

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**Evaluación del efecto de cinco cepas de *Trichoderma* spp.  
sobre el crecimiento foliar y radicular de portainjertos de  
rosas var. Natal Brier**  
Proyecto de investigación

**Eddy Andrés Báez Cedeño**

**Ingeniería en Agroempresas**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Agroempresas

Quito, 08 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación del efecto de cinco cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento foliar y radicular de portainjertos de rosas var. Natal Brier**

**Eddy Andrés Báez Cedeño**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 08 de diciembre de 2016

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Eddy Andrés Báez Cedeño

Código: 00109020

Cédula de Identidad: 1720992740

Lugar y fecha: Quito, 08 de diciembre de 2016

## **Dedicatoria**

Un profundo agradecimiento a mi familia por su constante apoyo durante toda mi etapa universitaria, a Sebastián Donoso, Bernardo Rampon, Darío Ramírez por su ayuda para la culminación de este estudio y Antonio León por su enseñanza y colaboración.

## RESUMEN

La industria de la floricultura tiene una alta importancia en la economía ecuatoriana, ya que representa el 5,2% de los ingresos por bienes no petroleros. Por esta razón, es importante optimizar la producción y calidad del producto para mejorar la competitividad. El uso de biofertilizantes y microbios benéficos dentro de los sistemas productivos de exportación, están siendo utilizados para el control de plagas, enfermedades y bioestimulación vegetal. Uno de los microbios más usados en la floricultura ecuatoriana es el hongo *Trichoderma* spp. el cual brinda beneficios para la protección de enfermedades y así como de bioestimulación radicular y foliar. Plantas productivas deben tener un adecuado sistema radicular para absorber eficientemente los nutrientes del suelo, lamentablemente, la zona radicular vegetal y especialmente la arquitectura de la raíz, han sido poco estudiadas y tomadas poco en cuenta. En el presente estudio, se evaluó el enraizamiento y arquitectura de raíz, así como efectos en la bioestimulación foliar del patrón de rosas Natal Brier después de la aplicación de, cinco cepas de *Trichoderma* spp. De las cepas usadas en este estudio, tres pertenecen a *Trichoderma harzianum* (B, C, D) y dos pertenecen a *Trichoderma asperellum* (A, E), obtenidas del Banco de cepas del laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. Esta investigación se realizó bajo condiciones de invernadero reflejando las condiciones ambientales más parecidas a la realidad de un cultivo de rosas en el país. Para esto, se establecieron ventanas de observación de raíces o rhizotrones para visualizar y evaluar el estado de la raíz y la expresión foliar después de las aplicaciones con *Trichoderma* spp. Las aplicaciones edáficas de las cepas fueron realizadas semanalmente a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  u.f.c/mL. Los datos se evaluaron 7 semanas después de la aplicación, donde se observó la respuesta foliar y radicular, usando métodos no destructivos (altura de planta, número de folíolos, longitud de raíz principal y secundaria) y métodos destructivos (peso fresco y seco de la parte foliar y raíz). Se usó un diseño completamente al azar (DCA) y tras analizar los resultados con el análisis de varianza, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, las cepas B y D mostraron una mejor estimulación foliar y radicular al portainjertos frente a los controles sin aplicación de *Trichoderma* spp., aunque esto fue solo una tendencia sin diferencia estadística.

**Palabras clave:**

Rhizotrón, *Trichoderma* spp., Rosas.

## ABSTRACT

The floriculture industry has a high importance in the Ecuadorian economy, since it represents the 5.2% of the income by non-petroleum goods. For this reason, it is important to optimize production and product quality to improve competitiveness. The use of biofertilizers and beneficial microbes within export production systems are being used to control pests, diseases and plant biostimulation. One of the microorganisms most used in Ecuadorian floriculture is the fungus *Trichoderma* spp. Which provides benefits for the protection of diseases as well as for root and foliar biostimulation. Productive plants must have an adequate root system to efficiently absorb nutrients from the soil, unfortunately, the plant root zone and especially the root architecture, haven't been fully studied and considered. In the present study, we evaluated the root stimulation, root architecture as well as effects on leaf biostimulation of the Natal Brier roses pattern after the application of five strains of *Trichoderma* spp. The strains used in this study, three belong to *Trichoderma harzianum* (B, C, D) and two belong to *Trichoderma asperellum* (A, E), obtained from the strain bank of the agricultural and food biotechnology laboratory of Universidad San Francisco de Quito. This research was carried out under greenhouse conditions reflecting the most similar environment conditions to the production reality of the country. The root observation windows or rhizotrons were established to visualize and evaluate root status and foliar expression after *Trichoderma* spp. The edaphic applications of the strains were performed weekly with a concentration of  $2.5 \times 10^5$  u.f.c./ml. It was evaluated 7 weeks after application, where the foliar and root response were observed using non-destructive methods (plant height, leaflet number, main and secondary root length) and destructive methods (fresh and dry weight of foliar zone and root). A completely randomized design was used and after analyzing the results with ANOVA, no significant differences between treatments were found. However, strains B and D showed a better foliar and root stimulation to rootstocks compared to controls without application of *Trichoderma* spp., Although this was only a trend with no statistical difference.

**Key words:**

**ImageJ, Rhizotron, *Trichoderma* spp., Roses.**

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1. Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Antecedentes.....</b>	<b>8</b>
1.1.2 Origen e importancia del cultivo de rosas .....	8
<b>1.2 Justificación .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivo General.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Objetivo específico.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Hipótesis .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Revisión de literatura .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Rosa.....</b>	<b>12</b>
3.1.1 Historia .....	12
3.1.2 Taxonomía.....	13
<b>3.2 Portainjertos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 <i>Trichoderma</i> spp.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Rhizotrones y sistemas de evaluación de raíz.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Material y metodos .....</b>	<b>18</b>
4.1 Localización del estudio:.....	18
4.2 Rhizotrón o cajas de observación de raíces.....	18
4.3 Sustrato para el estudio.....	19
4.4 Material biológico: Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y patrones de rosa.....	19
4.5 Implementación del estudio y diseño experimental .....	20
4.6 Aplicación de <i>Trichoderma</i> spp. al suelo .....	21
4.7 Estandarización de la obtención de fotografías de los rhizotrones .....	22
4.8 Análisis estadístico y variables a medir.....	23
4.9 Software usado para la evaluación de la arquitectura de las raíces .....	25
<b>5. Resultados .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Análisis del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. en área foliar.....</b>	<b>25</b>
5.1.1 Análisis con métodos no destructivos .....	28
4.1.1 Análisis con métodos destructivos.....	29
<b>4.2 Efectos de <i>Trichoderma</i> spp. en raíz.....</b>	<b>30</b>
5.2.1 Análisis con métodos no destructivos .....	33
5.2.2 Análisis con métodos destructivos.....	34
<b>6. Discusión .....</b>	<b>35</b>
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>39</b>
<b>8. Recomendaciones.....</b>	<b>40</b>
<b>9. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cepas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	20
Tabla 2. Aleatorización de los tratamientos.....	21
Tabla 3. Resultados generales del efecto sobre el crecimiento foliar por parte de <i>Trichoderma</i> en base al análisis con métodos no destructivos y destructivos. Resultados $\pm$ representan la desviación estandar.....	27
Tabla 4. Análisis general de las variables con método no destructivo y destructivo por el efecto de crecimiento de <i>Trichoderma</i> en raíz Resultados $\pm$ representan la desviación estandar.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Diseño de rhizotrón vista en 3D B) Vista trasera de prototipo de rhizotrón con recubrimiento de lámina de espuma Flex en la cara frontal.....	19
Figura 2. Fotografías estandarizadas del área foliar comparando los seis tratamientos con tres repeticiones.....	26
Figura 3. Análisis de medias de variables por métodos no destructivos en la parte aérea y test de Duncan para alfa de 0.05% A) altura de tallo (cm) B) Número de folíolos.....	28
Figura 4. Análisis de medias de métodos destructivos en la parte aérea. A) peso fresco del tallo (g) B) peso seco del tallo (g), comparación de medias con Duncan 0.05%.....	29
Figura 5. Fotografías de rhizotrones más representativos del efecto de <i>Trichoderma</i> en el crecimiento radicular. Imagen invertida para el análisis con ImageJ .....	31
Figura 6. Análisis de medias del efecto de <i>Trichoderma</i> en raíces con método no destructivo A) longitud de raíz primaria (cm) B) longitud de raíces secundarias (cm). Comparación de medias con test de Duncan al 0.05% .....	33
Figura 7. Análisis de medias del efecto de <i>Trichoderma</i> en raíces por método destructivo A) Peso fresco de raíz (g) B) Peso seco de raíz (g). Comparación de medias con test de Duncan al 0.05% .....	34

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes.

### 1.1.2 Origen e importancia del cultivo de rosas

Ecuador es un país que, en el ámbito económico, la agricultura tiene una alta importancia. Este rubro se ha visto caracterizado por varios auges que han generado mercados de alta estimación. Tal como lo demuestran los datos estadísticos proporcionados por el Banco Central del Ecuador (2015), el PIB agropecuario se ha mantenido creciendo a pesar de las recesiones en el crecimiento del país. Se ha encontrado que la producción agrícola ha aumentado un 54% en esta última década y a su vez han aumentado las exportaciones, lo cual nos ha generado ingresos de divisas al país (Monteros & Salvador, 2015).

El origen del cultivo de rosas en Ecuador se remonta a finales del siglo 19, pero no fue hasta finales del siglo 20 que este cultivo consiguió obtener una mayor representatividad en los ingresos del país (Muñoz, 2010). Este cultivo por varios años tuvo una gran acogida y rentabilidad, de las 30 unidades productivas que existían en 1990, han aumentado a lo largo de estos años hasta superar las 350 (Banco Central, 2015). En este último año, el mercado florícola en rosas produjo el 5,2% de los ingresos generados por bienes no petroleros, esto representa el 18,5% de participación de las exportaciones mundiales de rosas, ubicándose en el segundo puesto de abastecedores de este rubro. En el primer lugar se encuentra Holanda quien figura como mayor importador y exportador (Proecuador, 2015).

El mercado florícola en Ecuador no fue beneficioso únicamente como fuente para ingreso de divisas al país, además el negocio florícola generó más plazas de trabajo en comparación a otros negocios tradicionales agrícolas predominantes en la región interandina del Ecuador. Por ejemplo, la ganadería, era el negocio predominante y generaba empleo para

0.10 personas por hectárea. Mientras que las fincas productoras de rosas generan empleo generalmente para 10 personas por hectárea (Proecuador, 2013).

La mayoría de fincas productoras de rosas se encuentra en la región interandina del país, esto se debe a que se encontró que las condiciones de luminosidad son las más favorables para producir rosas de mayor tamaño, las cuales son muy valoradas (Proecuador, 2013). Existen estudios que han demostrado que una alta intensidad lumínica es beneficiosa para mejorar el rendimiento y calidad de las rosas (Menard, 1992). Sin embargo, no solo es la intensidad lumínica la condición ambiental que se requiere para este cultivo. Una temperatura entre 17 a 25°C, un nivel controlado de humedad que no descienda del 60% y una buena condición del suelo son factores que determinan el crecimiento de este cultivo (López, 1981). La rosa se caracteriza por ser un cultivo con floración continua, con tallos leñosos y siempre con terminación floral a menos de que sea un tallo ciego o que se haya producido un aborto (Yong, 2004). El método asexual con uso de estacas como portainjertos es el método más usado para propagar este cultivo con el propósito de mantener las características deseadas de las variedades injertadas. La rosa cuenta con un sistema radicular vigoroso y profundo, pero si es sembrado de manera directa como estaca, genera sistema radicular superficial, no pivotante. Comúnmente se ha establecido propagar rosas en portainjertos seleccionados, los cuales se caracterizan por tener un sistema radicular adecuado, el cual permita propagar flores de calidad y con mayor producción.

## **1.2 Justificación**

*Trichoderma* spp. es un hongo cosmopolita que habita comúnmente en el suelo. Según Hermosa (*et al.*, 2012) este hongo permite crear simbiosis entre planta-microorganismo promoviendo el crecimiento en las mismas, además puede suprimir microorganismos como controlador biológico. Se han realizado estudios en donde se ha encontrado que con una

aplicación de *Trichoderma* spp. a una concentración que varía entre  $10^5$  -  $10^6$  u.f.c/mL muestran una respuesta positiva sobre el crecimiento radicular y foliar en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Gomez *et al.*, 2013). Adicionalmente, se han realizado estudios en los que se ha demostrado que *Trichoderma viride* a comparación del control fomentó el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* estimulando el crecimiento en altura, floración temprana, enraizamiento y biomasa en un (45%) (Hung *et al.*, 2013).

En los portainjertos de rosa, se busca obtener la mayor cantidad de raíces para permitir una mayor captación de agua y nutrientes que serán trasladados a las variedades de corte o injertos. La elección del portainjerto es primordial para aumentar las posibilidades del cultivo, este debe estar adaptado a las condiciones y manejo del lugar. En Ecuador, el portainjerto más utilizado es el cultivar Natal Brier. Se conoce que el cultivo de rosas es perenne y con floración continua, por lo cual la planta está en una constante captación de nutrientes. En consecuencia, es necesario que el sistema radicular sea vigoroso durante toda la vida productiva del cultivo. Si se logra mejorar el sistema radicular de los portainjertos, se podría conseguir una capacidad productiva, lo cual ayudaría a reducir costos y volver más eficiente la producción.

La constante necesidad de volver la agricultura más eficiente y la tendencia mundial a reducir el uso de productos agroquímicos, ha generado la demanda creciente de agentes biológicos que reemplacen los pesticidas convencionales (Bermeo, 2005). En la actualidad, las empresas florícolas invierten aproximadamente de \$1200 a 2000 dólares por hectárea al mes en fertilizantes, a comparación de los \$800 a \$1000 por hectárea al mes que se invierten en productos fitosanitarios (fungicidas, insecticidas y foliares) (León, 2016). La fertilización representa un alto rubro, y sin un buen sistema radicular, toda esta inversión no será retribuida a una flor de calidad. Es por esto, que con el fin de, reducir el impacto agroecológico y a la vez que se pueda mantener altos niveles de productividad se realizó un

estudio para evaluar del efecto de cinco cepas de *Trichoderma* spp. como estimulante del crecimiento foliar y radicular utilizando el portainjerto de rosa Natal Brier.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Evaluar el efecto como bioestimulante foliar y radicular de cinco cepas de *Trichoderma* spp. en el portainjertos de rosa var. Natal Brier

### **2.2 Objetivo específico**

1. Determinar el efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. en la parte aérea con métodos no destructivos como son altura de plantas, número de folíolos.
2. Cuantificar el efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. en la parte aérea con métodos destructivos como peso fresco y seco de tallo.
3. Medir el efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. en la parte radicular con métodos no destructivos como longitud de raíz primaria y secundarias.
4. Determinar el efecto de las cepas de *Trichoderma* spp. en la parte radicular con métodos destructivos como son peso fresco y seco de raíz.

### **2.3 Hipótesis**

Las cepas de *Trichoderma* spp. tienen efecto estimulante sobre el crecimiento foliar y radicular del portainjertos de rosa

## **3. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **3.1 Rosa**

#### **3.1.1 Historia**

Si bien el origen de las rosas ha sido determinado en países posicionados sobre el paralelo 0 o línea ecuatorial, se puede considerar que este cultivo logra producirse de manera universal al existir una alta cantidad de variedades e híbridos con mayor facilidad de adaptación. Existen restos fósiles que evidencian la existencia de rosales desde la Era Cenozoica, pero no es hasta el año 1700 a.C que se puede comprobar la existencia mediante una pintura recuperada en la ciudad de Knossos en Grecia (Ferrer & Salvador, 1991). En la antigüedad las rosas tenían varios usos y se han hallado tanto en tumbas egipcias formando parte de las coronas de los reyes. Existen un sinnúmero de textos griegos y romanos en el que reflejan la valoración que tenían de las rosas y se conoce que tanto la flor de corte y los pétalos eran muy usados para la decoración. Desde la antigüedad el cultivo de rosas era muy valorado, es por esto que, existieron varios autores que escribieron libros con metodologías para la producción (Alvarez, 2012). La rosa ha tenido varias simbologías a través de los años y civilizaciones, pero siempre representaba lo positivo y bello en la vida (Segura & Torrez, 2009). La rosa ha sido mundialmente conocida por muchos años y usada desde el oriente hasta el occidente por muchas civilizaciones en eventos importantes o cotidianos. Por último, el cultivo de rosas fue impulsado para el ámbito comercial al ser utilizado para la producción de fragancias con la elaboración de agua o aceite de rosa (Gostinchar, 1954).

### 3.1.2 Taxonomía

En la actualidad los cultivos comerciales de rosas comúnmente usados son híbridos, pero desde tiempos muy antiguos hasta la actualidad se sigue trabajando en la obtención de variedades por medio de cruces, para obtener variedades nuevas con mayor expresión de varias características deseadas por los grandes mercados. Pero tal como Ferrer & Salvador (1991) mencionan existe una clasificación del cultivo de las rosas tradicional la cual se ha determinado como:

**Reino:** Vegetal

**División:** Angiosperma

**Clase:** Dicotiledoneae

**Subclase:** Archiclamidae

**Orden:** Rosales

**Familia:** Rosaceae

**Género:** *Rosa*

Varios autores han definido al rosal como arbustos leñosos caracterizados por largos tallos y hojas compuestas (Infoagro, s.f).

### 3.2 Portainjertos

La propagación del cultivo de rosa puede realizarse por medios sexuales y asexuales, en donde el método sexual ocurre con la siembra de semillas. Esta práctica se lo realiza principalmente para la obtención de nuevas variedades. El método asexual es el que más se lo practica, se lo emplea para generar clones de las variedades seleccionadas y de esta manera conservar las características deseadas. Para propagar por medio de este método, se utiliza comúnmente la técnica de injerto, el cual consiste en unir parte de un tejido de una variedad deseada en un portador diferente y de esta manera producir aéreamente la especie con

características comerciales deseadas (Botanical, 2016). La importancia del portainjertos es proporcionar los nutrientes y agua del suelo hacia la variedad de corte deseada.

La selección del portainjertos es de suma importancia para el cultivo de rosas y depende mucho de la variedad de corte que se busca producir. Existen varios tipos de portainjertos y cada uno proporciona diferentes cualidades a la variedad deseada. El patrón Natal Brier ha sido ampliamente estudiado y se ha encontrado que en comparación al portainjertos Calajan o Manneti. Por ejemplo, al injertarse la variedad de corte Charlotte a Natal Brier, esta variedad presentaba un mayor tamaño en el botón y largo de tallo (Casierra & Palpa, 2008).

Las variedades de flor de corte que se utilizan en el Ecuador, se injertan en el portainjertos Natal Brier. Es importante considerar que la utilización de los portainjertos no es únicamente para conferirle la resistencia a los patógenos que puedan existir en el suelo, existen muchas variedades que al ser sembradas de manera directa no producen el mismo vigor o floración uniforme que cuando éstas son injertadas (Larson, 1988).

En la industria florícola el tipo de injerto más utilizado es el de yema, el cual consiste en la realización de un corte vertical y otro horizontal en el portainjertos formando una figura en forma de “T”, donde es importante señalar que los cortes realizados no deben sobrepasar la capa del cámbium. Posteriormente se inserta la yema de la variedad para corte, intentando que la mayor superficie del cámbium de las dos especies se junten. Para finalizar se sella los tejidos con algún material cohesivo (Larson, 1988). Este método se lo realiza comúnmente ya que otorga muchos beneficios como:

- Fácil transportación del material vegetal deseado, ya que únicamente se requiere las yemas.
- Establecimiento de las plantas en un corto tiempo, lo que permite tener cultivos más homogéneos (García, 2015).

### **3.3 *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* spp. es un hongo que fue identificado por primera vez en 1794 por Persoon, de muestras recolectadas en Alemania (Samuels, 2005). *Trichoderma* spp. se encuentra presente universalmente, se ha determinado que tiene preferencia con suelos ricos en materia orgánica, esto se debe a que tiene la característica de colonizar los materiales ricos en celulosa, por lo cual puede estar presente en plantas decadentes. También, se ha encontrado este hongo en la rizosfera de las plantas, adicionalmente se ha demostrado que pueden inducir resistencia a patógenos (Harman, 2000). Se conoce que *Trichoderma* spp. es un hongo con una alta facilidad de colonización en los hábitats en los que se encuentra, tiene una alta capacidad de adaptación. Existen más de 89 especies de *Trichoderma* spp. identificadas, muchas más permanecen sin ser catalogadas o descubiertas, siendo muy difícil distinguirlas entre ellas usando métodos microscopía (Samuels, 2006).

Se ha demostrado que *Trichoderma* spp. tiene varios mecanismos de acción cuando se usa para el control biológico, entre los cuales se destaca su acción como mico-parasitismo, antibiosis y competencia, además, se conoce que es un promotor de crecimiento vegetativo (Hermosa *et al.*, 2012). Como señala Harman (2000), se ha demostrado mediante estudios que *Trichoderma* spp. incrementa el desarrollo radicular observándose proliferación de raíces secundarias en consecuencia, aumenta el rendimiento del cultivo. Por otra parte, se ha comprobado que *Trichoderma harzianum* solubiliza algunos nutrientes asimilables por las plantas. En el cultivo de pimiento se ha encontrado que el hongo coloniza en las raíces y contribuye a la asimilación de Fe y P, permitiendo obtener plantas con mayor peso seco, mayor cantidad tanto de hojas como de foliar (Hermosa *et al.*, 2012). Varios autores sugieren que *Trichoderma* spp. reduce la producción de etileno al inhibir el precursor 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Por otra parte, se ha comprobado que tiene la

facultad de emitir la auxina vegetal llamada ácido indolacético (IAA) en la rizosfera (Gravel *et al.*, 2007).

### **3.4 Rhizotrones y sistemas de evaluación de raíz.**

Las raíces son una parte esencial en las plantas, son las que permiten la obtención de nutrientes como también de agua, es por esto que son el componente esencial para determinar el potencial de los cultivos. El análisis del sistema radicular ha tomado auge en los últimos años y para esto se ha diseñado sistemas que permitan explorar esta zona con la menor intervención posible. Se han diseñado varios tipos de rhizotrones que permitan la obtención de datos según la característica de la raíz, su tamaño grosor y cantidad siendo estos factores muy importantes. Mediante la construcción de ventanas de observación o rhizotrones, se ha logrado evidenciar el progreso del crecimiento y desarrollo del sistema radicular con la menor intervención posible, a su vez se ha logrado crear métodos para analizar las características de las raíces con métodos no destructivos e *in vivo* (Guzmán & Gutiérrez, 2015).

Es importante considerar que para lograr obtener datos mediante un rhizotrón y analizar los datos con softwares especializados es necesario estandarizar la obtención de fotografías de esta manera se obtendrá una imagen sin perturbaciones que puedan afectar los resultados.

Los rhizotrones se manejan con un ángulo de inclinación de 45°, con lo cual se aprovecha la propiedad de geotropismo positivo de las raíces, guiándolas hacia la ventana de observación. Anteriormente Guzman y Gutierrez (2015) demostraron mediante estudios que ha grados más altos, la presión que ejerce el suelo contra el vidrio y las raíces puede generar estrés a la planta y altera los datos finales. Por otra parte, con ángulos menores dificulta que la raíz crezca hacia el vidrio, impidiendo la observación de las mismas (Guzmán & Gutiérrez, 2015).

Existen varios métodos de evaluación de raíz utilizando el rhizotrón. Se puede lograr analizar el crecimiento diario, semanal o con la medida que el usuario desee al utilizar laminas transparentes e ir marcando el crecimiento de la raíz con marcadores. Por otra parte, también existen softwares para el análisis de imágenes que entregan valores más exactos y meticulosos. Por su fácil accesibilidad y al ser de libre uso, ImageJ es uno de los programas más utilizados usa Java para procesar imágenes (ImageJ, 2016). Este programa te permite editar, analizar y puede ser utilizado para realizar mediciones, en donde cuantifica los pixeles de la imagen y te devuelve cualquier unidad deseada con una referencia establecida. La ventaja de este programa es que soporta varios formatos de imágenes, con lo cual se puede obtener imágenes con una alta calidad que facilite la obtención de datos (ImageJ, 2016).

Por último, también existen softwares con costo al ser especializados para la medición de raíces, en este caso se encuentra Winrhizo, el cual es un programa completamente automático para el análisis de raíces. Este programa permite la medición de raíces, por medio de la detección de colores de los pixeles y su cuantificación. También permite analizar si han existido cortes en las raíces, tipos de raíces, presencia de puntas y entre otras (Regent, 2015).

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1 Localización del estudio:**

El estudio se realizó bajo condiciones controladas en la granja experimental de la Universidad San Francisco de Quito ubicada en la provincia de Pichincha del cantón Quito, en la parroquia de Puembo. Este se encuentra ubicado sobre los 2486 msnm a una Latitud de: -0,1556 y una Longitud de: -78, 3728. En este lugar se mantiene una temperatura promedio de 17,3 grados centígrados.

### **4.2 Rhizotrón o cajas de observación de raíces**

Para la instalación del estudio se construyeron 18 rhizotrones, con cuatro paredes de madera de tres centímetros de ancho y un panel de vidrio de tres milímetros. Mediante el uso del rhizotrón, se facilita la observación de las raíces al utilizar su propiedad de geotropismo positivo, lo cual distribuirá las raíces sobre el vidrio y permitirá realizar fotografías para llevar a cabo el análisis no destructivo.

Los rhizotrones fueron construidos con 60 centímetros de altura, 40 centímetros de ancho y 20 centímetros de profundidad (figura 1). El vidrio que se utilizó constaba con 60 centímetros de alto y 39,8 cm de ancho. Este se montó en un carril de cuatro mm de grosor a tres centímetros del borde exterior. En el panel inferior se realizaron cinco perforaciones de un radio de dos centímetros para facilitar el drenaje del agua. El panel frontal, donde se ubicó el vidrio se añadió una tabla de espuma Flex con un grosor de tres centímetros, el cual tiene la función de impedir el contacto directo de las raíces con el sol. Este material tiene la característica de ser fácilmente removible para realizar las mediciones de la raíz. Por último, se insertó un separador de cartón de un grosor de un centímetro en el rhizotrón el cual formó

dos compartimientos, con lo que se facilita el crecimiento individual de los portainjertos de rosa.

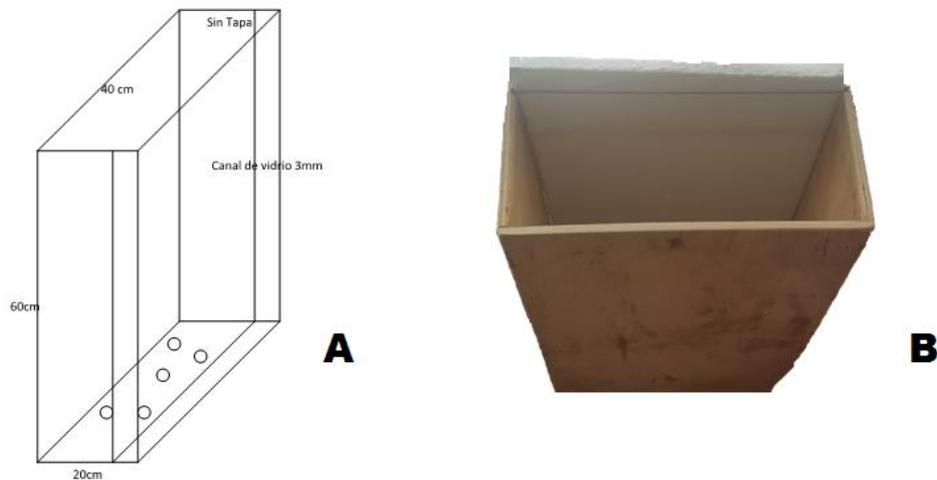


Figura 1. A) Diseño de rhizotrón vista en 3D B) Vista trasera de prototipo de rhizotrón con recubrimiento de lámina de espuma Flex en la cara frontal.

### 4.3 Sustrato para el estudio

Para la preparación del sustrato, se realizó una mezcla de suelo agrícola, suelo negro de vivero y cascarilla de arroz, usando una proporción de 1:1:2 respectivamente. Esta mezcla presentó una buena porosidad y retención del agua. Antes de incorporar el sustrato a los rhizotrones, este fue esterilizado en un barril de 200 litros añadiendo 60 litros de agua. Se llevó a ebullición hasta evaporar el agua (aproximadamente 6 horas). Se dejó enfriar por un día, posteriormente se llenaron los rhizotrones.

### 4.4 Material biológico: Cepas de *Trichoderma* spp. y patrones de rosa.

El material biológico que se utilizó, consiste de las cinco cepas de *Trichoderma* spp. que se obtuvo del Banco de cepas del laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos de la Universidad San Francisco de Quito quienes se han encargado de identificar y recolectar

las muestras. Estas cepas en este estudio fueron catalogadas tal como se observa en la (tabla 1).

Tabla 1 Cepas de *Trichoderma spp.*

Tratamiento	CEPAL	Especie
A	MHT010	<i>Trichoderma asperellum</i>
B	MHT006	<i>Trichoderma harzianum</i>
C	MHT004	<i>Trichoderma harzianum</i>
D	MHT002	<i>Trichoderma harzianum</i>
E	MHT009	<i>Trichoderma asperellum</i>

Por otra parte, se utilizó 36 portainjertos de rosa Natal Brier, que se obtuvo de la empresa mejoradora de rosas Rosen Tantau Ecuador. Todos los portainjertos obtenidos presentaban características homogéneas, con el mismo desarrollo vegetativo y con un sustrato desarrollado por la empresa proveedora.

#### 4.5 Implementación del estudio y diseño experimental

Para la implementación del estudio, fue necesario realizar una nivelación del terreno, lo cual permite posicionar los rhizotrones con el mismo grado de inclinación, Posteriormente se puso un plástico negro de 3x4 para prevenir alguna contaminación cruzada del suelo del invernadero con los rhizotrones. Se aleatorizó los tratamientos, para lo cual se ubicó una señalética en cada caja según el tratamiento y se ubicaron tal como se muestra en la (tabla 2).

Se procedió a la siembra de los portainjertos, para lo cual se seleccionaron patrones que visualmente mantengan características homogéneas tanto en raíces como en tallo. La siembra se realizó dándole al portainjertos una leve inclinación (35°) dirigiendo las raíces hacia el vidrio a diferencia de los 45° de inclinación que tenían las ventanas de observación.

Esto facilito que la raíz pueda dirigirse naturalmente al vidrio y crecer sobre este. A continuación, está la representación de cómo se posicionaron los rhizotrones en el invernadero siguiendo este esquema de aleatorización con el modelo de diseño DCA:

Tabla 2. Aleatorización de los tratamientos

Repetición I	Repetición II	Repetición III
D	E	CONTROL
B	A	E
E	B	C
CONTROL	C	D
C	CONTROL	A
A	D	B

#### 4.6 Aplicación de *Trichoderma* spp. al suelo

Con los rhizotrones aleatorizados y los portainjertos sembrados se realizó las inoculaciones de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp, las cuales se inició una semana después de la siembra. Para la dosificación de las cepas se utilizó la dosis estándar que manejan las industrias florícolas, el cual consiste en  $2,5 \times 10^5$  u.f.c/ml. Por lo que, de la solución madre que fue  $1 \times 10^9$  ufc/ml únicamente fue necesario crear una concentración de 0.25 ml de producto/ L de agua. Con esta concentración se realizó una inoculación de *Trichoderma* spp. semanalmente, dándole una lámina de riego de 150 ml de agua con inóculo por rhizotrón a excepción del control al cual únicamente se le dio un riego con agua potable. En este estudio no se realizó ninguna practica de fertilización, para conseguir obtener la mayor

representatividad de parte de *Trichoderma* spp. como estimulante radicular en un suelo esterilizado y únicamente con los nutrientes del sustrato.

#### **4.7 Estandarización de la obtención de fotografías de los rhizotrones**

Para la obtención de fotografías de los rhizotrones, es muy importante estandarizar el proceso, de esta manera obtener imágenes que reflejen las mismas características y lograr cuantificar las imágenes sin variaciones. Para este estudio, se estableció un set fotográfico, con el cual se manejó la luz natural con el fin de reducir cualquier sombra sobre los rhizotrones. Por otra parte, el diseño del rhizotrón permitió retirar el vidrio sin perturbar las raíces, ya que este material es muy reflejante lo que puede ocasionar pérdida de información.

Se utilizó una cámara con lente macro para conseguir una imagen de alta calidad, conservando el tamaño real del portainjertos. Se configuró la cámara con apertura en F8, el cual regula el ingreso de luz al sensor. Por último, el ISO en 100 el cual está relacionado con la sensibilidad de la película hacia la luz y es conocido también como la velocidad.

La cámara se ubicó a un metro de altura y medio del rhizotrón. Se utilizó un trípode para mantener la misma posición de la cámara y se disminuyó la luz sobre la cámara y el rhizotrón sujetando una malla al techo del invernadero. Por otra parte, cada rhizotrón se acomodó sobre su lateral derecho en una mesa a 0.7 metros de altura. Estos se posicionaron en contra de la luz solar para impedir que se generen sombras que puedan dificultar el análisis posteriormente. La mesa estaba señalada para que al cambiar de rhizotrón siempre mantengan la misma posición y distancia a la cámara. Se estableció esta altura, para enfocar la cámara al centro del rhizotrón y la separación permitió tomar la imagen fuera del marco, con lo cual se elimina los bordes redondeados que causa el lente de la cámara y puede alterar la realidad de la imagen.

#### **4.8 Análisis estadístico y variables a medir**

Para este estudio, se utilizó el diseño completamente al azar en el que consta con seis tratamientos y tres repeticiones. En cada rhizotrón se sembraron 2 plantas, obteniéndose así 36 unidades experimentales. Se manejó un solo factor de estudio: cepas de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, se realizó una comparación de medias entre todos los tratamientos para determinar si existe diferencia significativa en comparación con el control con ANOVA. Para esto se requirió los resultados obtenidos en las mediciones de la parte foliar de las plantas y el sistema radicular. Cada tratamiento se analizó en base a métodos no destructivos y métodos destructivos tanto en el crecimiento foliar, como también en la raíz. Tal como se señala a continuación:

##### **a) Parte foliar**

###### **a. Métodos no destructivos**

- 1) Altura máxima de la planta, en centímetros.
- 2) Cantidad de folíolos, se cuantificó el número de folíolos.

###### **b. Métodos destructivos**

- 3) Peso fresco del tallo, expresado en gramos.
- 4) Peso seco del tallo, expresado en gramos.

##### **b) Parte radicular**

###### **a. Métodos no destructivos**

- 1) Longitud de raíz primaria, en centímetros con el software.
- 2) Longitud de raíces secundarias, en centímetros con el software.

###### **b. Métodos destructivos**

- 1) Peso en fresco de raíz, expresado en gramos.
- 2) Peso seco de raíz, expresado en gramos.

Para el análisis de altura, se realizó la medición desde la base del tallo, hasta el punto más alto. Mientras que, para la cuantificación del número de folíolos, se utilizó un marcador para ir señalando los folíolos y que no exista recuento.

Para el análisis de longitud de la raíz primaria, se utilizó ImageJ como método no destructivo, de esta manera tener una mejor representación de la situación de la raíz. Esto se debe a que, el método destructivo puede eliminar información por pérdida del material o degradación del mismo, mientras que este método permite la observación de la raíz aun en completo funcionamiento. El análisis de raíces secundarias se cuantificó cada raíz secundaria excluyendo la raíz primaria que se tomó en consideración para el anterior análisis.

El peso fresco de la raíz, se obtuvo una vez que se realizó una limpieza completa de la misma. Se retiró toda presencia del sustrato al lavarlas con agua. Posteriormente, se secaron con toallas absorbentes y se pesaron en una balanza analítica con tres decimales de significancia.

Una vez que se pesaron todas las raíces, se realizó una deshidratación en un horno a 190°C durante 30 minutos. Una vez deshidratadas, se pesó con la misma balanza para obtener los resultados del peso seco de la raíz.

Los resultados fueron analizados utilizando el análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés), el cual permite contrastar hipótesis estadísticas utilizando un criterio de rechazo y comparándolo con una distribución probabilística que en este caso se utiliza la distribución F creado por Ronald Fisher (Murciano, 2016). Cada variable se analizó con un test de comparación múltiple, en este caso se utilizó el test de Duncan. Se optó por este test, ya que este se caracteriza por realizar las comparaciones utilizando una tasa de error del conjunto de datos y no con la tasa de error individual (IBM, 2010).

#### **4.9 Software usado para la evaluación de la arquitectura de las raíces**

Para este estudio, se utilizó ImageJ por su facilidad de utilización y por ser de libre acceso. Sin bien este programa acepta varios tipos de imágenes, para trabajar en la imagen es necesario convertirla a un formato establecido por el programa. Este formato (.TIFF) es un archivo estándar que almacena imágenes de alta calidad, permitiendo funcionar el software (Fotonostra, 2010). Posteriormente se necesita transformar la imagen a la orientación que se desea trabajar. Mediante una referencia establecida en el rhizotrófon o en la imagen, se analiza el tamaño de píxeles con la herramienta de línea. Una vez establecida la escala, se convierte la imagen a una imagen de 8 bits la cual cambia los colores a escalas de negros, esto nos facilita la observación de la raíz una vez que se invierta el color. Con la imagen invertida, se utiliza la herramienta de línea segmentada y se va señalando la raíz. Una vez que se consiga seleccionar toda la raíz se llama al programa con las teclas (ctrl + M) y se genera la medida del área seleccionada cuantificando los píxeles.

## **5. RESULTADOS**

### **4.1 Análisis del efecto de *Trichoderma* spp. en área foliar.**

Se realizó un análisis de variables en el área foliar para determinar si *Trichoderma* spp. tiene alguna diferencia estadística al fomentar el crecimiento foliar. En principio, se realizó la estandarización de fotografías del área foliar tal como se muestra en la (figura 2) y posteriormente se procedió a la obtención y análisis de los datos con los métodos no destructivos y destructivos.

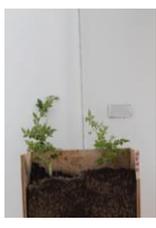
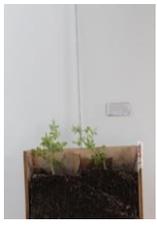
<b>Repetición /Tratamiento</b>	<b>Control</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>I</b>						
<b>II</b>						
<b>III</b>						

Figura 2. Fotografías estandarizadas del área foliar comparando los seis tratamientos con tres repeticiones

En la (figura 2), se pueden apreciar las fotografías estandarizadas de los rizotrones, en donde se puede comparar cada tratamiento y repetición. Se puede evidenciar visualmente que existe una gran variación entre repeticiones de un mismo tratamiento. Todas las fotografías están alineadas al sustrato para tener una clara perspectiva del tamaño de la parte aérea de los portainjertos.

*Tabla 3. Resultados generales del efecto sobre el crecimiento foliar por parte de Trichoderma en base al análisis con métodos no destructivos y destructivos. Resultados  $\pm$  representan la desviación estandar.*

<b>Resultados generales del análisis de la parte aérea</b>					
<b>Tratamiento/ Método</b>	<b>Método no destructivo</b>		<b>Método destructivo</b>		
	<b>Altura (cm)</b>	<b># de folíolos</b>	<b>Peso fresco del tallo (g)</b>	<b>Peso seco del tallo (g)</b>	<b>% de materia seca</b>
<b>Control</b>	24,4 $\pm$ 2,7	105,8 $\pm$ 36,2	11,8 $\pm$ 2,0	7,5 $\pm$ 1,4	63,7%
<b>A</b>	23,2 $\pm$ 7,3	89,7 $\pm$ 28,6	10,7 $\pm$ 2,9	7,5 $\pm$ 1,6	70,2%
<b>B</b>	33,1 $\pm$ 12,8	109,5 $\pm$ 48,1	17,0 $\pm$ 4,4	11,4 $\pm$ 2,3	67,3%
<b>C</b>	28,1 $\pm$ 7,1	104,5 $\pm$ 3,6	12,5 $\pm$ 2,6	8,2 $\pm$ 2,3	65,9%
<b>D</b>	32,1 $\pm$ 4,8	131,5 $\pm$ 35,7	15,3 $\pm$ 4,3	10,5 $\pm$ 3,0	68,4%
<b>E</b>	23,5 $\pm$ 2,6	100 $\pm$ 14,7	10,7 $\pm$ 2,6	6,5 $\pm$ 1,3	61,2%

En la (tabla 3), se puede visualizar la comparación de los métodos no destructivos y los métodos destructivos para las variables aéreas analizadas. Se puede distinguir que la cepa B y D son las que generan mayor altura y producción de folíolos, lo cual se ve reflejado posteriormente en el peso de los mismos. Sin embargo, a pesar de que la cepa A mostró los menores resultados, esta generó mayor porcentaje de materia seca que las demás cepas. Lo que nos indica que las demás cepas tenían tallos con mayor cantidad de agua que tejidos.

### 5.1.1 Análisis con métodos no destructivos

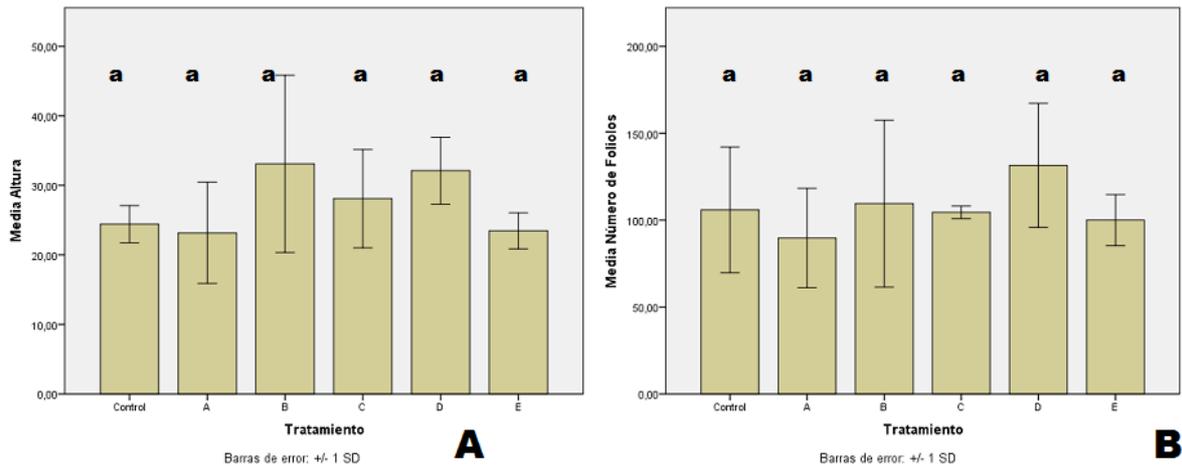


Figura 3. Análisis de medias de variables por métodos no destructivos en la parte aérea y test de Duncan para alfa de 0.05% A) altura de tallo (cm) B) Número de folíolos.

En la (figura 3), se puede observar el análisis de medias, del cual en la sección A existe una tendencia por parte de la cepa B y D en generar mayor altura del tallo. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa de acuerdo con el ANOVA (anexo 7). Por otro lado, en el número de folíolos, la cepa D es la que predomina en generar folíolos, sin embargo, no se encontró diferencia significativa de acuerdo con el ANOVA (anexo 7). Por último, se realizó el test de Duncan el cual demuestra que todas las medias pertenecen al mismo grupo. Tal como se observa en las dos secciones de la (figura 3), las barras de error muestran la desviación estándar obtenida durante el experimento y reflejan una alta variación. Por último, se obtuvo el coeficiente de variación que demostró ser de 23% (figura 3A) y 26% (figura 3B).

#### 4.1.1 Análisis con métodos destructivos

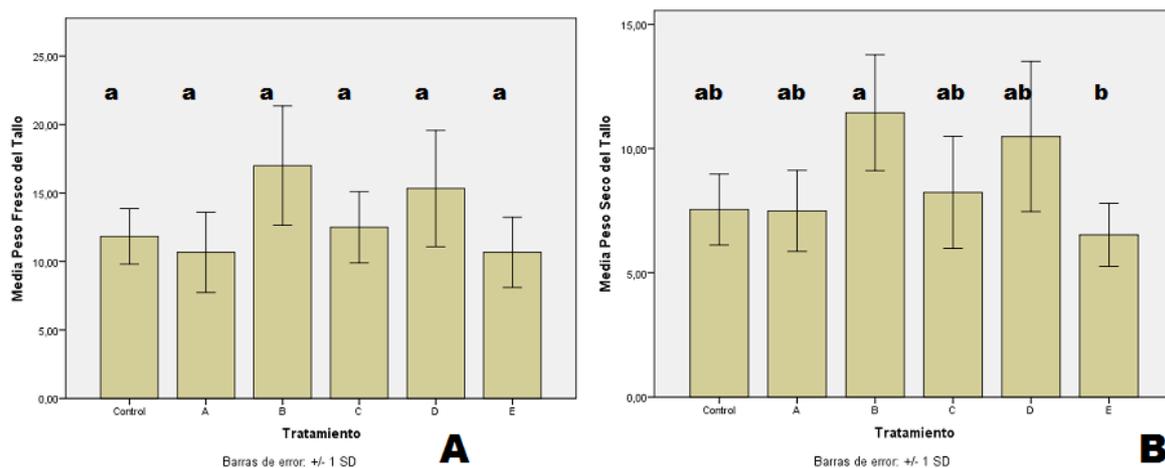


Figura 4. Análisis de medias de métodos destructivos en la parte aérea. A) peso fresco del tallo (g) B) peso seco del tallo (g), comparación de medias con Duncan 0.05%

En la (figura 4) se puede observar el peso fresco y seco del tallo, en el cual en la sección A) la cepa B es la que predomina en generar peso fresco de tallo, seguido por la cepa D y el control. de acuerdo con el ANOVA (anexo 7) se encontró que no presentaban diferencias significativas, esto se validó con el test de Duncan que mostró que todas las medias pertenecían al mismo grupo. En la sección B) de acuerdo con el ANOVA (anexo 7) se encontró no existe diferencia significativa, pero es un valor cercano a aceptar que existe diferencia significativa, por lo cual con el test de Duncan se logró demostrar que este resultado se debe a que la cepa B es diferente a la cepa E, sin embargo, la cepa B comparte el mismo grupo que el control. Se demuestra que en esta sección la cepa B y D son las que tienen una tendencia a producir mayor peso seco en tallo. Por último, el coeficiente de variación que se obtuvo fue para la sección A de la figura 4 24% y para la sección B de la figura 4 23%.

## 4.2 Efectos de *Trichoderma* spp. en raíz

El análisis del efecto de *Trichoderma* spp. en la raíz se realizó por métodos destructivos y no destructivos. Para el método destructivo se analizó el peso fresco y seco de la raíz, mientras que para el método no destructivo se cuantificó el largo de la raíz principal y secundarias.

En la (figura 5) se puede observar la fotografía estandarizada de tres rhizotrones más representativos, esta imagen esta invertida el color por el software de análisis, y se puede distinguir claramente las raíces con un color negro a comparación del sustrato que tiene un color blanco. El recuadro de la parte inferior izquierda en los rhizotrones es la referencia, la cual se establece antes de invertir la imagen para lograr observar la escala. Se puede observar como en comparación al control y la cepa B, la cepa E muestra una menor proliferación de raíces.

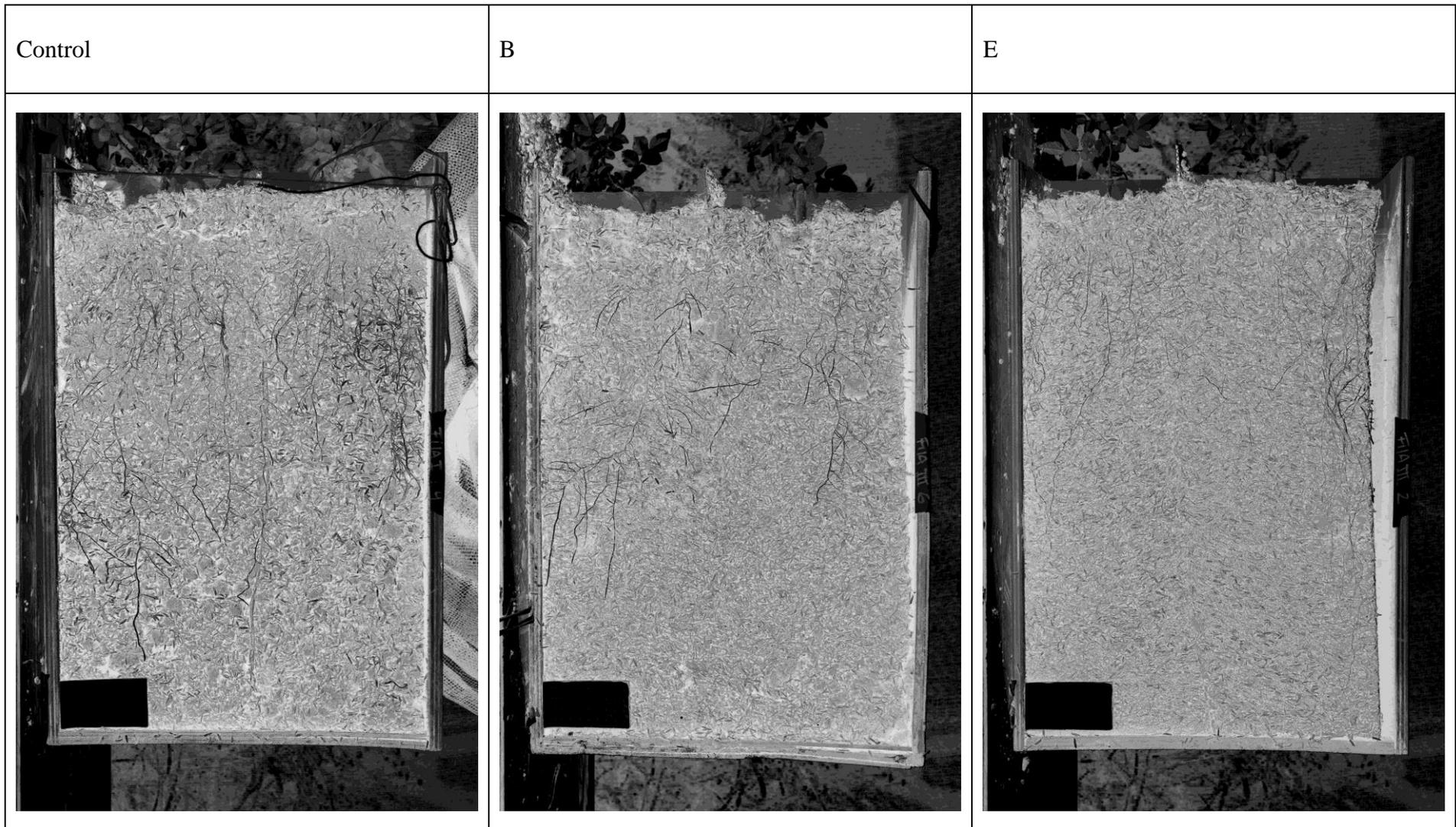


Figura 5. Fotografías de rhizotrones más representativos del efecto de *Trichoderma* en el crecimiento radicular. Imagen invertida para el análisis con ImageJ

Tabla 4. Análisis general de las variables con método no destructivo y destructivo por el efecto de crecimiento de *Trichoderma* en raíz. Resultados  $\pm$  representan la desviación estándar.

Tratamiento/ Método	Método No destructivo						Método destructivo		
	Raíz primaria (cm)	Comparación en relación al control (cm)	Raíz secundaria (cm)	Comparación en relación al control (cm)	% de raíz primaria	% de raíz secundaria	Peso fresco raíz (g)	Peso seco raíz (g)	% de materia seca
<b>Control</b>	39,8 $\pm$ 4,5	0,0	92,1 $\pm$ 29,3	0,0	30,2	69,8	2,3 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,5	51,4
<b>A</b>	40,6 $\pm$ 3,3	+0,8	78,6 $\pm$ 9,2	-13,5	34,1	65,9	1,8 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,5	52,8
<b>B</b>	44,4 $\pm$ 2,5	+4,6	71,9 $\pm$ 22,4	-20,2	38,2	61,8	4,0 $\pm$ 2,8	1,8 $\pm$ 1,4	45,9
<b>C</b>	40,6 $\pm$ 4,9	+0,8	84,3 $\pm$ 12,4	-7,8	32,5	67,5	2,3 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,5	55,3
<b>D</b>	37,4 $\pm$ 3,1	-2,4	106,6 $\pm$ 24,4	+14,6	26,0	74,0	2,3 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,6	46,6
<b>E</b>	38,3 $\pm$ 0,5	-1,5	61,6 $\pm$ 8,7	-30,5	38,3	61,7	2,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,4	38,6

En la (tabla 4) se puede observar el análisis general de las variables, distinguiéndose en métodos no destructivos y destructivos. Se puede identificar que, en los métodos no destructivos, la cepa B en comparación al control tiene una mayor longitud de raíz primaria, a diferencia de la cepa D que es la que presenta el menor resultado en esta variable. Sin embargo, en la longitud de raíces secundarias, la cepa D es la que tiene el mayor resultado y la cepa B y E tienen los resultados más bajos.

En el método destructivo se observa que únicamente la cepa B es la que tiene mayor peso. Esto se puede atribuir a que las raíces primarias tienen mayor peso que las secundarias. Sin embargo, se observa que el porcentaje de materia es bajo, lo que nos indica que el peso también es por la cantidad de agua que tiene la raíz.

### 5.2.1 Análisis con métodos no destructivos

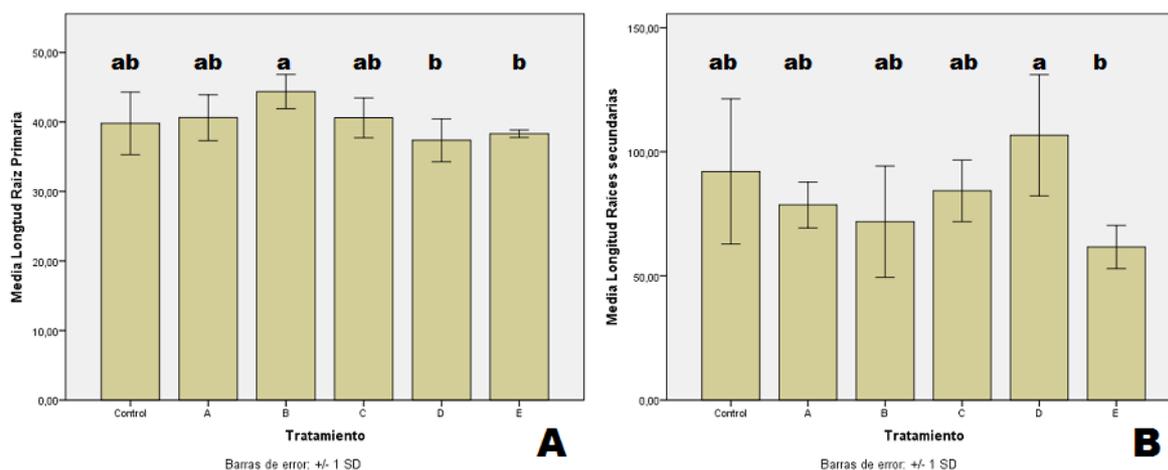


Figura 6. Análisis de medias del efecto de *Trichoderma* en raíces con método no destructivo A) longitud de raíz primaria (cm) B) longitud de raíces secundarias (cm). Comparación de medias con test de Duncan al 0.05%

En la (figura 6), se puede identificar la comparación de medias entre los tratamientos, en la sección A de la (figura 6), se puede observar el análisis longitud de raíz primaria y se observa que todas las cepas son muy parecidas, sin embargo, la cepa B es la que tiene mayor tendencia a generar raíces primarias, pero no secundarias, adicionalmente esta cepa se

diferencia de la cepa B y E en base al test de Duncan. Por lo contrario, en la sección B de la (figura 6) se observa que la cepa D es la que genera mayor cantidad de raíces secundarias, pero no primarias, esta cepa se diferencia únicamente con la cepa E en base al test de Duncan. Esto nos indica que las cepas de *Trichoderma* spp. pueden cambiar la arquitectura de la raíz y se encontró en este estudio que a pesar de que las dos son *Trichoderma harzianum* tienen un efecto contrario en la raíz. No obstante, de acuerdo con el ANOVA (anexo 7), no se encontró diferencia significativa en ninguna sección. Por último, se obtuvo el coeficiente de variación que para la sección A de la figura 6 es 7% y la sección B de la figura 6 es 21%.

### 5.2.2 Análisis con métodos destructivos

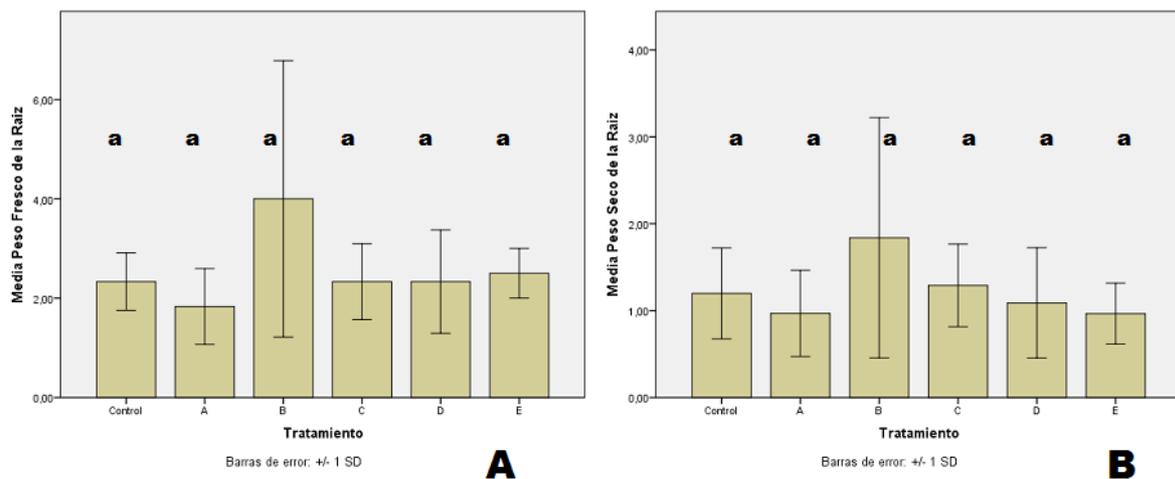


Figura 7. Análisis de medias del efecto de *Trichoderma* en raíces por método destructivo A) Peso fresco de raíz (g) B) Peso seco de raíz (g). Comparación de medias con test de Duncan al 0.05%

En la (figura 7) se puede observar los métodos destructivos, en donde tanto la sección A de la (figura 7) como la sección B (figura 7) muestran a la cepa B con el mayor peso fresco y seco de raíz. Sin embargo, de acuerdo con el ANOVA (anexo 7) no se logró encontrar diferencia significativa y el test de Duncan nos indica que todas las medias de las dos secciones pertenecen al mismo grupo. Por último, se obtuvo el coeficiente de variación que para la sección A de la figura 7 es 42% y la sección B de la figura 7 es 53%.

## 6. DISCUSIÓN

Tras analizar los resultados, no se logró encontrar diferencia significativa en el análisis con ANOVA para ninguna de las variables analizadas. El que no exista una diferencia significativa, puede deberse a la alta variación de los tratamientos entre las repeticiones, lo se evidencia en los altos coeficientes de variación de hasta el 53%. Es importante recalcar que, si bien el coeficiente de variación es un buen indicador del comportamiento de los datos de las variables de respuesta. Gómez y Martínez (1984) señalan que para experimentos en el campo se puede considerar un C.V. bajo cuando es menor al 10%, medio cuando se encuentra entre 10% y 20%, alto cuando se encuentran entre 20% y 30% y muy alto cuando sobrepasan este valor. En este estudio la única variable con coeficiente bajo es la longitud de raíz primaria, luego todos los coeficientes de variación se encuentran entre medio, alto y muy alto. Esta variación que existe entre repeticiones provoca que no exista una diferencia significativa a pesar de que se muestre una tendencia por parte de dos cepas (B y D).

Al realizar las mediciones de la raíz utilizando los métodos tanto destructivos y no destructivos, se puede observar que la obtención de datos por medio de los métodos no destructivos se facilita gracias al uso de un software a comparación de los métodos destructivos que implican manipular la raíz directamente. Debido a esto, con los métodos destructivos se pierde mucha información al destruirse la muestra, aun cuando se manipule con el mayor cuidado. La fragilidad de las raíces al momento de su lavado, puede representar una mayor variación en la cuantificación. Por otro lado, con los métodos destructivos es imposible cuantificar la estructura de la raíz. Con estos métodos no se puede diferenciar la distribución de la raíz; y, debido a la rápida deshidratación de la raíz, se pierde tamaño y color característico de las raíces primarias y secundarias por lo

cual no se puede diferenciarlas. Tal como se estableció antes, existen softwares especializados que entregan información en base al color de la raíz, lo cual es un gran indicativo de la cantidad de raíces vivas.

Existen investigaciones en donde se ha encontrado que *Trichoderma* spp. mejora la generación de raíces secundarias, terciarias y cuaternarias en algodón transgénico. En dicha investigación se encontró una mejora progresiva desde el 46% en secundarias hasta el 98% en cuaternarias (Vargas *et al.*, 2012). Por otra parte, existe un estudio en el que se determinó que *Trichoderma atroviride* genera IAA e incrementa el peso fresco tanto en raíz como tallos de tomate (Gravel *et al.*, 2007). En otro estudio se determinó que la producción de IAA no es el único factor que fomenta el crecimiento en raíces, ya que se probaron varias cepas de *Trichoderma* spp. y se encontró estimulación de raíz, pero tanto en cepas que producían este compuesto como en las que no. Se atribuye el crecimiento en este caso a otros mecanismos de acción como puede ser la alta competencia (Hoyos *et al.*, 2009). Esto nos indica que se ha encontrado que *Trichoderma* spp. tiene un efecto sobre el crecimiento de raíces en varias especies. En el presente estudio, se encontró que la cepa B produce un aumento del 12 % en raíces primarias en comparación al control, mientras que la cepa D produce un aumento del 15% en raíces secundarias en relación al control, lo que nos indica que las dos cepas de *Trichoderma harzianum* cambian la arquitectura de la raíz.

Tras diseñar los rhizotrones, se pudo encontrar que el material usado y el grosor del vidrio eran ineficientes si estas estaban en constante movimiento. Sin embargo, ya que en este estudio el movimiento era mínimo, este diseño era suficiente para soportar la presión del suelo tras la inclinación del rhizotrón. Adicionalmente, el diseño del rhizotrón al momento de estandarizar el proceso de fotografía permitió la remoción del vidrio sin causar ninguna perturbación a las raíces, lo representa un gran beneficio al no tener

reflejos en las fotografías tal como se puede observar en otras investigaciones (Guzmán & Gutiérrez, 2015). Si bien Guzmán y Gutiérrez (2015) proponen que se puede alterar el ángulo focal para mejorar la calidad de imagen por el reflejo que causa el vidrio, un método más simple fue diseñar el rhizotrón con un marco de menor grosor para que se pueda remover el vidrio sin alterar las raíces.

En este estudio se utilizó un sustrato con una composición de: suelo para uso agrícola, suelo negro y cascarilla de arroz en una relación de 1:1:2 respectivamente. Este sustrato demostró un buen desempeño, al permitir el desarrollo radicular, al demostrar características de retención de humedad y a su vez mayor porosidad, previniendo que se forme suelos compactados que dificulten el crecimiento de la raíz. Por otra parte, tal como Imbaquingo (2002) sugiere el mejor sustrato para un correcto desarrollo en raíces para el patrón Natal Brier es suelo negro y cascarilla de arroz chamuscada, en una proporción de 3:1. En este estudio se comprobó que existe un buen resultado con una menor relación de tierra negra y cascarilla. Sin embargo, ya que este sustrato demostró tener excelentes propiedades, esto permitió al control obtener un desarrollo radicular favorable, alcanzando su potencial máximo con el sustrato y al compararlo con los tratamientos no se pueda encontrar diferencias significativas y solo se pueda evidenciar cierta tendencia por parte de las cepas B y D para promover el desarrollo foliar y radicular.

En el presente estudio, se decidió realizar la cuantificación de las raíces con el software ImageJ, ya que es un programa de libre uso, este utiliza la tecnología de Java para realizar el análisis de las imágenes. Este es un software manual, lo cual indica que es necesario que el usuario sea quien defina las selecciones y realice las mediciones. Existen otros programas como Winrhizo, que es un software especializado en la medición de raíces analizando por el color de los píxeles, lo cual lo hace un programa automático, en

este únicamente el operador tiene que poner la referencia del tamaño de imagen y cuantifica una gran cantidad de variables. Sin embargo, debido a los costos que representaba este programa no se pudo realizar el análisis utilizando esta tecnología.

En este estudio, fue necesario crear la metodología para la obtención de las imágenes de los rizotrones, para esto se solicitó la capacitación de Bernardo Rampon (fotógrafo profesional). Se estableció todo el set fotográfico para obtener imágenes sin distorsiones y con la misma distribución. En otros estudios de raíces, se han utilizado escáner para la obtención de imagen con un tamaño establecido, pero en estas investigaciones se analizaban raíces sembradas en medios de cultivo sólidos o mediante análisis destructivos (Root lab, 2010). Se probó obtener la imagen con escáner a través del vidrio y sin vidrio, pero no se consiguió la misma calidad de imagen que con la fotografía y principalmente el tamaño del escáner era muy reducido para obtener toda la raíz en una misma imagen. Es por esto, que al utilizar fotografías estandarizadas, se logró obtener imágenes de calidad.

## 7. CONCLUSIONES

- De acuerdo con el ANOVA para los métodos no destructivos de la parte aérea, no se encontró diferencia significativa. Sin embargo, se encontró una tendencia por parte de *Trichoderma harzianum* (B, D) en generar una mayor altura y número de folíolos que el control.
- De acuerdo con el ANOVA para los métodos destructivos de la parte aérea, no se encontró diferencia significativa. Sin embargo, se encontró una tendencia por parte de *Trichoderma harzianum* (B, D) en generar una mayor peso fresco y seco que el control.
- De acuerdo con el ANOVA para los métodos no destructivos de la parte radicular, no se encontró diferencia significativa. Sin embargo, se pudo encontrar que la cepa B y D tienen diferente efecto sobre la arquitectura de la raíz, en donde la cepa B genera mayor cantidad de raíces primarias, mientras que la cepa D genera mayor producción de raíces secundarias.
- De acuerdo con el ANOVA para los métodos no destructivos de la parte radicular, no se encontró diferencia significativa. Sin embargo, existe una tendencia por la cepa B en generar mayor peso.
- Se diseñó, construyó y uso rhizotrones para este estudio, un método no usado antes en Ecuador.
- Se encontró que la composición del suelo tuvo un gran beneficio para el desarrollo de la raíz, lo que pudo causar que el control tenga un buen desarrollo y no se logre encontrar diferencia significativa con los tratamientos.
- Para la obtención de fotografías se logró establecer una metodología que permitió obtener imágenes de calidad de los rhizotrones, lo que permitió un correcto estudio con métodos no destructivos.

## 8. RECOMENDACIONES

- Para el diseño y construcción de los rhizotrones, se puede invertir en mejores materiales, que soporten más estudios. Por otra parte, si los rhizotrones van a estar en constante movimiento, se recomienda establecer un marco más grueso que impida el desplazamiento del mismo, a su vez un vidrio con mayor grosor.
- Realizar más repeticiones para lograr encontrar una diferencia significativa debido al alto coeficiente de variación, usando las cepas que mostraron una mejor tendencia.
- Llevar a cabo una fertilización, para ver la interacción *Trichoderma* spp. con un sustrato rico en nutrientes.
- Es muy importante, realizar el análisis utilizando un software como Winrhizo en la medición de raíces, para obtener datos más representativos de la situación en vivo de la raíz.
- Realizar una prueba con una mezcla de las cepas B y D para distinguir su función en la producción de raíces.
- Probar suelos de florícolas de todo el país, para estudiar el comportamiento de la raíz con las diferentes propiedades macromorfológicas del suelo.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, J. (2012). *Los doce libros de agricultura que escribió Lucio Junio Moderato Columela*. Valladolid: MAXTOR.
- Bermeo, A. (2005). Obtenido de Desarrollo sustentable en la república del Ecuador: <http://www.unep.org/gc/gc23/documents/ecuador-desarrollo.pdf>
- Botanical. (2016). *Botanical online*. Obtenido de <http://www.botanical-online.com/spanishglossary1.htm>
- Casierra, F., & Palpa, J. (2008). Influencia del portainjerto sobre la calidad de flor e incidencia de plagas y enfermedades en rosa (*Rosa* sp). *Ciencia y Agricultura*, 41-48.
- Castro, A., & Rivillas, C. (2014). *Trichoderma spp. modos de acción, eficacia y usos en el cultivo del café*. Chinchina: Cenicafé.
- Chiriboga, H., Gómez, G., & Garces, K. (2015). *Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades*. San Lorenzo: IICA.
- Druzhinina, I., & Kopchinskiy, A. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 55-64.
- Ferrer, F., & Salvador, P. (1991). *El rosal: manual del buen aficionado*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Fotonostra. (2010). Obtenido de Formato de archivo .Tiff: <http://www.fotonostra.com/digital/tiff.htm>
- García, D. (2015). *Manejo de injertos en rosa en una finca comercial de la sabana de Bogotá*. CAJICÁ: Universidad militar nueva granada.
- Gómez, K. y. (1984). *Statistical procedures for agricultural research*. Hoboken: John Wiley Inter Science.
- Gómez, S., Gilchrist, E., & Reynaldi, S. (2013). Importancia del aislamiento y rango de concentración de conidias en el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento de plantulas de *Solanum lycopersicum* L. *Universidad Nacional de Colombia*, 118-125.
- Gostinchar, J. (1954). *Cultivo del rosal*. Madrid: Ministerio de agricultura.
- Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 1968–1977.

- Gravel, V., Antoun, V., & Tweddell, R. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indoleacetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*, 1968-1977.
- Guédeza, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivares, R. (2009). Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34-38.
- Guzmán, M., & Gutiérrez, M. (2015). *Introducción del método de evaluación de raíces con Rizotron, en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, de la Universidad de Costa Rica*. Alajuela: Universidad de Costa Rica.
- Herman, G. (2000). *Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on Trichoderma harzianum T-22*. Geneva: Plant Disease.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 17-25.
- Herrera, T. (11 de marzo de 1995). El apogeo de la floricultura. *El Comercio*, pág. B1.
- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology*, 19-26.
- IBM. (2010). *IBM Knowledge Center*. Obtenido de [http://www.ibm.com/support/knowledgecenter/es/SSLVMB\\_22.0.0/com.ibm.spss.statistics.help/spss/base/idh\\_ones\\_post.htm](http://www.ibm.com/support/knowledgecenter/es/SSLVMB_22.0.0/com.ibm.spss.statistics.help/spss/base/idh_ones_post.htm)
- ImageJ. (2016). *ImageJ*. Obtenido de <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- Imbaquingo, C. (2002). Evaluación del comportamiento de dos patrones de rosas (Natal brier y Manetti) en cinco tipos de sustratos para enraizamiento. *AGRIS*, 10-18.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*, 14-21.
- Lab, R. (2010). Obtenido de Preparación de Raíces para el Escaneo: <http://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/metodologia-de-investigacion/determinacion-de-longitud-radical/preparacion-de-raices-para-el-escaneo>
- Larson, R. (1988). *Introducción a la floricultura*. Mexico D.F: AGT Editor.
- León, A. (Agosto de 2016). Entrevista situación actual del mercado de rosas. (E. Báez, Entrevistador)
- López, J. (1981). *Cultivo del rosal en invernadero*. Madrid: Ediciones Mundi-prensa.

- Menard, C. y. (1992). Influence of photosynthetic photon flux density and planting scheme on growth and development of cultivar Royalty roses. *Scientia Hort*, 197-202.
- Monteros, A., & Salvador, S. (2015). *Panorama agroeconómico del Ecuador*. Quito: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
- Murciano, A. (2016). *Aula virtual de bioestadística*. Obtenido de <http://estadistica.bio.ucm.es/>
- Proecuador. (2013). Obtenido de Análisi sectorial de flores: [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC\\_AS2013\\_FLORES.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC_AS2013_FLORES.pdf)
- Proecuador. (2015). Obtenido de Principales productos de la oferta exportable de Ecuador: <http://www.proecuador.gob.ec/pubs/principales-productos-de-la-oferta-exportable-de-ecuador/>
- Proecuador. (2016). *Ficha tecnica del pais*. Obtenido de [http://www.proecuador.gob.ec/pubs/proec\\_ft\\_2016\\_usa/](http://www.proecuador.gob.ec/pubs/proec_ft_2016_usa/)
- Samuels, G. (2005). Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology . *Phytopathology*, 195-206.
- Samuels, G. (2006). Trichoderma. systematics, the sexual state, and ecology. *APS*.
- Segura , S., & Torrez, J. (2009). *Historia de las plantas en el mundo antiguo*. Bilbao: Universidad de Deustro.
- Silveira, P. J. (1986). *Estatística general*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.
- Vargas, E., Méndez , V., Vázquez, J., Gonzales, D., & Grimaldo, O. (2012). Cambios fisiológicos en algodón transgénico inoculado con Trichoderma spp. *OYTON*, 101-105.
- Yong, A. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 53-67.

## ANEXO

### *Anexo 1. Nivelación y preparación del suelo*



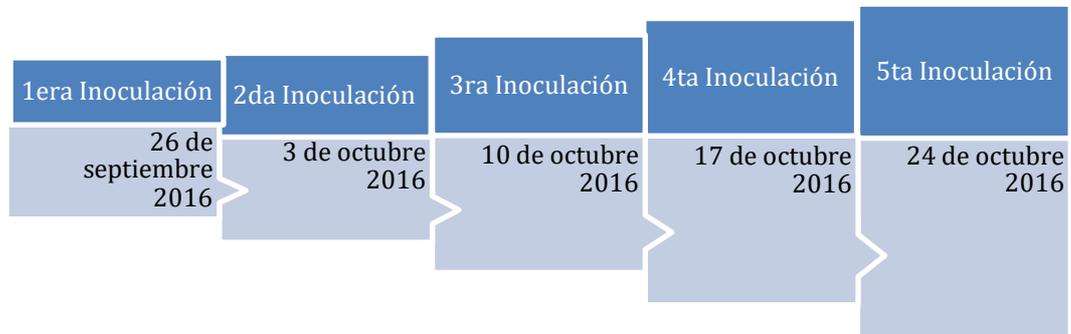
*Anexo 2 Llenado de los rhizotrones con el sustrato establecido*



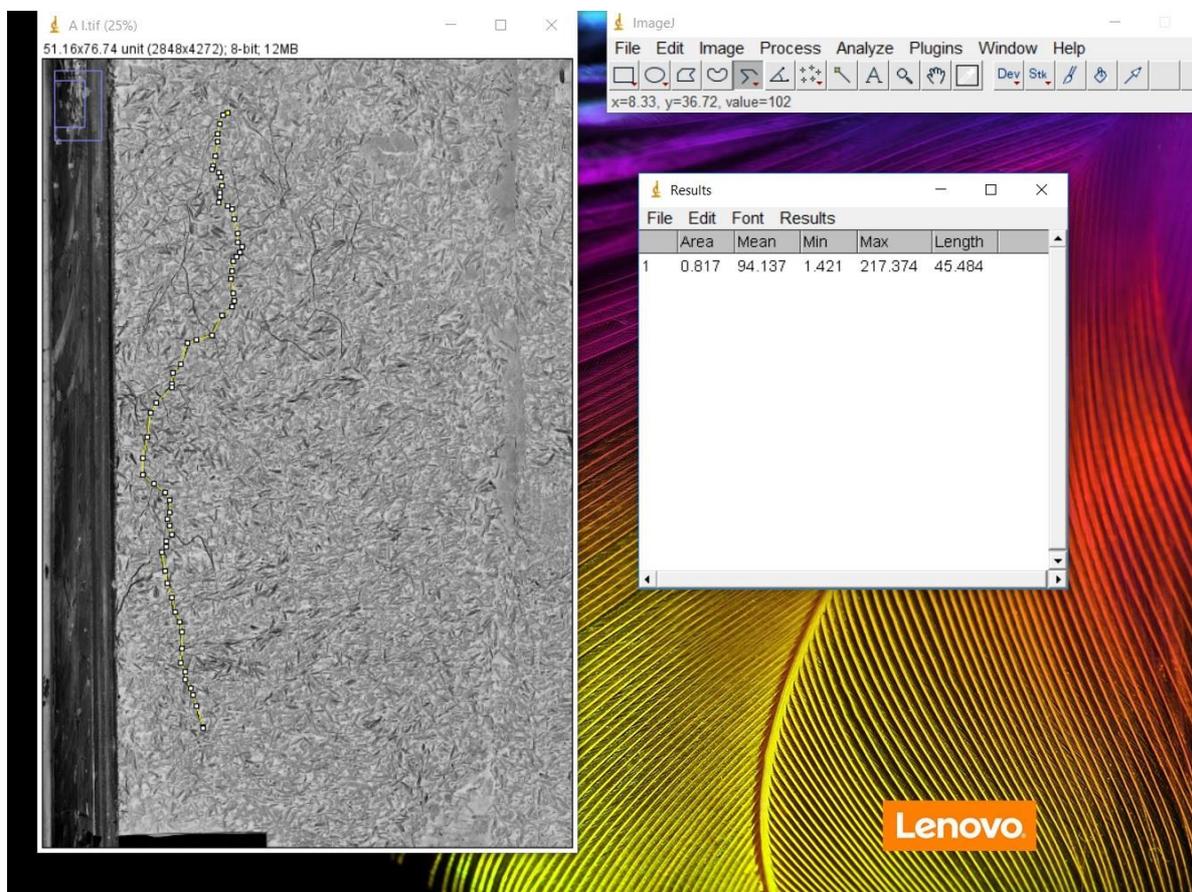
*Anexo 3. Instalación del estudio con rhizotrones aleatorizados*

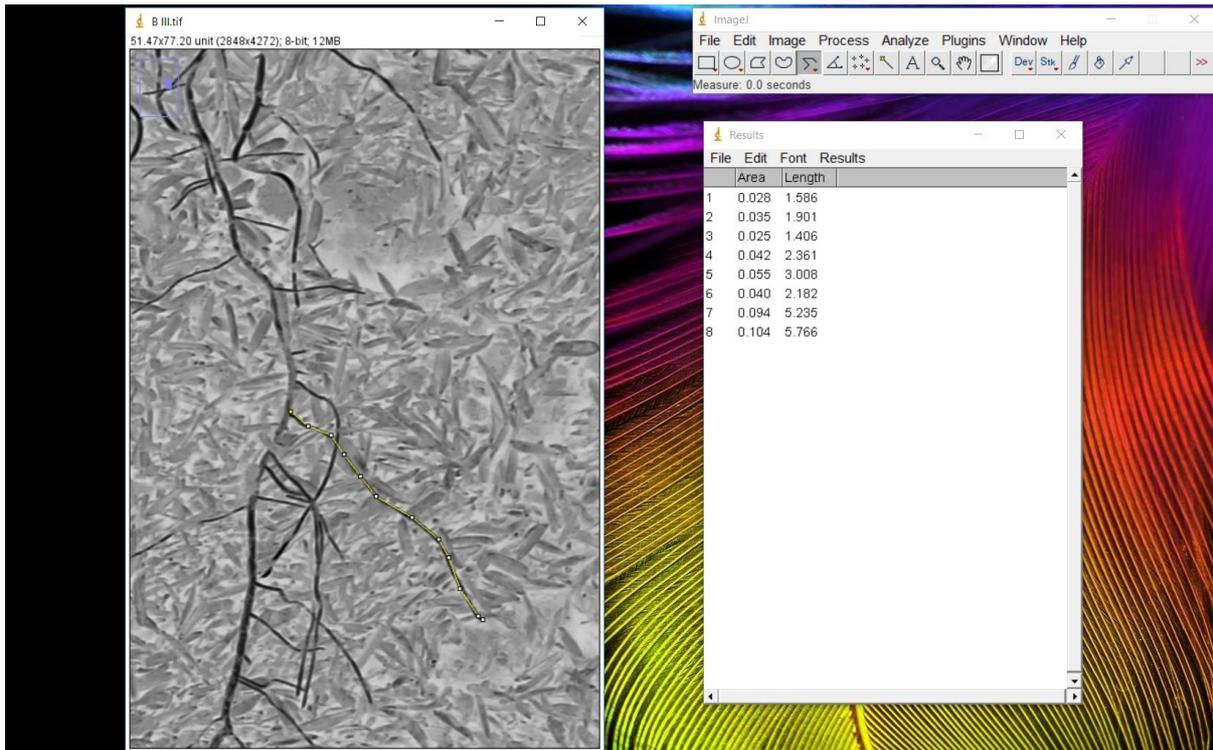


Anexo 4. Esquema de inoculación de *Trichoderma* spp. para todos los tratamientos



Anexo 5. Cuantificación de raíz primaria con ImageJ



*Anexo 6. Cuantificación de raíces secundarias utilizando ImageJ*

## Resultados:

Anexo 7. Análisis de varianza de todas las variables

### ANOVA PARA TODAS LAS VARIABLES

		G.L	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Altura de planta</b>	Tratamientos	5	292,311	58,462	1,158	,384
	Error Experimental	12	605,908	50,492		
	Total	17	898,219			
<b>Número de foliolos</b>	Tratamientos	5	2890,167	578,033	,584	,712
	Error Experimental	12	11878,333	989,861		
	Total	17	14768,500			
<b>Peso fresco del tallo</b>	Tratamientos	5	101,833	20,367	1,937	,161
	Error Experimental	12	126,167	10,514		
	Total	17	228,000			
<b>Peso seco del tallo</b>	Tratamientos	5	55,172	11,034	2,550	,085
	Error Experimental	12	51,925	4,327		
	Total	17	107,096			
<b>Peso fresco de la raíz</b>	Tratamientos	5	8,278	1,656	,939	,491
	Error Experimental	12	21,167	1,764		
	Total	17	29,444			
<b>Peso seco de la raíz</b>	Tratamientos	5	1,594	,319	,601	,701
	Error Experimental	12	6,368	,531		
	Total	17	7,962			
<b>Longitud de raíz primaria</b>	Tratamientos	5	88,384	17,677	1,918	,165
	Error Experimental	12	110,583	9,215		
	Total	17	198,968			
<b>Longitud de raíces secundarias</b>	Tratamientos	5	3728,433	745,687	1,973	,155
	Error Experimental	12	4535,692	377,974		
	Total	17	8264,125			

Anexo 8. Test de Duncan para todas las variables al 0,05%

Test de Duncan para todas las variables										
<b>Altura</b>	Cepa	N	1	<b>Peso seco tallo</b>	Cepa	N	1	2		
	A		3		23,1667	E		3	6,5267	
	E		3		23,4500	A		3	7,4917	7,4917
	Control		3		24,4167	Control		3	7,5417	7,5417
	C		3		28,0833	C		3	8,2350	8,2350
	D		3		32,1167	D		3	10,4833	10,4833
	B		3		33,0833	B		3		11,4400
	Sig.				,148	Sig.			,055	,055
<b>Número de folíolos</b>	Cepa	N	1	<b>Longitud raíz primaria</b>	Cepa	N	1	2		
	A		3		89,6667	D		3	37,3787	
	E		3		100,0000	E		3	38,3167	
	C		3		104,5000	Control		3	39,8033	39,8033
	Control		3		105,8333	C		3	40,5917	40,5917
	B		3		109,5000	A		3	40,6167	40,6167
	D		3		131,5000	B		3		44,3800
	Sig.				,166	Sig.			,255	,112
<b>Peso fresco tallo</b>	Cepa	N	1	<b>Longitud raíces secundarias</b>	Cepa	N	1	2		
	A		3		10,6667	E		3	61,6077	
	E		3		10,6667	B		3	71,8533	71,8533
	Control		3		11,8333	A		3	78,5947	78,5947
	C		3		12,5000	C		3	84,2710	84,2710
	D		3		15,3333	Control		3	92,0700	92,0700
	B		3		17,0000	D		3		106,6453
	Sig.				,052	Sig.			,105	,068
<b>Peso fresco raíz</b>	Cepa	N	1	<b>Peso seco raíz</b>	Cepa	N	1			
	A		3		1,8333	E		3	,9650	
	Control		3		2,3333	A		3	,9683	
	C		3		2,3333	D		3	1,0883	
	D		3		2,3333	Control		3	1,1983	
	E		3		2,5000	C		3	1,2900	
	B		3		4,0000	B		3	1,8367	
	Sig.				,096	Sig.			,209	