema.....	2
2.3 Objetivos.....	4
2.3.1 Objetivo general.....	4
2.3.2 Objetivos específicos.	4
3. Marco de Referencias	5
3.1 Marco Contextual.....	5
3.2 Marco Teórico.....	6
3.2.1 Cultivo de clavel.	6
3.2.2 Proceso de producción.	7
3.3 <i>Fusarium oxysporum</i>	9
3.4 <i>Trichoderma</i> sp.....	9
3.4.1 Mecanismos de acción.	10
3.5 Marco legal.	12
4. Metodología	13
4.1 Variables a evaluar.....	15
4.1.1 Determinación del porcentaje de incidencia de <i>Fusarium</i> sp.....	15
4.1.2 Porcentaje de plantas muertas por <i>Fusarium</i> sp (%).	16
4.2 Variables de Control	16
4.2.1 Esterilización e inoculación del sustrato:	16
4.2.2 Inclinación de camas y Tipo de canal.	16
4.2.3 Control de calidad de producto aplicado.	17
4.2.4 Concentración de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusarium</i> sp.	17
4.2.5 pH, temperatura y humedad relativa.....	18
4.2.6 Aforo de los implementos de aplicación.....	18
5. Materiales	19
5.1 Material Vegetal.....	19
5.2 Otros Materiales.....	19
6. Resultados y análisis	20

6.1	Porcentaje de incidencia de <i>Fusarium sp.</i>	20
6.2	Porcentaje de mortalidad.....	22
6.3	VARIABLES CONTROL.....	24
6.3.1	Esterilización de sustrato	24
6.3.2	Control de calidad.....	24
6.3.3	Concentración y germinación de <i>Trichoderma harzianum.</i>	24
6.3.4	Identificación de hongos en el sustrato.....	27
6.3.5	Presencia de hongos en muestras de agua de riego, lixiviado T1 y escurrido T0 en el control de calidad.....	28
6.3.6	pH.....	30
6.3.7	Temperatura y Humedad relativa.....	31
7.	Conclusiones	33
8.	Recomendaciones	34
9.	Bibliografía	35
10.	Anexos	41

Tabla 1: *Tratamientos de la Evaluación.*..... 15

Tabla 2: *Materiales semanales.* 19

Tabla 3: *Porcentaje de incidencia de Fusarium sp entre los tratamientos en el cultivo de clavel (Dianthus caryophyllus).* 20

Tabla 4: *Porcentaje de incidencia de Fusarium sp entre las variedades Mandalay, Pomarosa y Don Pedro de clavel (Dianthus caryophyllus).* 21

Tabla 5: *Porcentaje de mortalidad entre los tratamientos en clavel (Dianthus caryophyllus).*..... 22

Tabla 6: *Porcentaje de mortalidad entre las variedades Mandalay, Pomarosa y Don Pedro de clavel (Dianthus caryophyllus).* 23

Figura 1. Marco juridico. Tomado de (Guia ambiental para la floricultura), consultado en Septiembre 2017.....	12
Figura 3. Metodología de la esterilización del sustrato de la evaluación del efecto de aplicaciones de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre la incidencia de <i>Fusarium</i> sp, en el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>). Norma DIN 66001:96.....	41
Figura 4. Metodología de la inoculación inicial del sustrato para evaluar el efecto de aplicaciones de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre la incidencia de <i>Fusarium</i> sp, en el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>). Norma DIN 66001:96.....	42
Figura 5. Inclinación de camas para la evaluación de las aplicaciones de <i>Trichoderma harzianum</i> para disminuir la incidencia de <i>Fusarium</i> sp, en el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>).....	43
Figura 6. Aseguramiento tipo de canal para la evaluación de las aplicaciones de <i>Trichoderma harzianum</i> para disminuir la incidencia de <i>Fusarium</i> sp, en el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>).	44
Figura 7. Modelo de reportes en el control de calidad en las muestras de <i>Trichoderma harzianum</i> , solución madre (<i>Trichoderma harzianum</i>), agua de reservorio, escurrido T0, lixiviado T1 para el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>).	46
Figura 8. Modelo de reportes en el control de calidad muestras de sustrato para identificación de <i>Fusarium</i> spp. Y <i>Trichoderma harzianum</i> en el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>).....	47
Figura 9. Reporte de laboratorio para evaluar la presencia de <i>Fusarium</i> sp en el sustrato utilizado en el cultivo de Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	49

Gráfico 1: Presencia de UFC de <i>Trichoderma harzianum</i> por mL de producto comercial y en la solución madre (<i>Trichoderma</i> +agua) de <i>Trichoderma harzianum</i> (Log base 10) en el cultivo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S.	25
Gráfico 2: Porcentaje de germinación de <i>Trichoderma harzianum</i> por mL de producto comercial y en la solución madre (<i>Trichoderma</i> +agua) de <i>Trichoderma harzianum</i> (Log base 10) en el cultivo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S.	26
Gráfico 3: Presencia de UFC /gr de sustrato de <i>Trichoderma</i> sp, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium</i> spp. (Log base 10) en el cultivo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S. (Muestreo mensual).	27
Gráfico 4 y 5: Presencia de UFC/mL de <i>Fusarium</i> sp y de <i>Trichoderma</i> sp (Log base 10) en las muestras de agua de riego (Reservorio 6), escurrido T0 (cama piloto-Mandalay) y lixiviado T1(cama piloto-Mandalay) en el cultivo de clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S. (Muestreo mensual).	29
Gráfico 6: Control semanal del pH de la solución madre de <i>Trichoderma harzianum</i> (Combo Hanna).....	30
Gráfico 7: Promedio semanal de la temperatura ambiente y humedad relativa (Dataloggers).....	31

Lista de anexos

VI

Anexo 1. Esterilización del Sustrato.....	41
Anexo 2. Inoculación inicial del Sustrato.....	42
Anexo 3. Inclinación de las camas, grado de la pendiente.	43
Anexo 4. Tipo de canal y drenaje.	44
Anexo 5. Reportes laboratorio (Control de calidad).....	45
Anexo 6. Reporte laboratorio externo- Muestras de sustrato	47
Anexo 7. Reporte esterilización sustrato	48

The Elite Flower  a touch of class

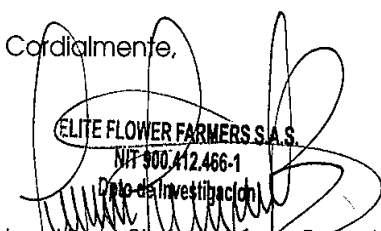
Facatativá, 02 de febrero del 2018

Señores
Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Agrarias
Departamento de Ingeniería Agronómica
Comité trabajo de grado

Por medio de la presente se autoriza a la estudiante en práctica Monica Lilliana Tribiño Sánchez, identificado con cédula de ciudadanía 1.094.271.763 de Pamplona, para realizar la sustentación de su trabajo de grado **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LA INCIDENCIA DE *Fusarium sp.* EN EL CULTIVO DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*) EN LA EMPRESA ELITE FLOWERS FARMERS S.A.S"**.

Se expide a solicitud de la Universidad a los (02) dos días del mes de enero del año 2018.

Cardialmente,


ELITE FLOWER FARMERS S.A.S.
NIT 800.412.466-1
Dpto de Investigación

Ing. Linda Stefany López Bernal
Jefe de Investigación y Desarrollo
Elite Flower Farmer S.A.S
Nit. 800 141 506-1
Teléfono: 8910444 ext. 1199
Celular: 3214906766

Pamplona, 22 de Mayo del 2018.

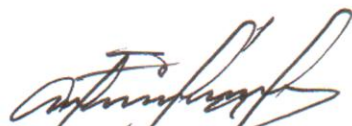
Señores,

Universidad de Pamplona.
Facultad de Ciencias Agrarias
Departamento de Ing. Agronómica
Comité de Trabajo de Grado

Por medio de la presenta se autoriza a la estudiante Monica Liliana Tribiño Sánchez, identificada con cedula de ciudadanía: 1.094.271.763 de Pamplona; para realizar la sustentación de su trabajo de grado **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE *Trichoderma harzianum* SOBRE LA INCIDENCIA DE *Fusarium sp.* EN EL CULTIVO DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*) EN LA EMPRESA ELITE FLOWERS FARMERS S.A.S.”**, como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo de la Universidad de Pamplona.

Sin otro particular.

Cordialmente;



Dra. Ana Francisca González Pedraza
Docente Universitaria
Departamento de Agronomía

Agradecimientos.

A Dios, por los logros alcanzados.

A mis padres y hermanas, por su amor infinito y apoyo incondicional.

A Elite Flowers Farmers S.A.S., especialmente al área de Investigación y Desarrollo por

permitirme crecer como profesional y como persona.

A la Ing. Stefany López y a la entomóloga Karen Peña por acompañarme y apoyarme en este

proceso de aprendizaje.

Al personal de cultivo de Elite Flowers Farmers S.A.S; por hacer de esta experiencia tan

enriquecedora y humana.

A la docente Ana González por su guía durante el desarrollo de esta investigación.

A la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Pamplona, por permitirme desarrollar

mi pasión hacia el Agro como profesional.

Y demás compañeros y docentes que hicieron parte de mi proceso de formación como

profesional integra.

Introducción

La Sabana de Bogotá se ha convertido en el centro de ubicación del sector floricultor de Colombia, el cual desde hace varias décadas constituye uno de los sectores de la economía colombiana con importante presencia en el mercado internacional. En el año 2015, este sector representó el 15.2 % de la producción mundial, convirtiendo a Colombia en el segundo país exportador de flores a nivel mundial después de Holanda (ASOCOLFLORES, 2015).

Según ASOCOLFLORES (2015), durante el año 2015 se cultivaron cerca de 7.000 hectáreas de flores, concentradas en los departamentos de Cundinamarca (72%), Antioquia (27 %) y otros (1%), empleando intensivamente mano de obra no calificada (alrededor de 95.000 empleos directos y 80.000 indirectos), con una participación del 65% de mujeres del total de trabajadores. De igual forma, en 2015, se produjeron y exportaron principalmente rosas (22%), claveles (18%), crisantemos (16%) y otros (44%). En la actualidad se entiende que el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) está catalogado como una variedad significativa en el mercado de la floricultura. En la compañía Elite Flower Farmers S.A.S este cultivo se ubica entre los más importantes después de la Rosa (*Rosa* sp).

Sin embargo, hay factores que afectan directamente tanto la producción como la calidad del producto. Entre éstos, la alta incidencia de *Fusarium* sp Link ex (Grey, 1821) en las plantas bajo condiciones hidropónicas, que sólo permite alcanzar dos picos de cosecha. Por lo tanto, en este trabajo se plantea como alternativa, el uso de *Trichoderma harzianum* como medida de control biológico para la disminución de la incidencia de este patógeno, a fin de evitar pérdidas y sobrecostos para la compañía Elite Flowers Farmers S.A.S.

2. Problema

2.1 Planteamiento del problema

La alta incidencia de las enfermedades vasculares se debe a su fácil propagación a través de esquejes infectados, a su rápida diseminación, alta persistencia del patógeno en el suelo; y al alto costo y la baja eficiencia de las medidas de control utilizadas (León *et al.*, 1993).

En los últimos años se ha observado una disminución en la producción de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en Colombia especialmente por el alto costo que representa el manejo y control de enfermedades, entre éstas el marchitamiento vascular producido por el hongo *Fusarium oxysporum*.

Esta enfermedad se introdujo en Colombia desde 1975 a través de material de propagación infectado procedente de diversos países, y su incidencia ha aumentado progresivamente.

En la sabana de Bogotá las pérdidas debido a la infección por *Fusarium oxysporum* han sido significativas, los productores han tenido que recurrir a la utilización de suelos esterilizados, erradicación temprana de plantas enfermas, uso de variedades resistentes, rotación con otro tipo de plantas y aplicación de fungicidas de origen químico. Sin embargo, estas medidas no han sido suficientes puesto que no erradican por completo la enfermedad y además generan un incremento en los costos de producción y, en el caso de los agroquímicos, éstos contribuyen con la contaminación ambiental (León *et al.*, 1993).

2.2 Justificación

El control de los organismos fitopatógenos del suelo es de los más difíciles de lograr; para ello se han desarrollado prácticas culturales, control biológico y control químico, siendo este último el más utilizado por ser económico y eficaz, en comparación con otras medidas (Rubio *et al.*, 2008).

El impacto ambiental del uso irracional de los plaguicidas químicos en los agroecosistemas ha motivado la búsqueda de alternativas no químicas en el control de plagas y enfermedades. En los últimos años ha cobrado gran importancia la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol en las plantas (Castellanos, 2000).

Trichoderma harzianum ha presentado muy buenos resultados con respecto a la colonización de sustratos y el antagonismo que presenta con los patógenos del Damping off por medio de enzimas extracelulares y las sustancias antibióticas volátiles y no volátiles (Tovar, 2008).

Por estas razones Elite Flowers Farmers S.A.S requiere implementar un control biológico que permita no solo disminuir la incidencia de *Fusarium* sp, si no que sea una estrategia que brinde beneficios, como disminuir la utilización de productos con síntesis química e incrementar la utilización de *Trichoderma harzianum* en toda la compañía y no solo en el manejo de *Fusarium* sp, si no en otras enfermedades que afecten seriamente al cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*) dentro de la empresa.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de *Fusarium sp*, en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en la empresa Elite Flowers Farmers S.A.S.

2.3.2 Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de la aplicación edáfica de *Trichoderma harzianum* sobre el porcentaje de incidencia de *Fusarium sp*, en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) variedades Don Pedro, Pomarosa y Mandalay.
- Calcular el efecto de la aplicación edáfica de *Trichoderma harzianum* sobre el porcentaje de plantas muertas (%), en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) variedades Don Pedro, Pomarosa y Mandalay.

3. Marco de Referencias

3.1 Marco Contextual

Elite Flowers Farmers S.A.S se encuentra ubicada en la Sabana de Bogotá, en municipio de Facatativá, vereda el Corzo; Km 31 vía Bogotá D.C. Elite Flowers Farmers S.A.S, fundada en 1991 por el pionero de la industria Peter Hannaford, Elite Flowers Farmers S.A.S ha pasado de ser una pequeña granja de rosas en Colombia a casi 700 hectáreas. A pesar del rápido crecimiento, 27 años después, sigue siendo una granja familiar de propiedad privada (Hannaford).

Elite Flowers Farmers S.A.S se encuentra dividida en diferentes áreas o departamentos, en los cuales se realizan distintas tareas para que de manera conjunta, pueda generarse el proceso de producción de manera organizada y rentable; una de ellas es el área de investigación y desarrollo encargada de la evaluación de nuevas alternativas y soluciones a distintas problemáticas para ser implementadas en la compañía Elite Flowers Farmers S.A.S (Cardona, 2006).



Figura 1. Elite Flowers Farmers S.A.S. Consultado en Septiembre del 2017 en

www.eliteflowers.com/farms.

3.2 Marco Teórico.

3.2.1 Cultivo de clavel.

El clavel pertenece a la familia de las *Carifiláceas* y al género *Dianthus*, que comprende cerca de 250 especies diferentes. Las más populares son el *Dianthus barbatus* (clavelina), el *caryophyllus* (el clavel común), y el *chinensis* (clavel chino).

Los claveles son reconocidos fácilmente porque son flores cespitosas, es decir, que poseen un tallo subterráneo corto que crece dando matas densas de hasta un metro de altura y de entre 6 y 8.5 centímetros de diámetro.

Los claveles poseen hojas lineales, angostas, opuestas y envainadoras; cada tallo forma una flor terminal de no menos de cinco pétalos festoneados (con ondas) o con dientecillos.

Como los claveles son flores bisexuales, florecen en un grupo ramificado o bifurcado. La flor tiene fuerte fragancia y sus colores más comunes son el rojo, rosado, blanco, amarillo y mixto.

Los claveles florecen todo el año, y en sus variedades comerciales pueden llegar a producir hasta 20 tallos al año (Casavilla, 2011).

3.2.1.1 Necesidades del cultivo.

El clavel prefiere suelos sueltos, porosos con buen drenaje, que faciliten la penetración y el normal desarrollo del sistema radical; se desarrolla muy bien en terrenos de textura franco-arenosa y prefiere terrenos cuyo pH oscile entre 6-5 (Hernandez, 2007).

Las temperaturas óptimas para obtener flores de buena calidad están comprendidas entre los 12 y 14° C durante la noche y entre los 20 y 24° C durante el día.

La humedad relativa idónea, cuando se trata de cultivo en invernadero, oscila entre el 60 y el 70 %. Favorece el desarrollo de la planta y regula la apertura de los estomas, con lo cual la transpiración y la fotosíntesis se realizan con normalidad (Hernandez, 2007).

3.2.2 Proceso de producción.

Propagación

Se efectúa por esquejes de brotes con hojas y micro propagación in vitro. La forma de efectuar el esquejado, es la siguiente:

- 1.- Se toman esquejes procedentes de plantas madre de 10 cm de longitud.
- 2.- Se colocan en invernaderos de multiplicación con instalación de sistema de riego por nebulización y sobre un sustrato compuesto por: Cascarilla de arroz.
- 3.- Se deberá tomar en cuenta la temperatura; deberá ser alrededor de 20°C.

En estas condiciones el enraizado tiene lugar a las tres semanas. Los esquejes son conservados en frío (0.5-1°C). La duración del almacenaje es de 15 días para esquejes enraizados y 2 meses para los no enraizados (Linares, 2014).

Enmallado

Antes de plantar se debe tener instalado el primer nivel de enmallado, debe quedar muy tenso y a una altura de 7 cm sobre el nivel de la mesa. Existen distintos materiales para realizar el enmallado (malla prefabricada, alambre, perlón), sin embargo, la condición a cumplir es que este enmallado debe quedar lo más tenso posible, de no ser así, ninguno de los materiales cumplirá

con el objetivo de mantener erguidas las plantas, por lo que una vez que el cultivo envejezca, este se tenderá, formándose un piso enmarañado que facilita la aparición de enfermedades además de limitar la aparición de brotes por la escasa luminosidad alcanzada en la base de las plantas(Palacios,s.f.).

Plantación

Los claveles se plantan en camas de 1 m de ancho, o bien en bancadas de 25 a 30 cm de profundidad, con pasillos de 40-50 cm. Las plantas pueden estar distanciadas a 15 cm. entre planta y planta, alcanzando 22.272 plantas en 1000 m² de invernadero (Linares, 2014).

Pinzado y desbotonado

Con el despunte, se consigue que la planta ramifique y que las primeras flores sean más largas. Es recomendable, pinzar cerca del suelo por encima del segundo par de hojas verdaderas, así saldrán pocas flores de buena calidad. A éste primer pinzado se le denomina poda simple.

Luego vendrán los procedimientos de doble poda. Este segundo pinzado se efectúa de 30 a 50 días después, sobre las ramificaciones obtenidas del primer pinzamiento, y por encima del tercer nudo. Luego de realizado el pinzado y comenzada la brotación lateral, es necesario encasillar diariamente estos brotes guiándolos dentro de sus correspondientes cuadrículas, con lo que se logra finalmente obtener varas rectas de una excelente calidad. Una vez que aparece el botón floral se debe proceder con el desbotonado, el cual consiste en eliminar los botones laterales, dejando solamente el central (Palacios,s.f.).

Riego

El sistema de riego recomendado para el clavel es por goteo, con tres líneas de riego por cama.

El espaciamiento entre goteros debe ser de 20 cm. El tiempo de riego estará determinado por la necesidad del cultivo, las condiciones climáticas y el sustrato de siembra.

3.3 Fusarium oxysporum

Es un hongo que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado, denominado forma especial según la planta hospedante u hospedantes relacionados que afecte. Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento (Acurio, 2010).

La enfermedad se caracteriza por la aparición unilateral de los síntomas de marchitamiento, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma, a causa de la interferencia en el crecimiento; en estados iniciales en las hojas puede observarse la mitad clorótica y la mitad de un color verde normal. Se observa además un enanismo de los brotes y disminución del crecimiento de la planta, los síntomas de la enfermedad avanzan afectando la planta hacia arriba hasta causar un marchitamiento generalizado y la muerte. Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares es una coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y deshilachamiento de los tejidos sin afectar la médula (Acurio, 2010).

3.4 Trichoderma sp

Es un hongo Deuteromycete cuyo estado sexual es Hypocrea. El hongo *Trichoderma sp* fue identificado por Persoon en el año 1794, aislado de un material recolectado en Alemania, fecha desde la cual el hongo ha sido ampliamente estudiado. *Trichoderma sp* es un hongo aerobio facultativo, que se encuentra de manera natural en diferentes suelos agrícolas y en otras

condiciones, especialmente en aquellas que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición.

Macroscópicamente el hongo presenta un micelio blanco algodonoso, que se torna de color verde, debido a la rápida y abundante esporulación. Es un hongo que posee conidias hialinas, uniceluladas y ovoides, que tienden a agregarse formando masas; presenta un conidióforo hialino, largo y no verticilado. Tiene la capacidad de producir clamidosporas que son globosas o subglobosas, ubicadas en la parte terminal o intermedia de las hifas y miden menos de 15 μm de diámetro; éstas son estructuras de resistencia, vitales e importantes para la sobrevivencia del hongo bajo condiciones adversas (Samuels, 1992).

El rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* sp oscila entre 15 y 30°C, con un óptimo de 25 °C, temperaturas mayores a 30°C limitan el crecimiento y desarrollo del hongo, e inicia la formación de clamidosporas. Las condiciones adecuadas de humedad están en el 70%, sin embargo, tiene la capacidad de crecer en una rango entre 20% y 80%. La condición de pH fluctúa entre 5,5 y 7,5, con un óptimo de 6,6. Si se encuentra en medios con pH alcalinos (por encima de 7,0) tiene la capacidad de acidificar el medio mediante la liberación de ácidos orgánicos (Norte, 2007).

3.4.1 Mecanismos de acción.

Las diferentes especies de *Trichoderma* sp ejercen mecanismos de control mediante: competencia directa (por espacio y nutrientes), producción de metabolitos antibióticos, la inactivación de enzimas del agente patógeno, modificación de las condiciones ambientales,

producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y por micoparasitismo. A

continuación, se describen los tres principales:

- ❖ **Competencia:** la competencia por espacio y/o nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos clásicos de biocontrol de este género. Tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizósfera. Por otra parte, tiene una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, siendo muy versátil para utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que permite colonizar un medio rápidamente, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat (Williams, 2016).
- ❖ **Producción de metabolitos (antibiosis):** el género *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que juegan un papel importante inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. En estas interacciones están involucradas enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso molecular.
- ❖ **Micoparasitismo:** es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica. La última etapa consiste en la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* sp. Se ha encontrado que algunas especies de este hongo, especialmente *Trichoderma harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Lo anterior puede

explicarse por la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes (Williams, 2016).

3.5 Marco legal.

La figura 1 sintetiza el marco jurídico general sobre el cual se debe suscribir la gestión ambiental de las actividades agrícolas, y en particular los cultivos de flores.

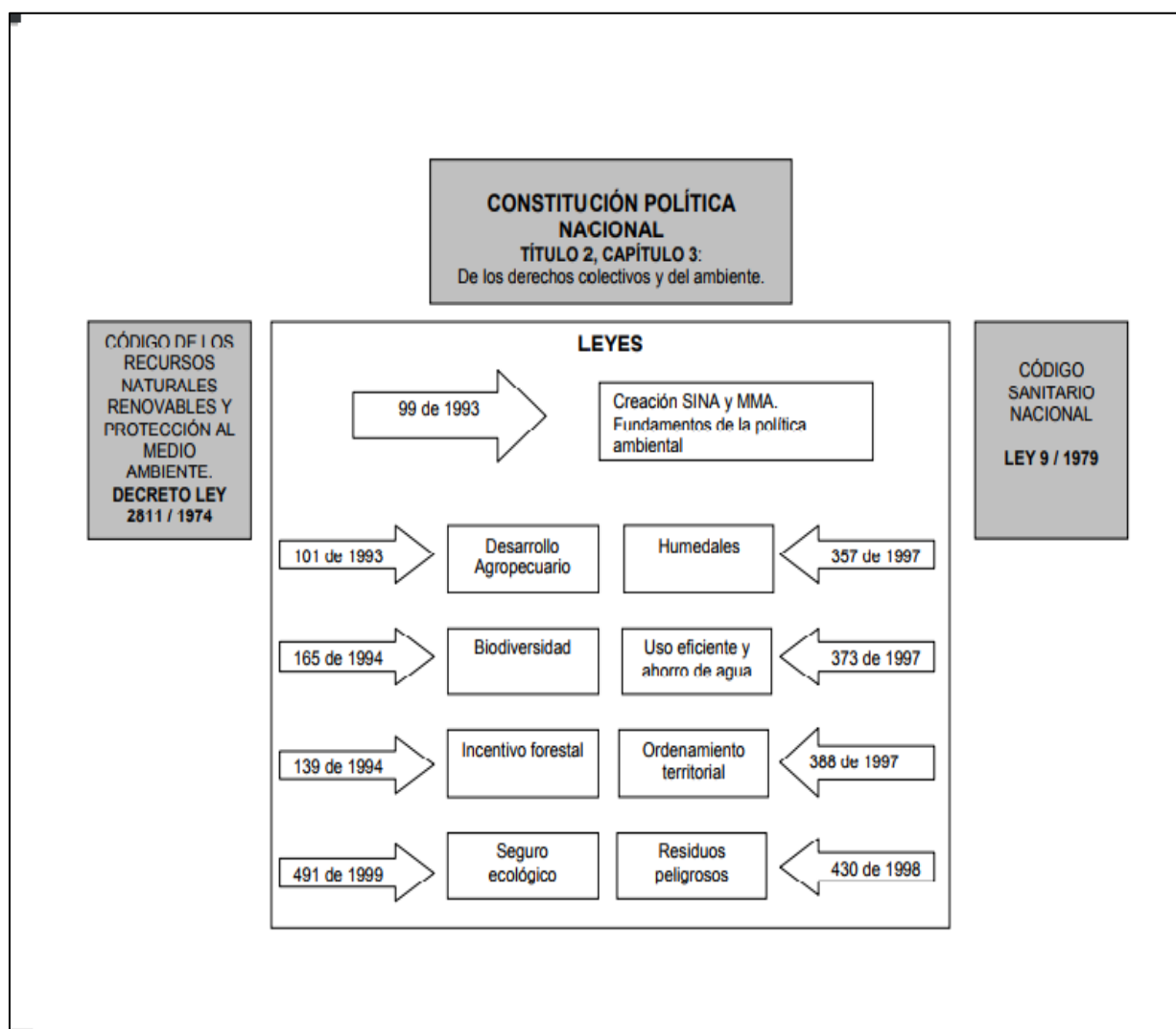


Figura 1. Marco jurídico. Tomado de (Guía ambiental para la floricultura), consultado en Septiembre 2017

4. Metodología

La presente evaluación se llevó a cabo en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*) variedades Don pedro, Pomarosa y Mandalay de la compañía Elite Flowers Farmers S.A.S, con el objetivo de evaluar el efecto de *Trichoderma harzianum* (fermentación líquida) sobre la incidencia de *Fusarium* sp mediante aplicaciones de forma edáfica durante 36 semanas aproximadamente; en las que a su vez se realizaron monitoreos directos para determinar los porcentajes de incidencia de las 9 camas a evaluar para cada tratamiento (T0-Sin aplicación de *Trichoderma harzianum* y T1- con aplicación de *Trichoderma harzianum*).

Variables dependientes:

Porcentaje de incidencia de Fusarium

Porcentaje de mortalidad

Variables independientes:

Tratamiento con aplicación de Trichoderma

Tratamiento sin aplicación de Trichoderma

Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial con tres factores a dos niveles ($2 \times 2 \times 2 = 2^3$).

Factores: Variedades x Tratamientos

Variedades:

V1: Mandalay

V2: Pomarrosa

V3: Don Pedro

Tratamientos:

T0: sin Trichoderma

T1: Con Trichoderma

Combinaciones de tratamientos: v1 x t0

v1 x t1

v2 x t0

v2 x t1

v3 x t0

v3 x t1

Modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + u_{ijk}$$

Donde:

 μ : media global α_i : Efecto del Factor Variedad i, i=1,...,I β_j : Efecto del Factor Tratamiento 2 j, j=1,...,J $\alpha\beta_{ij}$: Interacción de niveles ij u_{ijk} : Componente aleatoria $N(0, \sigma^2)$

Tabla 1: *Tratamientos de la evaluación*

Tratamiento	Producto	Dosis	Volumen de aplicación	Frecuencia de aplicación	Implemento de aplicación	Forma de aplicación
T0	Sin aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i>					
T1	<i>Trichoderma harzianum</i>	1 L cama	80 L cama	Semanal	Cacho Venturi	Edáfica (sustrato)

(Fuente: elaboración propia).

4.1 Variables a evaluar

4.1.1 Determinación del porcentaje de incidencia de *Fusarium* sp

Semana a semana se contaron y marcaron las plantas y tallos con sintomatología de *Fusarium* sp. (amarillamiento de hojas, marchitez) a lo largo de toda la evaluación, para determinar el porcentaje de incidencia de *Fusarium* sp . (Ecuación 1).

$$\text{Porcentaje de incidencia} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas totales}} * 100 \quad (1)$$

Se monitorearon 9 camas para T0 (sin ninguna aplicación de *Trichoderma harzianum*) y 9 camas de T1 (con aplicación de *Trichoderma harzianum*).

4.1.2 Porcentaje de plantas muertas por *Fusarium* sp (%).

Cuando el proceso de colonización realizado por *Fusarium* sp se ve reflejado en la marchitez total de la planta, destrucción de raíces, lo que a su vez provoca la caída o muerte de las plantas (Damping-off), estas son registradas de forma semanal como plantas muertas (%) para la totalidad de las camas evaluadas.

4.2 Variables control

Para asegurar la confiabilidad de este ensayo se realizaron labores como:

4.2.1 Esterilización e inoculación del sustrato:

La mezcla utilizada como sustrato (cascarilla mona, cascarilla tostada y reutilizada) se llevó a una temperatura de 90°C durante un mínimo de 2 horas para su posterior distribución en las camas, a las que se les adicionó 5 kg de *Trichoderma harzianum* a cada una de las 9 camas de T1, se realizó únicamente al iniciarla evaluación (Anexo 1 y 2).

4.2.2 Inclinación de camas y Tipo de canal.

Para el aseguramiento de la pendiente y de la inclinación de las camas se tomó en cuenta los desniveles del suelo y la longitud de las camas (Ecuación 2), esto se realizó para los dos tratamientos (Anexo3).

$$\% \text{ Pendiente} = \frac{\text{diferencia de alturas}}{\text{distancia horizontal}} * 100 \quad (2)$$

De igual forma se implementaron 2 canales de drenaje/cama cada uno de 18 cm de ancho y de 32 m de largo, separados entre sí por una distancia de 9 cm (Anexo 4).

4.2.3 Control de calidad de producto aplicado.

Se tomaron 10 mL de solución madre de *Trichoderma harzianum* y del producto terminado en cada aplicación para realizar el control de calidad; principalmente la concentración de esporas (UFC/MI); la cual se realizó mediante cámara de Neubauer (5 lecturas) y la germinación (%) de los conidios, mediante cultivo en PDA en el que se sembró 1 mL (5 puntos) de la dilución 1×10^3 . Éstas se incubaron por 24 h, transcurrido este tiempo se observó el crecimiento de *Trichoderma* sp., en las capsulas de Petri (Anexo 5).

4.2.4 Concentración de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium* sp.

Mensualmente se tomaron muestras de sustrato para cada uno de los tratamientos enviadas a un laboratorio externo (UFC/g); además de tres muestras en tubos de ensayo de 10 mL, con agua de riego, escurrido T0 y lixiviado T1, con el fin de evaluar la presencia o ausencia de unidades formadoras de colonia por ml de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium* sp, en el medio PDA y rosa bengala.

4.2.5 pH, temperatura y humedad relativa

Se controlaron parámetros fisicoquímicos que pudiesen alterar la viabilidad y efectividad de las aplicaciones como pH y C.E con ayuda del Combo Hanna y dureza del agua origen y de la solución madre de *Trichoderma harzianum* tomando 5 mL de cada una de las muestras, además de la temperatura y la humedad relativa del bloque a aplicar en el cual se encontraba instalado un Datalogger programado para registrar la Humedad y la temperatura a lo largo de la evaluación.

4.2.6 Aforo de los implementos de aplicación.

Las aplicaciones se realizaron en drench y se aplicó un volumen total de 80L/cama, de forma que antes de cada aplicación se calculara el volumen de salida del cacho por unidad de tiempo (seg), con relación al volumen de succión del venturi.

5. Materiales

5.1 Material Vegetal

Cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

5.2 Otros Materiales

Tabla 2: *Materiales semanales.*

ITEM	UNIDAD	CANTIDAD
<i>Trichoderma harzianum</i>	Litros	9
Letreros	Unidad	18
Formatos	Unidad	12
Etiquetas	Unidad	4
Tubos de ensayo	Unidad	4
Venturi	Unidad	1
Combo Hanna	Unidad	1
Kit de Durezas	Unidad	1
Manguera-cacho	Unidad	1

(Fuente :elaboración propia).

6. Resultados y discusión

6.1 Porcentaje de incidencia de *Fusarium sp*

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 3, se observa que la variable porcentaje de incidencia, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos; aceptando así la **H0** con un p-valor de 0.936 (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de incidencia de *Fusarium sp* entre los tratamientos en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Tratamientos	% incidencia
T0 (Sin aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i>)	7.47 ± 0.88 ^a
T1 (Con aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i>)	8.85 ± 1.14 ^a

Valores promedios ± error estándar seguidos de letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (Fuente :elaboración propia).

Estos resultados pudieran ser atribuidos a las bajas concentraciones de *Trichoderma harzianum* aplicadas al T1 (Gráfica1) y a su poca viabilidad debido a las diversas condiciones experimentales. Las condiciones ambientales presentes, tal como lo indica Bae *et al.* (2000) pueden afectar la eficacia del hongo *Trichoderma* la cual es limitada por la fungistasis del suelo, la competencia con otros microorganismos del suelo, una pobre colonización de las raíces, o condiciones ambientales desfavorables.

En relación con la evaluación de la respuesta de las diferentes variedades de clavel, en la tabla 4 se puede observar que la variedad Mandalay presenta diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) en comparación a las variedades Pomarosa y Don Pedro; mientras estas últimas son homogéneas entre sí con un p-valor de 0.12; como lo indican las medias, Mandalay es la variedad con mayor susceptibilidad a *Fusarium* sp, consecutivamente Don Pedro con una media de 6.83 % ; y siendo Pomarosa la de menor porcentaje de incidencia con una media de 3,70 %.

Tabla 4: Porcentaje de incidencia de *Fusarium* sp entre las variedades Mandalay, Pomarosa y Don Pedro de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Variedad	% mortalidad
Mandalay	13,9 ± 1.68 ^a
Don pedro	6,83 ± 0.85 ^b
Pomarosa	3,70 ± 0.49 ^b

Valores promedios ± error estándar seguidos de letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (Fuente :elaboración propia).

En un estudio realizado por Soto *et al.*, (2009) evidencian que líneas con flores de colores enteros son más tolerantes que aquellas líneas cuyas flores presentan patrones de coloración, Mandalay (Hot-Pink) es la única variedad evaluada con patrones de coloración entre rosa y púrpura, mientras que las variedades Don Pedro (Red) y Pomarosa (Pink) son unicolor,

encontrándose así una relación entre el color y la tolerancia, que ésta pueda presentar ante el ataque de *Fusarium* sp.

6.2 Porcentaje de mortalidad

Para el porcentaje de mortalidad se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con una media de 3.51% para el T1 (con aplicación de *Trichoderma harzianum*) en relación con T0 (sin aplicación de *Trichoderma harzianum*.) con un 2,19 %; aceptando así la **H1**, con un p-valor de 0.000 (Tabla 5).

Tabla 5: Porcentaje de mortalidad entre los tratamientos en clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Tratamientos	% mortalidad
b	
T0 (Sin aplicación de <i>Trichoderma h.</i>)	2.19 ± 0.27 ^a
T1 (Con aplicación de <i>Trichoderma h.</i>)	3.51 ± 0.44 ^b

Valores promedios ± error estándar seguidos de letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. (Fuente :elaboración propia).

Para esta variable debemos tener en cuenta que es a partir de la semana 23 de haber iniciado las aplicaciones (36 semanas totales); que el proceso de colonización realizado por *Fusarium* sp da como resultado la marchitez total de la planta, destrucción de raíces, lo que a su vez provoca la caída o muerte de las plantas (Damping-off).

Tabla 6: Porcentaje de mortalidad entre las variedades Mandalay, Pomarosa y Don Pedro de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Variedad	% incidencia
Mandalay	7,00 ± 0,56 ^a
Don pedro	0,99 ± 0.08 ^b
Pomarosa	0,56 ± 0.06 ^b

Valores promedios ± error estándar seguidos por letras minúsculas indican diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad de *Fusarium* sp entre las variedades. (Fuente :elaboración propia).

Al igual que en el porcentaje de incidencia, la variedad Mandalay presentó diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) en comparación a las variedades Pomarosa y Don Pedro en cuanto al porcentaje de mortalidad; mientras estas últimas son homogéneas entre sí con un p-valor de 0.62.

Pese a que *Trichoderma harzianum* ha sido considerado un buen agente de control biológico contra un amplio rango de hongos *in vitro*, no fue posible asegurar que bajo condiciones de campo su eficacia fuese igual a la registrada en el laboratorio (Vélez *et al.*, 1997).

6.3 Variables control.

6.3.1 Esterilización de sustrato

En el aseguramiento realizado al lote #33 utilizado en la siembra de los dos tratamientos; se realizó un conteo de UFC por cada 100 gr de sustrato dando como resultado negativo para *Fusarium sp* en agar Komada (selectivo para *Fusarium sp*). Anexo 7.

6.3.2 Control de calidad

6.3.3 Concentración y germinación de *Trichoderma harzianum*.

El gráfico 1 muestra que la concentración promedio del producto comercial (*Trichoderma harzianum*) en el control de calidad realizado semana a semana fue de 1×10^8 UFC/mL (8UFC/mL Log_{10}) en donde supera la promesa de venta del producto comercial 1×10^6 UFC/mL (6 UFC/mL Log_{10}).

Estas concentraciones se aproximan a las reportadas por Sánchez *et al.*, (2001), quienes produjeron en caldo de avena al 6% un inóculo de 1×10^7 UFC/mL, es decir 7UFC/mL (Log_{10}), ni a las reportadas por Pérez, et al., (2000), en su tesis donde reportan $9,5 \times 10^9$ conidios/mL.

La concentración presente en la solución madre (*Trichoderma* + agua) fue de 6 UFC/mL (Log_{10}), por lo tanto, no cumple con la concentración requerida para un antagonismo; ya que ésta presenta una dilución más con el agua del hidrante para completar el litraje requerido por cada cama (80 L). Según Castellanos (2017) la concentración mínima por m^2 es de 1×10^8 UFC ,es decir 8 UFC/ml (Gráfico 1).

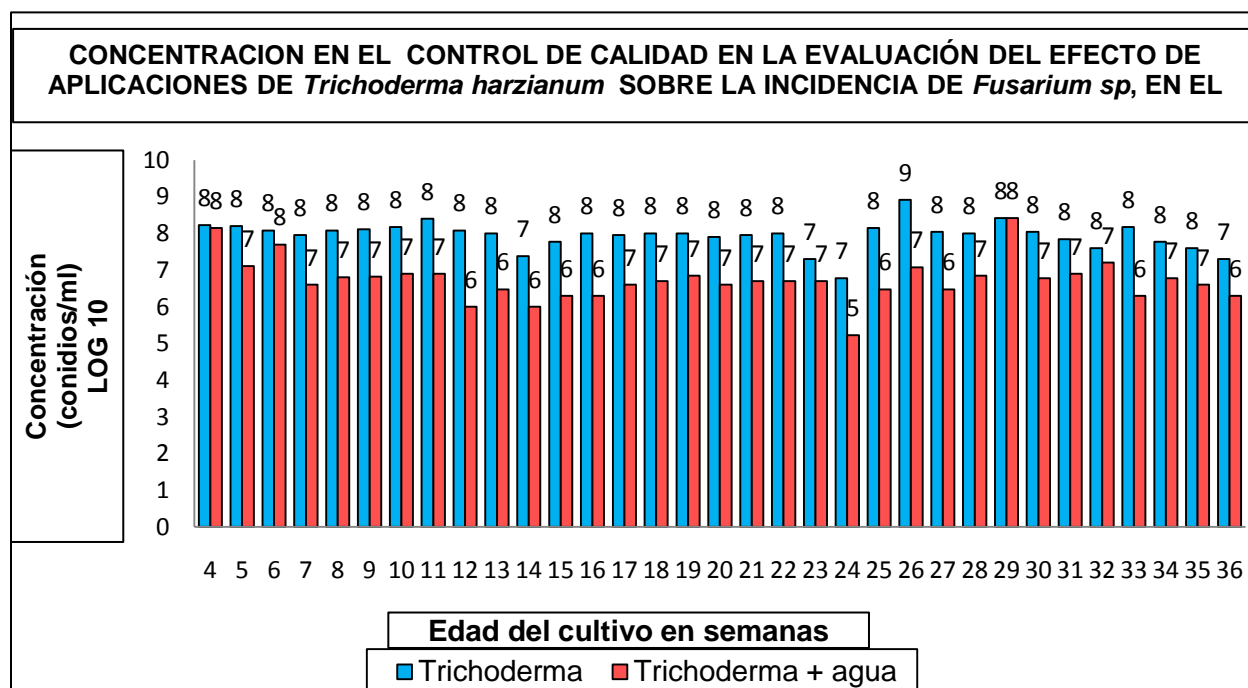


Gráfico 1: Presencia de UFC de *Trichoderma harzianum* por mL de producto comercial y en la solución madre (*Trichoderma* + agua) de *Trichoderma harzianum* (Log base 10) en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S. (Fuente: elaboración propia).

El porcentaje de germinación promedio del Producto comercial fue del 70% (Gráfico 2), de forma tal que no cumple los parámetros mínimos establecidos para el mismo por la compañía ya que este debe ser del 80%. De igual forma, no se cumple con los requisitos para el control de calidad establecidos por CENICAFE (Vélez *et al.*, 1997), en donde el porcentaje de germinación para una formulación o producto comercial debe ser superior al 85% para un periodo de incubación de 24 horas.

Al relacionar el porcentaje de germinación del producto comercial con el de la solución madre este disminuye en un 10% o más, pues en la mayoría de los casos es menor del 60%, siendo este poco efectivo sobre el blanco a atacar; ya que en la medida en la que un producto pierde su viabilidad, se reduce su capacidad de establecerse en el campo.

La fermentación líquida facilita la obtención de una alta concentración del microorganismo pero representado en micelio y clamidiosporas estructuras no aptas para sobrevivir a condiciones adversas y en consecuencia débiles para el establecimiento en nuevos hábitats (Chávez, 2006).|

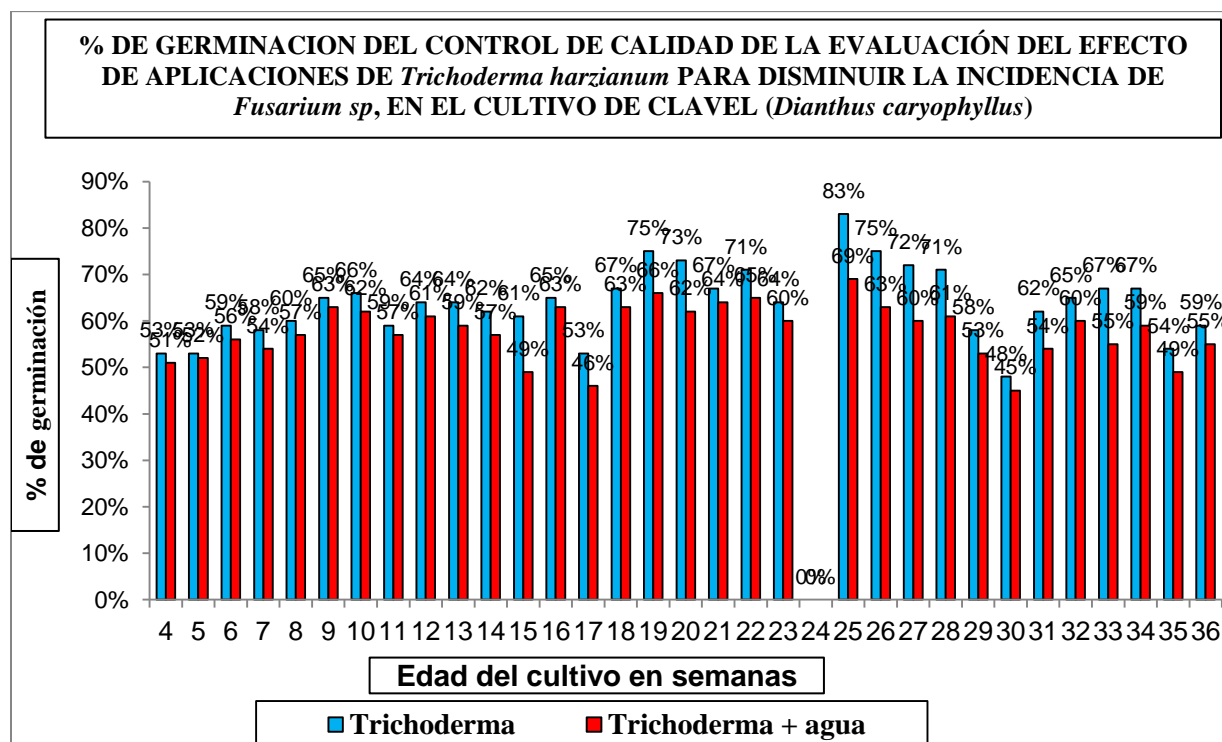


Gráfico 2: Porcentaje de germinación de *Trichoderma harzianum* por mL de producto comercial y en la solución madre (*Trichoderma* +agua) de *Trichoderma harzianum* (Log base 10) en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S.(Fuente: elaboración propia).

6.3.4 Identificación de hongos en el sustrato.

El gráfico 3 muestra la presencia de UFC (Unidades formadoras de colonia) por gramo de sustrato tanto para las diversas especies de *Fusarium* spp. como para *Trichoderma harzianum* hasta la semana 29, esto permitiría dudar del mecanismo de acción (competencia) utilizado por *Trichoderma harzianum*.

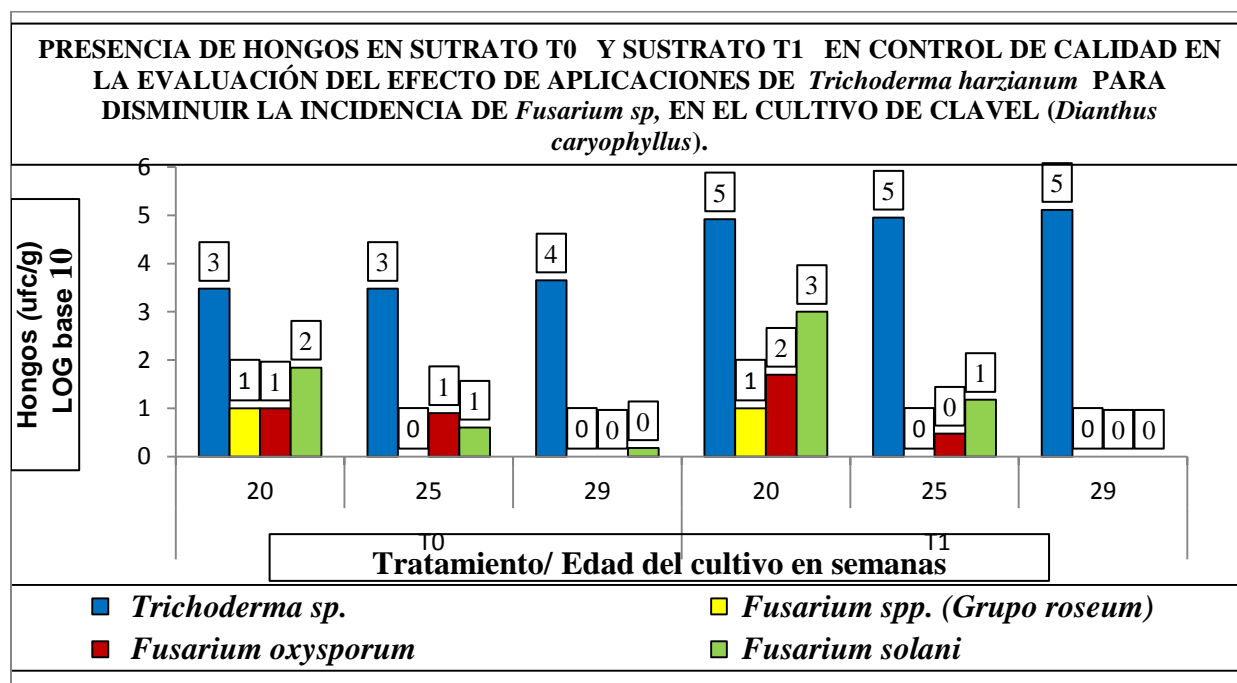


Gráfico 3: Presencia de UFC /gr de sustrato de *Trichoderma* sp, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium* spp. (Log base 10) en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S. (Muestreo mensual).(Fuente: elaboración propia).

Al respecto Odum (como lo cita Nicao, 2002) señala que la competencia se torna importante cuando existen dos o más especies estrechamente relacionadas y adaptadas al mismo sitio, sí la competencia es rigurosa, una de las especies puede ser eliminada por completo o forzada a

emigrar a otro sitio; las especies involucradas pueden ser capaces de vivir juntas a densidades reducidas compartiendo los recursos de manera equilibrada.

6.3.5 Presencia de hongos en muestras de agua de riego, lixiviado T1 y escurrido T0 en el control de calidad.

En los gráficos 4 y 5, se observa la presencia de *Fusarium* sp y de *Trichoderma harzianum* para las muestras mensuales de:

- ❖ Agua de riego, la cual es negativa para *Fusarium* sp y positiva para *Trichoderma harzianum* en cada uno de los 7 muestreos; y aunque en concentraciones bajas (3-4 UFC/mL) se le atribuye al manejo del sistema de riego ya que utilizan los mismos instrumentos para todo el bloque incluyendo el T1, donde pueden permanecer esporas.
- ❖ El escurrido T0 reporta UFC tanto para *Trichoderma harzianum* presente en el agua de riego del Reservorio, como para *Fusarium* sp, este puede encontrarse en el ambiente aun cuando éstos hayan sido controlados; como lo indica Garibaldi, (citado en Garcés *et al.*, 2001) una de las principales fuentes de diseminación es el suelo contaminado en donde el hongo puede sobrevivir muchos años a través de las clamidiosporas. El agua puede ser un agente de diseminación del hongo *Fusarium* sp, debido a su capacidad para sobrevivir en ese medio; las esporas pueden germinar en ella y contaminar los reservorios. El aire puede transmitir el patógeno en suelo contaminado.
- ❖ Lixiviado T1 para *Trichoderma harzianum*, nos muestra el número de UFC más alto de las muestras, lo que pone en evidencia la gran cantidad de producto (*Trichoderma harzianum*) que se drena inmediatamente después de la aplicación. Siendo así el

principal inconveniente que presenta la cascarilla de arroz, su baja capacidad de retención de humedad y lo difícil que es lograr el reparto homogéneo de la misma (humectabilidad) cuando se usa como sustrato único en camas o bancadas (Calderón, 2003).

La humedad del suelo o sustrato afecta directamente a los microorganismos, cuando las estructuras de resistencia (esporas) de los antagonistas son lavadas, pierden su capacidad germinativa (Adams, 1986).

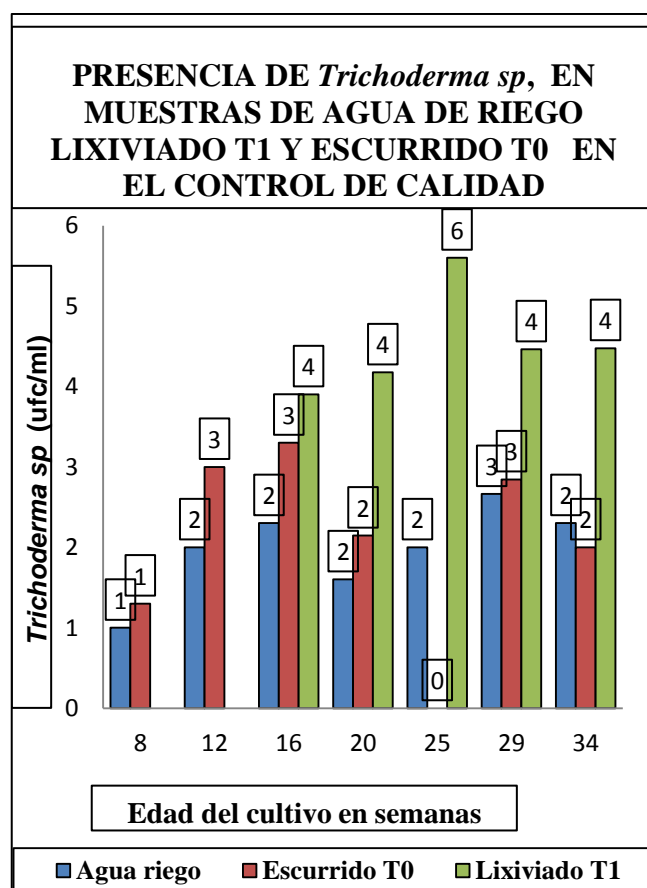
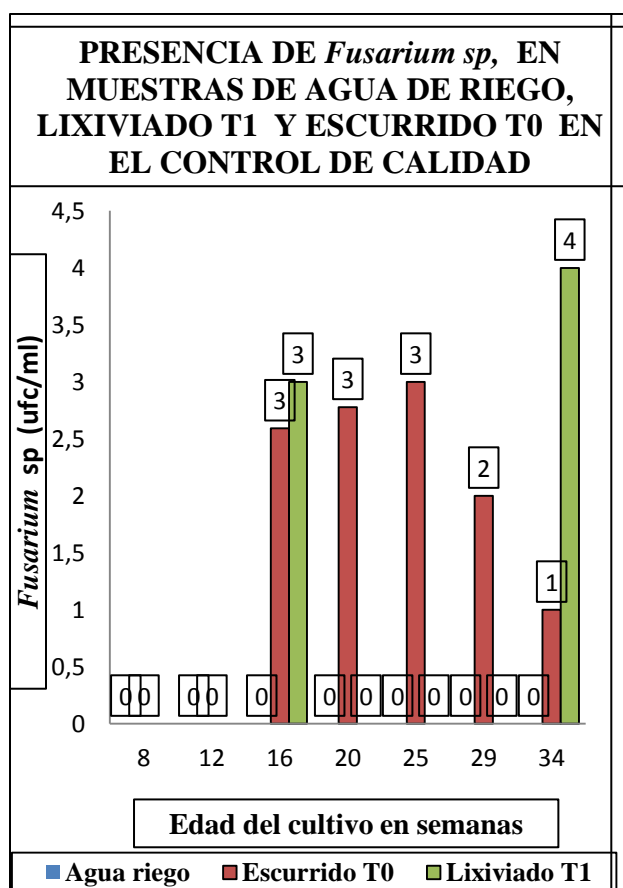


Gráfico 4 y 5: Presencia de UFC/mL de *Fusarium sp.* y de *Trichoderma sp.* (Log base 10) en las muestras de agua de riego (Reservorio 6), escurrido T0 (cama piloto-Mandalay) y lixiviado T1 (cama piloto-Mandalay) en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en la Empresa Elite Flowers Farmers S.A.S. (Muestreo mensual). (Fuente: elaboración propia).

6.3.6 pH

Los valores de pH para *Trichoderma harzianum* (Grafica 6) se encuentran en un rango aceptable (4,1-7,1) para su óptimo crecimiento y germinación. Según Dutta (2003) *Trichoderma* sp es capaz de crecer en una amplia gama de pH de 2,0 a 6,0 con tasas de crecimiento máximas en 4,0, siendo la gama óptima entre 4.6 a 6.8

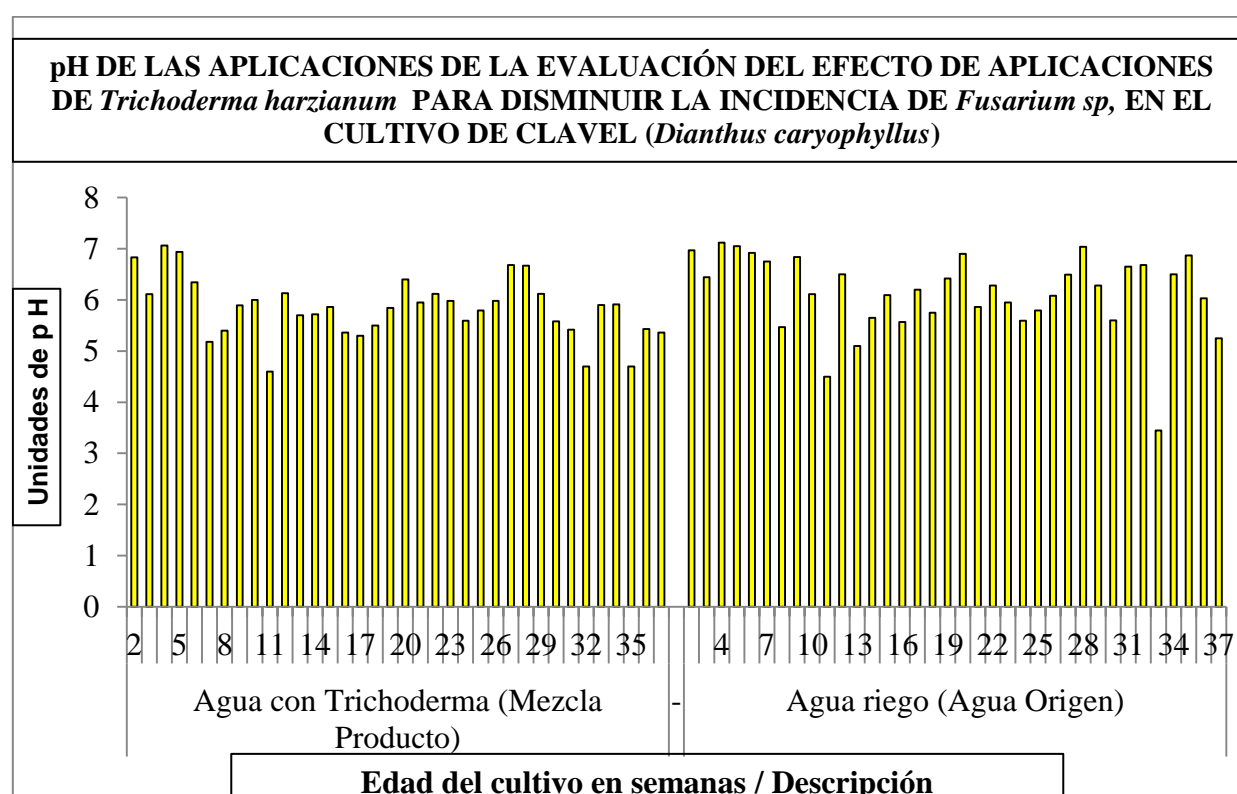


Gráfico 6: Control semanal del pH de la solución madre de *Trichoderma harzianum* (Combo Hanna).(Fuente: elaboración propia).

6.3.7 Temperatura y humedad relativa

Varios estudios han evaluado el efecto de la temperatura en la germinación de esporas y el crecimiento del tubo germinal, crecimiento del micelio, habilidades competitivas y producción de metabolitos volátiles y no volátiles en las especies de *Trichoderma*, estableciendo que la temperatura optima de crecimiento difiere entre las diferentes especies (Kredics y col., 2003).

En este caso no se observan variaciones drásticas en la temperatura que puedan influir en el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma harzianum* como antagonista en la marchitez vascular, ya que se mantienen entre los valores de temperatura optima de los 15° y 30°, Según Nampoothiri *et al.* (2004), igual que la mayoría de los hongos, estos se desarrollan en rangos de temperatura mesofílicos entre 10° y 40° C, siendo el rango óptimo entre los 15° y 30°C.

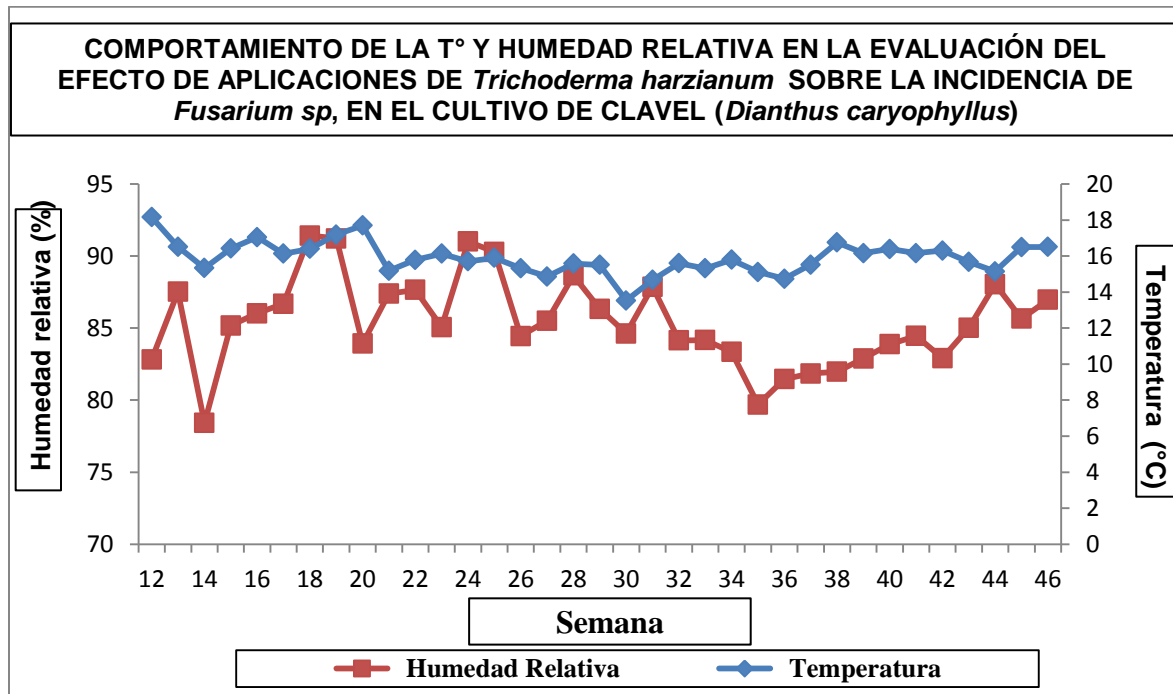


Gráfico 7: Promedio semanal de la temperatura ambiente y humedad relativa (Dataloggers). (Fuente: elaboración propia).

7. Conclusiones

- ❖ *Trichoderma harzianum* no ejerció ningún mecanismo de control ante *Fusarium* sp en el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*); ya que no existen diferencias significativas entre los tratamientos T0 y T1 (Sin aplicación de *Trichoderma harzianum* y con aplicación de *Trichoderma harzianum* respectivamente).
- ❖ La variedad Mandalay mostró mayor susceptibilidad ante *Fusarium* sp ya que presenta diferencias altamente significativas ante las variedades Pomarosa y Don Pedro; en cuanto a los porcentajes de incidencia y mortalidad.

8. Recomendaciones

- ❖ Se recomienda evaluar el desarrollo de *Trichoderma harzianum* en relación con las condiciones del sustrato tales como temperatura, humedad, pH y C.E además de diversos tipos de sustratos.
- ❖ Evaluar diversas concentraciones de *Trichoderma harzianum* que permitan determinar la dosis optima por m²; teniendo en cuenta las propiedades del sustrato.
- ❖ Realizar una prueba de antagonismo de *Trichoderma harzianum*, con los microorganismos presentes en el sustrato, para identificarlas posibles interacciones (antagónicas o sinérgicas) entre éstos.

9. Bibliografía

- Acurio, R. (2010). Técnicas de prevención y control de *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi* en clavel *Dianthus caryophyllus* y su incidencia en la productividad. Tesis de grado previo a la obtención del título de Magister en Gestión de la Producción de flores y frutas andinas para la exportación. Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad técnica de Ambato. 114 pp. Centro de estudios de posgrado Consultado en línea en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1868/1/tesis-010%20Gesti%C3%B3n%20de%20la%20prod.%20de%20flores%20y%20Frut....pdf>
- Adams, P. B. (1986). Effects of soil temperature, moisture and depth on survival activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotiorum*. Plant Disease, 7: 170 - 174.
- Aguilar, J. (2009). Alternativas de aprovechamiento de la cascarilla de arroz en Colombia. Monografía. Universidad del Sucre, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Agrícola, Sincelejo. 94 pp. Colombia.
- ASOCOLFLORES (2002). Guía ambiental para la floricultura. (1): 21. Consulta en línea en Septiembre del 2017: <http://www.asocolflores.org>.
- ASOCOLFLORES (2015). Cifras estadísticas. Consultado en línea en Septiembre del 2017: <http://www.asocolflores.org/servicios/cifras-estadisticas/36>.
- Bae, Y. y Knudsen, G. (2000). Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β -glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for

monitoring fungal growth and activity in natural soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: (2): 810-812. Consultado en Mayo del 2018 de:

<http://aem.asm.org/content/66/2/810.short> .

Cardona, C. (2006). Directora Departamento investigación y desarrollo-Elite Flowers Farms. Facatativá, Colombia. [Actualización de estado LinkedIn]. Consultado en Noviembre del 2017 de <https://www.linkedin.com/in/carolina-cardona-arrieta-22202750/>.

Casavilla, D. (2011). Cultivo de claveles: reproducción, siembra, cuidados y variedades. Flor de planta. Recuperado en Septiembre de 2017 <http://www.flordeplanta.com.ar/jardin/cultivo-de-claveles-reproduccion-siembra-cuidados-y-variedad>.

Castellanos, L., Santana, T. y A. Pérez, A. (1996). Evaluación de varias cepas de *Trichoderma* spp. contra enfermedades radiculares en vivero de café. En: Resúmenes V Jornada Científico Técnico de Sanidad Vegetal. Cienfuegos.57 pp. Recuperado en : https://www.researchgate.net/profile/Leonides_Castellanos/publication/313469479_Proseccion_de_hongos_antagonistas_en_la_provincia_de_Cienfuegos_Efectividad_y_posibilidades_de_reproduccion_de_cepas_nativas_de_Trichoderma/links/589b3c80aca2721ae1b7801c/Proseccion-de-hongos-antagonistas-en-la-provincia-de-Cienfuegos-Efectividad-y-posibilidades-de-reproduccion-de-cepas-nativas-de-Trichoderma.pdf.

Chávez, M. (2006). Producción de *Trichoderma* sp y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Presentado como requisito parcial para optar al título de Microbióloga Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia

Universidad Javeriana. 178 pp. Bogotá. Consultado en línea en mayo del 2018 de:

<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>.

Dutta S, B. S. (2003). Efecto de diferentes niveles de pH y temperatura sobre el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma*. *Environ Ecol*. 21: 770-773.

Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., Valencia, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia .*Acta Biológica Colombiana* 6(1):19.

Hannaford, J. C. (2017). The Elite Flower. A touch of class. Recuperado en Noviembre del 2017 de: <http://www.eliteflower.com/family-roots/>.

Hernandez, J. (2007). El clavel para flor cortada. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Publicaciones de Extension Agraria Corazón de María, 8- Madrid-2. Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 4/83: 1-24.

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekere, A., Kevei, F. and Nagy, E. (2003), *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1); 37–42 .Recuperado en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203002826> .

León, J., Arbeláez, G., González, M., Molina, J. C., Parra, J., Guzmán, J., Ferney, A. J., Álvarez, J. D. (1993). Control integrado del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi*. *Agronomía colombiana*. 10 (1): 68-

89. Consultado en línea:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21246>.

Linares, H. (2014). Producción del clavel en invernadero. Manual del participante.

Recuperado en Septiembre de 2017, de

https://docs.google.com/file/d/0B76_eszGsPc4MmIxMjE0ODAtZTljYi00ZjcxLWFmNWYtYWlXNTNiNzFkZDI1/edit?hl=es&pli=1.

Nampoothiri, K., Baiju, T., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. and Pandey A. (2004).

Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*.

Process Biochemical. (39); 1583-1590. Recuperado en

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959203002827>.

Nicao, M. (2002). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos.

Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

Tesis para optar al grado de Master en Ciencias Agrícolas. Universidad Agraria de La Habana. 72 pp. Cuba.

Norte, A. (2007). "Trichoderma". Revista digital SpainBonsai N°1.

Palacios, J. (s.f.). Cultivo de clavel. Curso de Floricultura. Educación continuá. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú. Recuperado en Mayo del 2018 de:

http://www.academia.edu/12619036/Cultivo_de_Clavel.

- Pérez, L., Ramirez, C., Martinez, N., Algecira, N. (2000). Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Trabajo de grado. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Rubio, R. G., Baltodano, S. F., Abanto, C. L., Wilson, K. J., & Muñoz, R. M. (2008). Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. Revista Biológica de la Universidad de Trujillo, Perú, 28(2), 34-46.
Recuperado de:
https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/43358/50649.
- Samuels G, J. (1992). Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research 100: 7-12 . Recuperado en Mayo del 2018 en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756296800438>.
- Samuels, G. J. (2006). Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology. Symposium The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96 (2): 195-206. Consultado en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-96-0195>.
- Sanchez, P., Sandon, A., Martinez M., Franco, M. y Pedroza, A. (2001). Evaluación de cepas antagonistas de *actinomycetos* y de *Trichoderma* sp aisladas a partir de suelos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. Trabajo de grado. Microbiología industrial. Universidad Javeriana. Bogotá.
- Soto C., Pabón E., Duarte J. (2009). Relación entre el color de la flor del clavel (*Dianthus caryophyllus*) y la tolerancia a patógenos del género *Fusarium*. Tesis de grado previo a la obtención del título de Magister en Biología aplicada, Facultad de Ciencias. Universidad

Militar de Nueva Granada. Colombia. pp 14. Recuperado

de: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/2125/1664>.

Tovar, J. C. (2008). Evaluacion de la capacidad antagonista " in vivo" de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatogeno *Rizhotoni solani*. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al titulo de Microbiologo agricola y veterinario. Facultad de Ciencias. Universidad Javeriana. pp 81. Bogota .

Vélez, A., Posada, F., Marín, M., Gonzales, G., Osorio, V. y Bustillo P. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín técnico CENICAFE #17:1-34.

Williams, R. (2016). ¿Qué es el hongo *Trichoderma*, mecanismos de acción, usos: Control de hongos fitopatógenos. Artículo de Informaciones agronomicas. Recuperado en Septiembre de 2017, de : <https://agronoticias2012.blogspot.com.co/2016/05/que-es-el-hongo-trichoderma-mecanismos.html>.

10. Anexos

1. Esterilización del Sustrato.

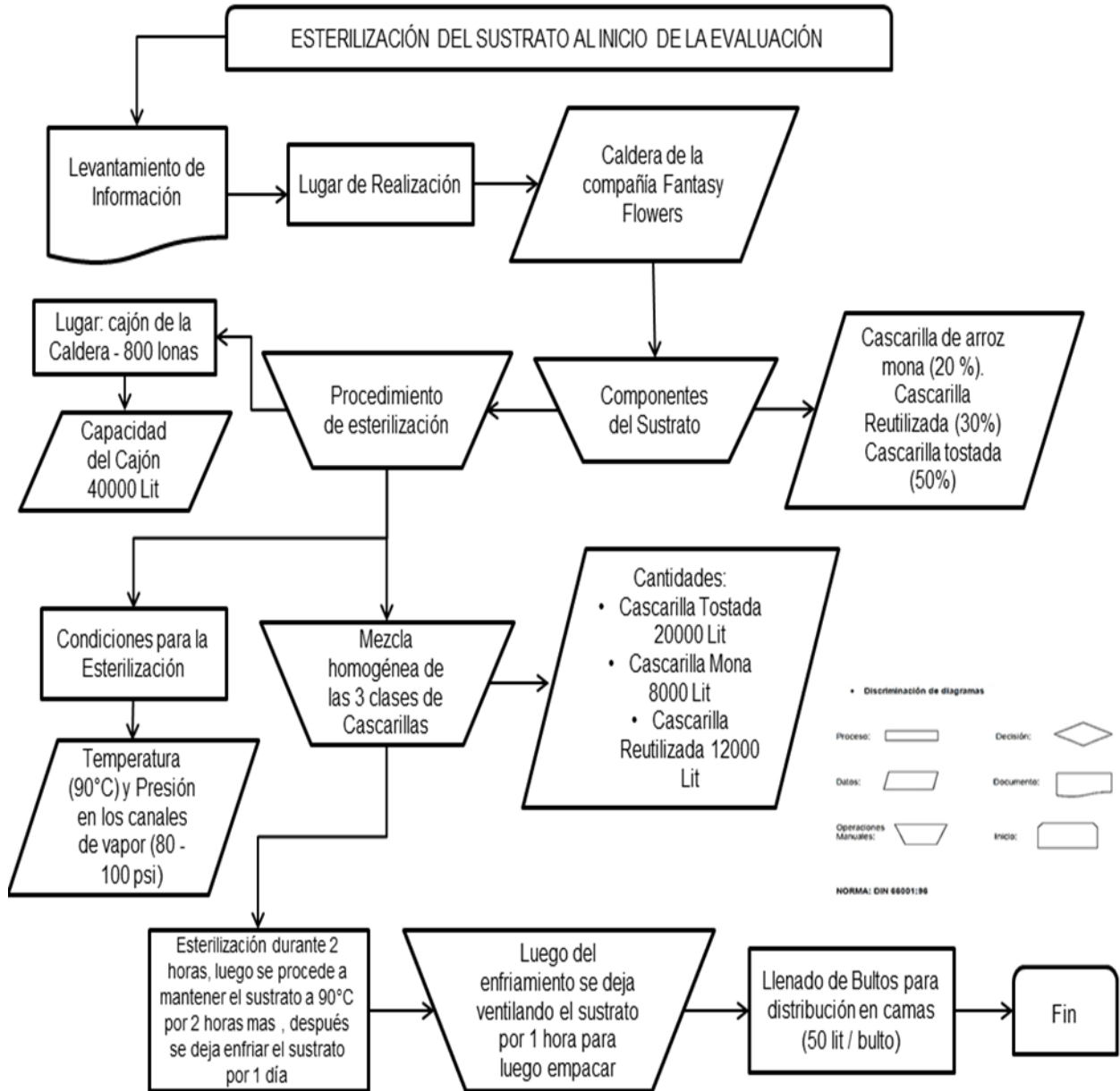


Figura 2. Metodología de la esterilización del sustrato de la evaluación del efecto de aplicaciones de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de *Fusarium* sp, en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*). Norma DIN 66001:96

2. Inoculación inicial del Sustrato.

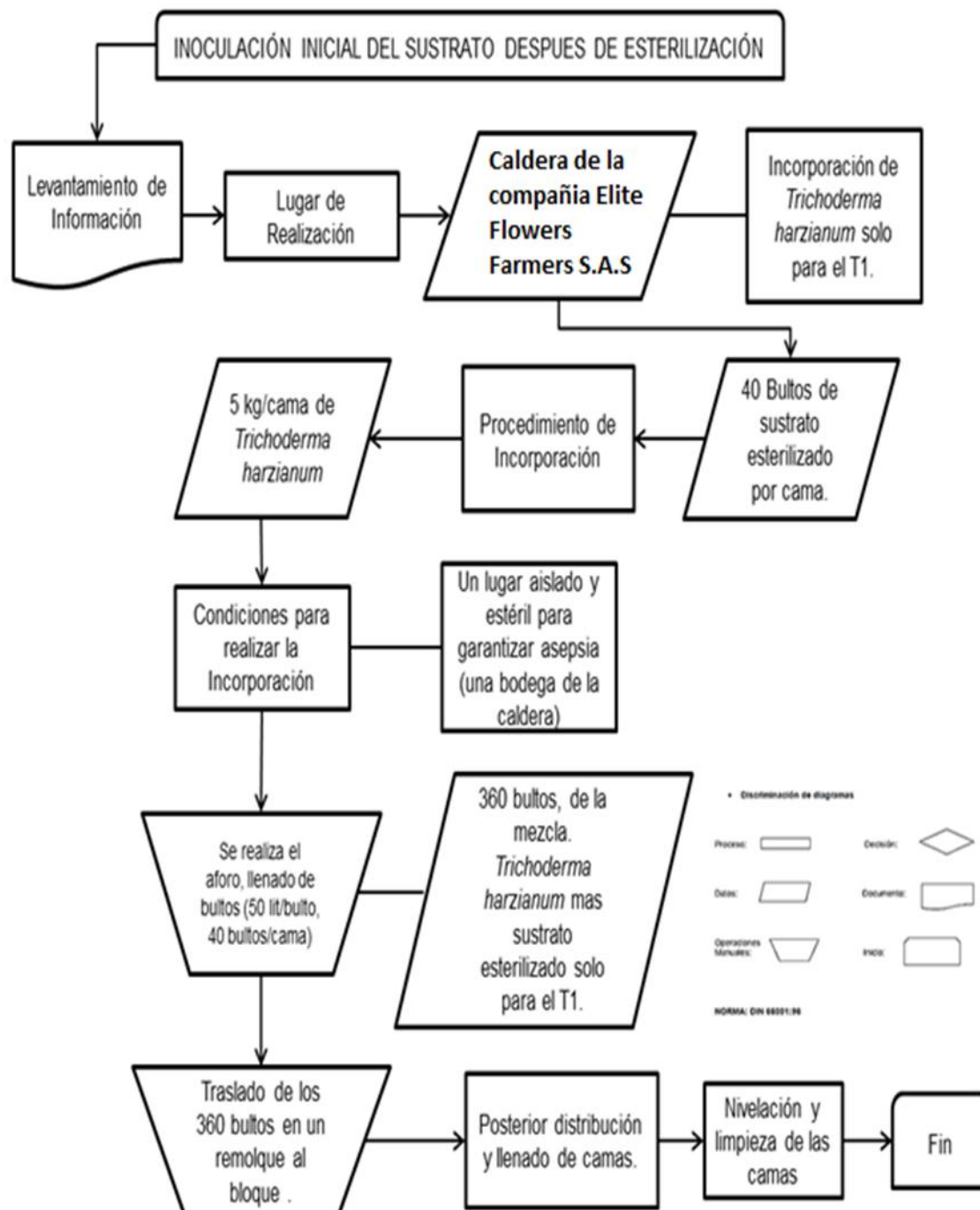
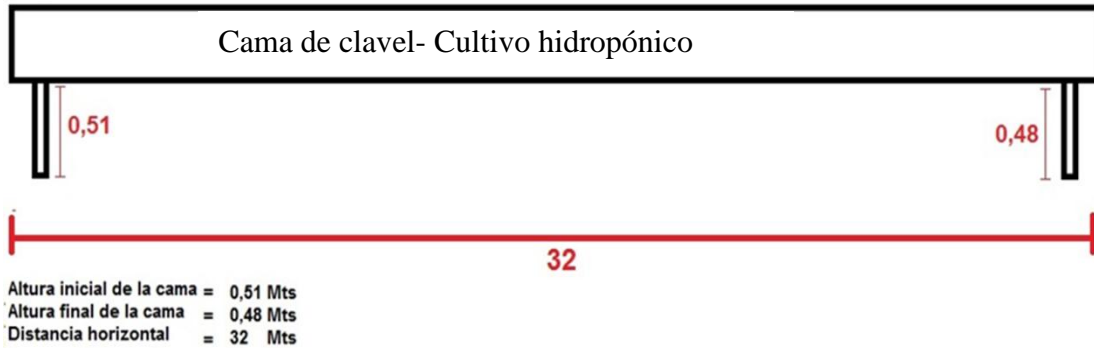


Figura 3. Metodología de la inoculación inicial del sustrato para evaluar el efecto de aplicaciones de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de *Fusarium* sp, en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*). Norma DIN 66001:96

3. Inclinación de las camas, grado de la pendiente.

Altura Inicio de la cama	0,51 Mts							
Altura final de la cama	0,48 Mts	Pendiente	Diferencia de alturas	x 100	Pendiente	0,03 Mts	x 100	P= 0,0937 %
Distancia horizontal	32 Mts		Distancia horizontal			32 Mts		



$$pendiente = \frac{Diferencia\ de\ alturas}{Distancia\ horizontal} \times 100 = 0.09375\% \text{ de pendiente}$$

Figura 4. Inclinación de camas para la evaluación de las aplicaciones de *Trichoderma harzianum* para disminuir la incidencia de *Fusarium* sp. en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*).

4. Tipo de canal y drenaje.


 <p>Foto: Niño, 2017.</p>	<p>Se observa el tipo de canal y drenaje. En el aseguramiento realizado en Elite Flowers Farmers S.A.S.</p>	 <p>Foto: Niño, 2017.</p>	<p>Canales de 18 cm.</p> <p>Profundidad del canal: 10 cm.</p> <p>Distancia entre canales: 9 cm.</p>
 <p>Foto: Niño, 2017.</p>	<p>Se observa la distancia a la cual está el canal de drenaje del suelo (32cm), también observamos lo largo del canal debajo del contenedor (32 m).</p>	 <p>Foto: Niño, 2017.</p>	<p>Se observa el aseguramiento del canal de drenaje, colocando agua sobre el canal.</p>

Figura 5. Aseguramiento tipo de canal para la evaluación de las aplicaciones de *Trichoderma harzianum* para disminuir la incidencia de *Fusarium* sp, en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*).

5. Reportes laboratorio (Control de calidad).

Km. 31 vía Fantasma Finca El Morado Teléfono: 0710444 Ext. 4334 Email: info@eliteflower.com www.eliteflower.com
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA THE ELITE FLOWER S.A.S C.I. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO INFORME N°: PT-0198-17-IN a PT-0202-17-IN
AREA : INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
FECHA : 01- NOVIEMBRE DE 2017
Afn: MIC. CAROLINA CARDONA ARRIETA ING. LINDA STEFANY LOPEZ
SEMANA : 43 FECHA DE MUESTREO: 24 DE OCTUBRE DEL 2017
PRODUCTO TERMINADO MUESTRAS DE AGUA, ESCURRIDO Y LIXIVIADO
OBSERVACIONES DEL USUARIO: EVALUACION DEL POSIBLE EFECTO DE APLICACIONES DE <i>Trichoderma harzianum</i>. PARA DISMINUIR LA INCIDENCIA DE <i>Fusarium</i> sp. EN EL CULTIVO DE CLAVEL. FINCA FANTASY 6, BLOQUE: 27, CULTIVO: CLAVEL. VARIEDAD: MANDALAY,POMAROSA, DON PEDRO
DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA
DILUCIONES SERIADAS: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴,10⁻⁷ SE HACEN SIEMBRAS EN MEDIOS DE CULTIVOS: <ul style="list-style-type: none"> • AN (AGAR NUTRITIVO) PARA EVALUAR % DE PUREZA DEL PRODUCTO, EN RELACION A BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS. • PDA (AGAR PAPA DEXTROSA) PARA EVALUAR VIABILIDAD Y PUREZA, EN RELACION A HONGOS CONTAMINANTES. • AA (AGAR AGUA). PARA EVALUAR EL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LOS CONIDIOS. • SIEMBRA EN MEDIO ROSA DE BENGALA PARA RECUENTO DE HONGOS. • CONTEO EN CAMARA DE NEUBAUER PARA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS

Km. 31 vía Panatitlán
Finca El Morado
Teléfono: 8927444 Ext. 4324
Email: aparciamat@elclavel.com
www.elclavel.com

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
THE ELITE FLOWER S.A.S C.I.
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**

INFORME N°: PT-0198-17-IN a PT-0202-17-IN

RESULTADOS

PRODUCTO TERMINADO

SEMANA	FECHA DE MONTAJE	FECHA DE LECTURA	TIPO DE MUESTRA	FINCA	CONCENTRACION (Conidios/ml)	% DE GERMINACIÓN	Propágulos viables (ufc/ml)	PUREZA			OBSERVACIONES
								% DE PUREZA	BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS (ufc/ml)	OTROS HONGOS (ufc/ml)	
43	25/10/2017	31/10/2017	Trichoderma Puro	Fantasy 6	6×10^7	67%	4×10^7	0%	7×10^3	0	Presencia de Bacterias
43	25/10/2017	31/10/2017	Trichoderma + Agua	Fantasy 6	6×10^6	59%	4×10^6	0%	27×10^3	0	Presencia de Bacterias


ufc/ml= unidades formadoras de colonia por ml de producto

MUESTRAS: AGUA, ESCURRIDO Y LIXIVIADO


SEMANA	FECHA DE MONTAJE	FECHA DE LECTURA	DESCRIPCION DE LA MUESTRA	FINCA	BLOQUE	RECUENTO DE MICROORGANISMOS					
						Fusarium sp. (ufc/ml)	Trichoderma sp. (ufc/ml)	Penicillium sp. (ufc/ml)	OTROS HONGOS FILAMENTOSOS (ufc/ml)	Levaduras (ufc/ml)	BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS (ufc/ml)
43	25/10/2017	31/10/2017	Agua de Riego	Fantasy 6	27	0	2×10^2	0	0	6×10^1	74×10^4
43	25/10/2017	31/10/2017	Escumido (T0)	Fantasy 6	27	10×10^3	1×10^2	20×10^4	Aspergillus sp. 3×10^4	2×10^4	80×10^5
43	25/10/2017	31/10/2017	Lixiviado (T1)	Fantasy 6	27	1×10^1	3×10^4	0	0	45×10^1	10×10^4

ufc/ml= unidades formadoras de colonia por ml de producto

REGISTRO FOTOGRAFICO



T0: ESCURRIDO



T1: LIXIVIADO

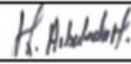
Figura 6. Modelo de reportes en el control de calidad en las muestras de *Trichoderma harzianum*, solución madre (*Trichoderma harzianum*), agua de reservorio, escurrido T0, lixiviado T1 para el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*).

6. Reporte laboratorio externo- Muestras de sustrato.

Agrodiagnóstico <small>laboratorio de diagnóstico en cultivos agrícolas</small>		RESULTADOS ANALISIS DE SUELOS Y SUSTRATOS		Fecha elaboración formato: 06-06-13 Versión: 01	
Nombre del cliente	ELITE FLOWER FARMERS SAS	Muestra N°	17Su-07948 y 17Su-09749		
Dirección	Km. 31 Vía Bogotá – Facatativá	Factura N°	2571		
Ciudad	Facatativá	Fecha de reporte	Agosto 01 de 2017		
Nombre del solicitante	Microbióloga Carolina Cardona	Fecha de recibo en el Laboratorio	Julio 19 de 2017		
Finca	LABORATORIO EL MORADO	Ubicación Finca	Cundinamarca		
Alcance del reporte	<i>Este resultado solamente aplica a las muestras recibidas.</i>		Orden de trabajo o fecha de remisión	059-17	

Consecutivo de laboratorio	Tipo de muestra	Cultivo	Variedad	Bloque	Fecha de toma de muestra	Otros datos	Análisis solicitado
17Su-07948	Suelo	Clavel	Mandalay	27	Julio 18 de 2017	T0: Sin aplicación de <i>Trichoderma</i> , Fantasy 6	Recuento de: <i>Fusarium spp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i>
17Su-07949	Suelo	Clavel	Mandalay	27	Julio 18 de 2017	T1: Con aplicación de <i>Trichoderma</i> , Fantasy 6	

Consecutivo de laboratorio	RESULTADOS			
	RECUESTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA POR GRAMO DE SUELO			
	UFC/g			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>Fusarium spp</i> (grupo roseum)	<i>Trichoderma sp.</i>
17Su-07948	<10	70	<10	30 X 10 ²
17Su-07949	50	10 X 10 ²	<10	83 X 10 ³

Director del laboratorio	Martha Lucía Arboleda M. Fitopatóloga	
--------------------------	--	---

Documentos de referencia	<ul style="list-style-type: none"> Devet, P., and Rouxel F. 1997. <i>Detection and Isolation of Soil Fungi</i>. Science Publishers, Inc. Nelson, P.E., T.A. Toussoun, y W.F.O. Marasas. 1983. <i>Fusarium species. An illustrated manual for identification</i>. The Pennsylvania State University Press. EE.UU.
--------------------------	--

Figura 7. Modelo de reportes en el control de calidad muestras de sustrato para identificación de *Fusarium spp.* Y *Trichoderma harzianum* en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*).

7. Reporte esterilización sustrato.



ELITE FLOWER FARMERS S.A.S

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Señores:
Dpto. Técnico
The Elite Flower
Facatativá – Cundinamarca

FECHA: 03 de Marzo de 2017
CONSECUTIVO: AS-0046-17-FI a AS-0048-17-FI

Atn:
Ing. Jairo Mendoza
Ing. Alexander Hernández
Ing. Daniel Zapata

FINCA: Fantasy.
TIPO DE MUESTRA: Sustrato

NOTA: Muestras recibidas en el laboratorio el 23 de Febrero de 2017.

FECHA DE ESTERILIZACIÓN: 20 de Febrero de 2017.
FECHA DE ENVIO DE MUESTRA: 23 de Febrero de 2017.

MUESTRAS:

Cascarilla desinfectada, Lote No 33, Muestra 1 (Fecha de esterilización: 20 de Febrero de 2017)
Cascarilla desinfectada, Lote No 33, Muestra 2 (Fecha de esterilización: 20 de Febrero de 2017)
Cascarilla desinfectada, Lote No 33, Muestra 3 (Fecha de esterilización: 20 de Febrero de 2017)

Observaciones: Muestras de sustrato para identificación de *Fusarium* sp.

Metodología

- Agitación del sustrato a una relación 100 g/1000 ml en agua destilada estéril en Agitador Orbital por una (1) hora.
- Dejar sedimentar el sustrato después de agitación por un periodo de 30 minutos.
- Realizar diluciones seriadas de 10^0 a 10^6 con siembra en medio de cultivo Komada (Selectivo para *Fusarium* sp.).

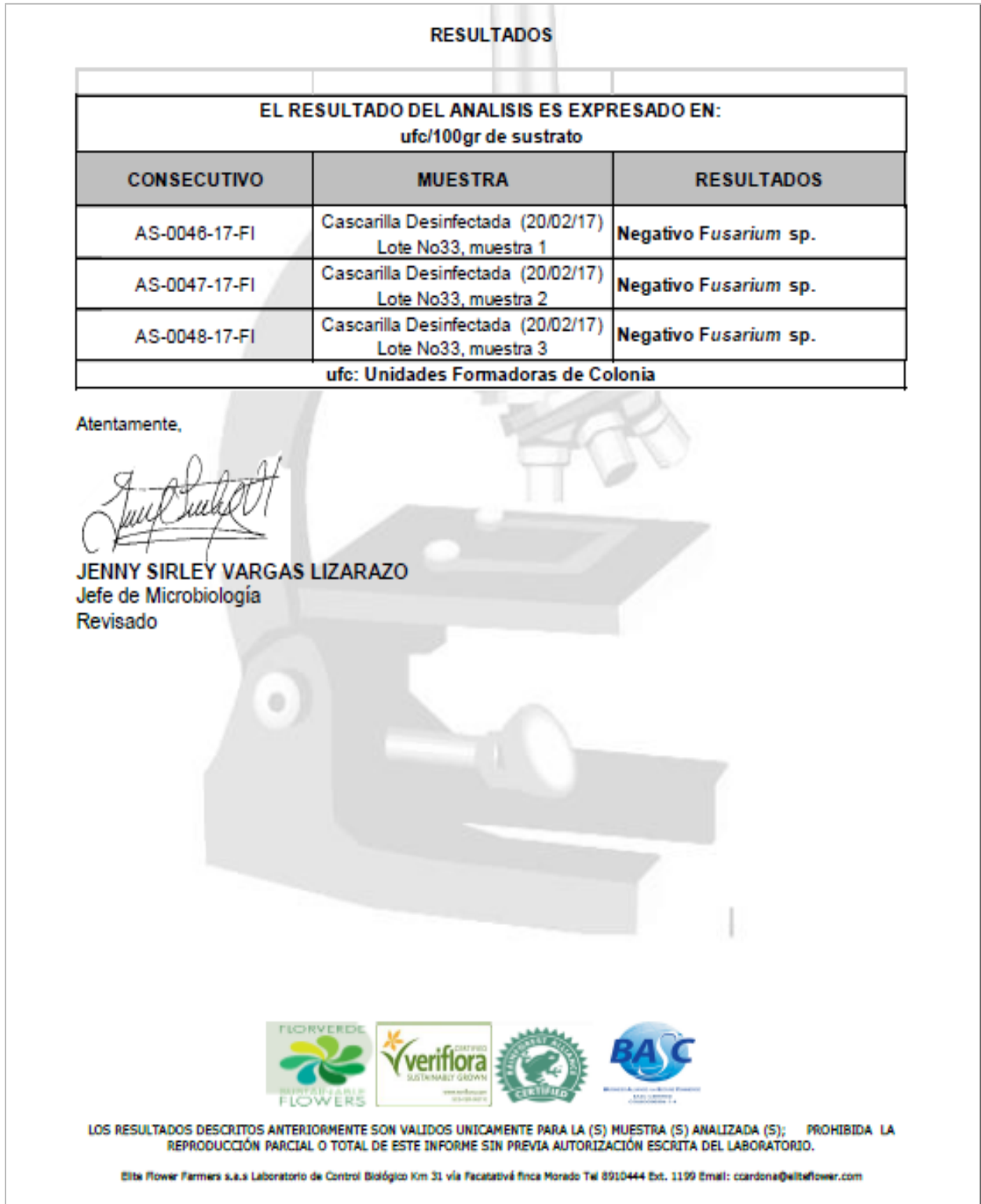


Figura 8. Reporte de laboratorio para evaluar la presencia de *Fusarium* sp en el sustrato utilizado en el cultivo de Clavel (*Dianthus caryophyllus*).