



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
PREVIO LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGRÍCOLA**

**MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**EFFECTO *IN VITRO* DE FUNGICIDAS Y BIOCHAR SOBRE *Sclerotium  
rolfsii***

**AUTORES:**

**LUIS MIGUEL SANTOS PONCE  
JULISSA SAMANTHA ZAMBRANO ZAMBRANO**

**TUTOR:**

**ING. FROWEN CEDEÑO SACÓN., M.Sc**

**CALCETA, NOVIEMBRE DE 2021**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Luis Miguel Santos Ponce y Julissa Samantha Zambrano Zambrano, declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO *IN VITRO* DE FUNGICIDAS Y BIOCHAR SOBRE *Sclerotium rolfsii*** es de autoría propia, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o planificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, se concede a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a favor propio todos los derechos patrimoniales de autores sobre la obra, en conformidad con el Artículo 144 del Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.

.....  
Luis Miguel Santos Ponce

CC: 1350036990

.....  
Julissa Samantha Zambrano Zambrano

CC: 1315574846

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Luis Miguel Santos Ponce y Julissa Samantha Zambrano Zambrano, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO *IN VITRO* DE FUNGICIDAS Y BIOCHAR SOBRE *Sclerotium rolfsii***, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



.....  
Luis Miguel Santos Ponce

CC: 1350036990



.....  
Julissa Samantha Zambrano Zambrano

CC: 1315574846

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Frowen Cedeño Sacón, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO *IN VITRO* DE FUNGICIDAS Y BIOCHAR SOBRE *Sclerotium rolfsii***, que ha sido desarrollado por Luis Miguel Santos Ponce y Julissa Samantha Zambrano Zambrano, previo a la obtención de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....  
Ing. Frowen Cedeño Sacón., M.Sc

CC: 1310353121

**TUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos APROBADO el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EFFECTO *IN VITRO* DE FUNGICIDAS Y BIOCHAR SOBRE *Sclerotium rolfsii***, que ha sido desarrollado por Luis Miguel Santos Ponce y Julissa Samantha Zambrano Zambrano, previo a la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....  
Ing. Galo Alexander  
Cedeño García., M.Sc

CC: 1311956831

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

.....  
Ing. Cristian Sergio  
Valdivieso López., M.Sc

CC: 1717929283

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

.....  
Ing. Sergio Miguel  
Vélez Zambrano., M.Sc

CC: 1310476773

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## AGRADECIMIENTO

A Dios por iluminar, guiar y permanecer con amor en todas las fases de nuestro proceso profesional, personal y laboral; porque gracias a sus bendiciones hoy hemos alcanzado una meta más.

A la familia de sangre y corazón, de manera muy especial a nuestros padres que son la inspiración y pilar fundamental en nuestra vida para seguir adelante.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López por habernos brindado una educación superior de gran calidad, la cual aportará significativamente al ámbito profesional.

A los docentes de la carrera de Ingeniería Agrícola quienes brindaron sus conocimientos de forma proactiva, magistral e impetuosa para constituirnos como profesionales a lo largo de todas las etapas de formación.

A un gran ser humano que hoy ya no está entre nosotros, pero sí en el corazón de todos los que conformamos la Carrera de Ingeniería Agrícola como es Federico Díaz Trelles, quien nos apoyó siempre en las fases investigativas y administrativas para poder alcanzar este mérito. De la misma forma a nuestro tutor Ing. Frowen Cedeño Sacón por su aporte, guía, atención y paciencia.

A todos los miembros del tribunal, en especial al Ing. Galo Alexander Cedeño García por proporcionarnos los aislados del patógeno, al Ing. Sergio Miguel Vélez Zambrano por haber contribuido con su experiencia, conocimientos en la planificación y ejecución del trabajo.

A el Programa Semillero de Investigadores (PSI) coordinado por el Ingeniero Ángel Guzmán Cedeño que influyó progresivamente en prepararnos y convertirnos en investigadores junior, concediéndonos muchos beneficios a lo largo de la carrera y que influirán positivamente en la vida profesional. A el Ing. Diego Zambrano Pazmiño por su apoyo, guía y enseñanza en esta fase de investigación.

Los autores...

## DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios contando con su bendición, por haberme dado la vida, por darme salud para lograr mis objetivos, ser mi fortaleza y coraje para no desmayar en cada uno de los problemas que se me presentaban, la valentía para encarar las adversidades y no desmayar en mi propósito.

A mis padres Ángel Santos Saltos y Sayda Ponce Esmeraldas por brindarme siempre su amor y apoyo incondicional, quiénes han sido mi pilar fundamental en todo lo que eh logrado en educación académica y guiarme por el camino correcto con las buenas costumbres y valores. A mis queridos hermanos que me brindaron su ayuda en todo momento.

Con mucha sencillez dedico infinitamente a la Familia García Bravo por darme la confianza y acogerme en su hogar lo cual me permitió continuar con mi formación académica y así poder lograr mi meta anhelada.

A toda mi familia, quienes también siempre me brindaron su apoyo, me motivaron para no rendirme en los momentos críticos, mis amigos, compañeros de clase y compañeras de trabajo que sin duda alguna forman parte de mis logros.

A Julissa Zambrano Zambrano a quién admiro como persona y compañera de estudio por ser ese ser especial que la caracteriza, por brindarme siempre su lealtad, nunca me cansaré de agradecer a Dios por ponerte en mi camino, has secado mis lágrimas, me has prestado tu hombro para llorar y apoyarme e incluso te has sacrificado muchas veces para ayudarme, por siempre estar en las buenas y en las malas, en la cual hemos compartido muchos momentos de tristeza y felicidad.

Luis Miguel Santos Ponce

## DEDICATORIA

A Dios por brindarme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida; volver a nacer espiritualmente, por su amor eterno, incondicional, gracia y misericordia; Él es mi inspiración para seguir cumpliendo mis sueños porque cada día anhelo agradecerle como su hija y modelarme a su semejanza, no me cabe duda que ha secado mis lágrimas y ha festejado mis victorias, donde quiera este siento su presencia y gozo, mi vida no sería completa sin Él. Dios es tan grandioso, que se interesa en los detalles más íntimos de mi vida, porque sus promesas permanecen en mi mente y mi corazón; es por esta y muchas razones más que le dedico este logro profesional.

Con amor a toda mi familia, incluidos tíos, abuelos, primos, en especial a mis padres José Zambrano Alcívar y Danny Zambrano Sacón por ser mi guía, fortaleza e inspiración; por brindarme su apoyo en todas las etapas de mi vida. A mis hermanos y sobrinos por su constante apoyo; quienes me inspiran a seguir estudiando, deseo tanto sean personas de bien guiadas por Dios, los amo a todos.

A la familia Vélez Guerreño quienes considero y quiero mucho, en lo personal a mi novio Javier Vélez Guerrero de quien estoy muy orgullosa por su personalidad; aunque los destinos cambien a diferentes direcciones estaré muy agradecida por su respeto, amor, compañía, paciencia, simpatía que lo caracterizan, por ser esa persona que Dios ha puesto en mi camino, quien me inspira a ser mejor tanto en lo profesional como lo espiritual.

A mi compañero de tesis Luis Santos Ponce por enseñarme que la vida se trata de ayudar sin esperar nada a cambio, del cual estoy orgullosa porque me demostró que en el camino siempre existirá situaciones buenas y malas pero que estas no duran para siempre, “Dios recompensa los sufrimientos con alegrías”.

Julissa Samantha Zambrano Zambrano



## CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN .....	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR .....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA .....	vii
DEDICATORIA .....	viii
CONTENIDO GENERAL .....	ix
CONTENIDO DE TABLAS.....	xiii
CONTENIDO DE FIGURAS.....	xiv
CONTENIDO DE FÓRMULAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
PALABRAS CLAVES.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
KEY WORDS.....	xvi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES .....	1
1.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	2
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. HIPÓTESIS PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER .....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. FRIJOL .....	5
2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	5
2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	6
2.1.3. ENFERMEDADES.....	7
2.1.4. IMPORTANCIA DE ENFERMEDAD PROVOCADA POR <i>Sclerotium rolsii</i> 7	
2.1.5. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y SINTOMATOLOGÍA.....	7

2.1.6.	CICLO DE LA ENFERMEDAD .....	7
2.1.7.	CONDICIONES ADECUADAS PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD .....	8
2.1.8.	SÍNTOMAS EN LA PLANTA.....	8
2.1.9.	PROPAGACIÓN Y DISEMINACIÓN.....	9
2.1.10.	CONTROL.....	9
2.1.11.	RESISTENCIA A FUNGICIDAS .....	9
2.2.	FUNGICIDAS.....	10
2.2.1.	BENZIMIDAZOLES .....	10
2.2.1.1.	THIOFANATO METIL.....	10
2.2.1.2.	BENOMYL.....	11
2.2.1.3.	TIABENDAZOL .....	11
2.2.1.4.	CARBENDAZIM.....	12
2.2.2.	TRIAZOLES.....	12
2.2.2.1.	PROPICONAZOL .....	13
2.2.2.2.	DIFENOCONAZOL (Briones y Tinoco, 2012).....	13
2.2.3.	PROTECTANTES .....	14
2.2.3.1.	CLOROTALONIL .....	14
2.2.3.2.	SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO (ADAMA, 2019) .....	14
2.2.4.	DE SUELO .....	15
2.2.4.1.	VITAVAX.....	15
2.2.4.2.	TERRACLOR (Edifarm, 2016) .....	15
2.3.	BIOCHAR.....	16
2.3.1.	PROPIEDADES.....	16
2.3.2.	PRODUCCIÓN .....	17
2.3.3.	COMPOSICIÓN.....	17
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....		19
3.1.	UBICACIÓN.....	19
3.2.	DURACIÓN DEL TRABAJO .....	19
3.3.	FASE I DE LA INVESTIGACIÓN .....	19
3.3.1.	FACTOR EN ESTUDIO .....	19
3.3.2.	NIVELES Y TRAMIENTOS.....	19

3.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	19
3.3.3.1. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA .....	19
3.3.4. UNIDAD EXPERIMENTAL .....	20
3.3.5. VARIABLES RESPUESTAS .....	20
3.3.5.1. CRECIMIENTO RADIAL .....	20
3.3.5.2. PORCENTAJE DE CRECIMIENTO .....	20
3.3.5.3. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN .....	21
3.3.5.4. NÚMERO DE ESCLEROCIOS.....	21
3.3.5.5. VIABILIDAD DE ESCLEROCIOS .....	21
3.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
3.3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	22
3.3.7.1. OBTENCIÓN DE AISLADOS .....	22
3.3.7.2. REFRESCADO DE CEPAS .....	22
3.3.7.3. TEST <i>IN VITRO</i> CON FUNGICIDAS .....	23
3.4. FASE II DE LA INVESTIGACIÓN .....	23
3.4.1. FACTORES EN ESTUDIO .....	23
3.4.2. NIVELES Y TRATAMIENTOS .....	24
3.4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	24
3.4.3.1. ESQUEMA DE ANÁLISI DE VARIANZA.....	24
3.4.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	25
3.4.4.1. TEST <i>IN VITRO</i> BENZIMIDAZOLES DOSIS .....	25
3.5. FASE III DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
3.5.1. FACTORES EN ESTUDIO .....	25
3.5.2. NIVELES Y TRATAMENTOS .....	25
3.5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	26
3.5.3.1. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA .....	26
3.5.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	26
3.5.4.1. TEST <i>IN VITRO</i> BIOCHAR .....	26
3.6. FASE IV DE LA INVESTIGACIÓN .....	26
3.6.1. FACTORES EN ESTUDIO .....	26
3.6.2. NIVELES Y TRATAMIENTOS .....	26
3.6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27

3.6.3.1. ESQUEMA ANÁLISIS DE VARIANZA .....	27
3.6.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	27
3.6.4.1. REFRESCADO DE CEPAS .....	27
3.6.4.2. TEST BIOCHAR Y FUNGICIDAS .....	27
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
4.1. SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> A FUNGICIDAS COMERCIALES, DE <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	29
4.2. EFECTO <i>IN VITRO</i> BIOCHAR Y DOSIS SOBRE <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	36
4.3. EFECTO <i>IN VITRO</i> COMBINACIÓN BIOCHAR Y FUNGICIDAS SOBRE <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	41
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	47
5.1. CONCLUSIONES .....	47
5.2. RECOMENDACIONES .....	47
BIBLIOGRAFÍA .....	49
ANEXOS .....	57

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 3. 1. Análisis de varianza .....	20
Tabla 3. 2. Análisis de varianza de benzimidazoles y dosis .....	24
Tabla 3. 3. Análisis de varianza dosis de biochar .....	26
Tabla 3. 4. Análisis de varianza de combinación biochar y fungicidas.....	27
<b>Tabla 4. 1.</b> Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) in vitro en medio PDA con fungicidas sobre <i>Sclerotium rolfsii</i>	30
<b>Tabla 4. 2.</b> Resultado comparación de medias para el número de esclerocios y viabilidad	30
<b>Tabla 4. 3.</b> Significancia del Análisis de varianza de la variable PICR y número de esclerocios producidos, a partir de aislados <i>S. rolfsii</i> tratados con fungicidas benzimidazoles a diferentes dosis bajo condiciones in vitro.	32
<b>Tabla 4. 4.</b> Prueba de comparación de medias Tukey 5% de error, en la actividad inhibitoria de benzimidazoles sobre <i>S. rolfsii</i> a diferentes concentraciones.	34
<b>Tabla 4. 5.</b> Significancia de Análisis de varianza (ADEVA), del efecto in vitro de biochar y diferentes dosis en el porcentaje de crecimiento micelial y número de esclerocios producidos sobre <i>S. rolfsii</i> .	37
<b>Tabla 4. 6.</b> Comparación estadística de medias Tukey ( $p > 0,5$ ) de error, aplicada a la variable porcentaje de crecimiento utilizando biochar sobre <i>S. rolfsii</i> a diferentes concentraciones bajo condiciones in vitro.	38
<b>Tabla 4. 7.</b> Prueba de comparación de medias, a la variable número de esclerocios producidos y porcentaje de viabilidad, a partir de aplicación 3 tipos de biochar a diferentes dosis sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> bajo condiciones in vitro.	40
<b>Tabla 4. 8.</b> Análisis de varianza (ADEVA), del efecto in vitro de combinación biochar y fungicidas para la variable PICM y número de esclerocios producidos sobre <i>S. rolfsii</i> .	42
<b>Tabla 4. 9.</b> Comparación estadística de medias Tukey ( $p > 0,5$ ) de error, aplicada a la variable porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando biochar, benomyl y difenoconazol sobre <i>S. rolfsii</i> bajo condiciones in vitro.	44
<b>Tabla 4. 10.</b> Número promedio de esclerocios producidos y porcentaje de viabilidad, a partir de aplicación 3 tipos de biochar y fungicidas (benomyl, difenoconazol) sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> bajo condiciones controladas.	45

## CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 4. 1.</b> Sensibilidad in vitro de fungicidas del grupo químico benzimidazoles sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> ; crecimiento de <i>S. rolfsii</i> a las 216 horas después de la inoculación: (A) Testigo R4; (B) Benomyl 1000ppm R1; (C) Metil tiofanato 100ppm R3; (D) Carbendazim 100ppm R1; (E) Thiabendazol 1000ppm R2. ....	35
<b>Figura 4. 2.</b> Desarrollo a los 40 días después de la inoculación. (A) Testigo R3; (B) Benomyl 100ppm R1; (C) Metil tiofanato 1000ppm R4; (D) Carbendazim 1ppm.R4; (E) Thiabendazol 1 ppm R2. ....	36
<b>Figura 4. 3.</b> Viabilidad de esclerocios producidos en sensibilidad de bezimidazoles con medio PDA evaluado las 24 horas después de la inoculación. (A) Testigo R2; (B) Benomyl 1ppm R1; (C) Metil tiofanato 1ppm R3;(D) Carbendazim 10ppm R3; (E) Thiabendazol 10ppm R1. ....	36
<b>Figura 4. 4.</b> Producción de esclerocios a los 30 días después de la inoculación. (A) Algarrobo 1g R5; (B) Algarrobo 3g R5; (C) Algarrobo 5g R4; (D) Arroz 1g R4; (E) Arroz 3g R4; (F) Arroz 5g R4; (G) Cacao 1g R4; (H) Cacao 3g R5; (I) Cacao 5g R2; (J) Testigo R2; (K) Testigo R5.....	41
<b>Figura 4. 5.</b> Efectividad de biochar sobre la viabilidad de esclerocios de <i>S. rolfsii</i> , en medio PDA evaluado las 24 horas después de la inoculación. A) Algarrobo 1g R4; (B) Algarrobo 3g R1; (C) Algarrobo 5g R2; (D) Arroz 1g R1; (E) Arroz 3g R4; (F) Arroz 5g R3; (G) Cacao 1g R4; (H) Cacao 3g R1; (I) Cacao 5g R3; (J) Testigo R1; (K) Testigo R2. ....	41
<b>Figura 4. 6.</b> Producción de esclerocios a los 40 días después de la siembra. (A) Algarrobo+benomyl R1; (B) Arroz+benomyl R5; (C) Cacao+benomyl R3; (D) Testigo R1.....	46
<b>Figura 4. 7.</b> Efecto combinado de fungicidas y biochar sobre la viabilidad de esclerocios de <i>S. rolfsii</i> , en medio PDA evaluado las 24 horas después de la inoculación. A) Algarrobo+benomyl R4; (B) Arroz+benomyl R4; (C) Cacao+benomyl R2; (D) Testigo R1 .....	46

## CONTENIDO DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Porcentaje de crecimiento .....	20
Fórmula 2. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial.....	21

## RESUMEN

En el Ecuador una de las principales actividades agrícolas de los pequeños productores es el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La pudrición blanca, enfermedad causada por el hongo *Sclerotium rolfsii*, provoca pérdidas considerables en las plantaciones; situación que ínsita al uso irracional de fungicidas, lo que induce resistencia del fitopatógeno. Para este fin se evaluó el efecto de fungicidas y biochar sobre *S. rolfsii in vitro*. Se determinó la sensibilidad a fungicidas comerciales: carboxim-thiram, pentacloronitrobenzoceno, difenonazol, propiconazol, sulfato de cobre pentahidratado, benomyl, carbendazim (2000ppm); los dos bezimidazoles antes mencionados junto a metil tiofanato y thiabendazol bajo dosis (1, 10, 100 y 1000ppm). Como una alternativa biofungicida se definió el efecto de biochar (arroz, cacao y algarrobo) a diferentes concentraciones (1,3, 5 g 100ml<sup>-1</sup>); de los cuales se estableció la combinación con benomyl y difenoconazol. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial. La comparación de medias utilizada fue Tukey ( $p>0,5$ ). Se evidenció el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de inhibición (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 horas), número de esclerocios, porcentaje de viabilidad. Los mejores resultados de inhibición (100%) fueron presentados por los fungicidas carboxim-thiram, difenoconazol, pentacloronitrobenzoceno, propiconazol y sulfato de cobre pentahidratado, a diferencia de los fungicidas clorotalonil, benomil, carbendazim, metil tiofanato y thiabendazol que no impidieron el crecimiento miceliar. El biocarbón de algarrobo, arroz estimulan el crecimiento (100%), mientras que el de cacao sólo lo retrasa; se considera no es una alternativa confiable para el control de la enfermedad.

## PALABRAS CLAVES

Fitopatógeno, *In vitro*, sensibilidad, Fungicidas, Biochar, Esclerocios, Viabilidad

## ABSTRACT

In Ecuador, one of the main agricultural activities of small producers is the cultivation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). White rot, a disease caused by the fungus *Sclerotium rolfsii*, causes considerable losses in plantations; a situation that encourages the irrational use of fungicides, which induces resistance of the phytopathogen. For this purpose, the effect of fungicides and biochar on *S. rolfsii* *in vitro* was evaluated. Sensitivity to commercial fungicides was determined: carboxim-thiram, pentachloronitrobenzene, difenoconazole, propiconazole, copper sulfate pentahydrate, benomyl, carbendazim (2000ppm); the two aforementioned bezimidazoles together with methyl thiophanate and low-dose thiabendazole (1, 10, 100 and 1000ppm). As a biofungicidal alternative, the effect of biochar (rice, cocoa and carob) was defined at different concentrations (1,3,5 g 100ml<sup>-1</sup>); of which the combination with benomyl and difenoconazole was established. A completely randomized experimental design with factorial arrangement was used. The comparison of means used was Tukey ( $p > 0.5$ ). The effect of the treatments on the inhibition percentage (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 hours), number of sclerotia, percentage of viability was evidenced. The best inhibition results (100%) were presented by the fungicides carboxim-thiram, difenoconazole, pentachloronitrobenzene, propiconazole and copper sulfate pentahydrate, unlike the fungicides chlorothalonil, benomyl, carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole that did not prevent mycelial growth. The biochar of carob, rice stimulate growth (100%), while that of cocoa only delays it; It is considered not a reliable alternative for the disease control.

## KEY WORDS

Phytopathogen, In vitro, sensitivity, Fungicides, Biochar, Sclerotia, Viability



# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L) es una leguminosa de consumo humano de gran importancia en América latina y en todo el mundo ya que aporta minerales, proteínas además forma parte de la dieta básica alimenticia, su bajo rendimiento está ligado a múltiples causas, de índole biótica y abiótica, entre los que destacan como factores limitantes las plagas y enfermedades, en especial las provocadas por fitopatógenos de origen fúngico (Beebe et al., 2017).

Según Granados (2020), la marchitez es una enfermedad provocada por *Sclerotium rolfsii* S. hongo fitopatógeno que afecta a una diversidad de especies vegetales incluyendo a *P. vulgaris*, genera daños como la pudrición basal del tallo y raíz induciendo así el marchitamiento y posteriormente la muerte de las plantas, su forma de dispersión y reproducción le permite propagar y dañar muy rápido los tejidos vegetales si este cuenta con las condiciones adecuadas.

La gran capacidad que tiene el hongo para permanecer en el suelo, semillas y en residuos vegetales induce a un difícil manejo, causa que genera pérdidas agronómicas y por ende económicas en el cultivo de frejol perjudicando así significativamente a los pequeños, medianos productores y así mismo a la seguridad alimentaria (Guardado y Ramírez, 2018).

Según Loor (2017), los hongos fitopatógenos conllevan a pérdidas agrícolas en todo el mundo esta situación obliga al uso de fungicidas se ha convertido en una práctica continua como método de control sin embargo en Ecuador los agricultores desconocen la aplicación de dosis correctas y los mecanismos de acción de diferentes grupos de fungicidas usados. Los daños ocasionados por *S. rolfsii* y su complicado control promueve a los productores a la rotación y aumento del uso de moléculas químicas causa por la cual se limita su eficiencia, razón por la que el patógeno se vuelve más tolerante ya que provoca una acción de resistencia hacia los fungicidas.

Según Medina et al. (2020), el biochar es una estrategia orgánica benéfica que produce un hábitad adecuado para microorganismos debido a su alto contenido de carbono que provee modificaciones favorables tanto en propiedades físicas y químicas del suelo, propiciando desempeño antagónico sobre fitopatógenos. Su aplicación en la agricultura ha mostrado un efecto positivo al reducir de incidencia y severidad en cuanto a enfermedades de origen microbiota (Spokas et al., 2011). Bonanomi et al., (2018) describe que el biocarbón es una enmienda producto de pirolisis utilizada para el control de oomicetos, bacterias y hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*.

¿Cómo influyen los fungicidas y biochar sobre *Sclerotium rolfsii* en condiciones *in vitro*?

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador el cultivo de *P. vulgaris* es la práctica agrícola principal de pequeños productores, según el Banco Central Ecuador (BCE, 2019) la superficie sembrada de frejol ascendió en un 4%. Manabí representa un 54,9% de Unidades de Producción Agrícola (UPA) pertenece a pequeños productores con predios de 0 a 5 hectáreas y los medianos el 24,6% con superficie 5 a 20. La asistencia técnica a lo largo de los últimos años ha sido dirigida con prioridad a los a los grandes productores, es necesario la intervención de medidas tecnológicas que ayuden a optimar el uso apropiado de fungicidas con el fin de mejorar la producción (MAGAP, 2016).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (FAO, 2018), señala que las enfermedades constituyen uno de los principales factores de riesgo para la producción de las leguminosas por lo que es importante protegerlos del ataque de varios patógenos. *P. vulgaris* presenta susceptibilidad ante el ataque de enfermedades fungosas tanto en el proceso de crecimiento como de producción. Los daños ocasionados por el hongo patógeno *S. rolfsii* genera pérdidas económicas, provocando a los agricultores a incrementar la frecuencia de aplicación, uso incorrecto de fungicidas, esto ha generado la resistencia de hongos fitopatógenos sobre algunos

agroquímicos frecuentemente utilizados que no ejercen una acción total sobre el hongo.

Es por esta razón que se busca alternativas sustentables que responda de forma eficiente, por lo tanto, nace la necesidad de evaluar productos químicos que tengan la capacidad de ejercer efectividad de control sobre *S. rolfsii*, evitando costos infructuosos en el manejo de la enfermedad en los cultivos. El presente trabajo pretende evaluar el efecto *in vitro* de grupos y dosis de fungicidas sobre *S. rolfsii*.

El biochar asume un papel importante en la agricultura ya que gracias a su gran contenido de carbono proporciona propiedades eléctricas de oxidación y reducción, mejora la actividad bioquímica en el suelo, facilitando hábitat para los microorganismos (Kelpie, 2014). En los últimos años se ha intensificado opciones sostenibles que además de evitar la degradación de los suelos y obtener nutrientes, ayuden a disminuir problemas fitopatógenos que afectan al sector agrícola, esta forma evidenciar la eficiencia del biochar. Se pretende prevenir la presencia y evitar el crecimiento del hongo con la aplicación de concentraciones de biochar *in vitro* coadyuvando así a la incrementación e intensificación de la producción de alimentos de forma segura (Ocegueda et al., 2020).

Además, este proyecto aporta a lo propuesto por la Organización de Naciones Unidas (ONU, 2015) en el documento Transformar nuestro mundo: Agenda 2030 Con el desarrollo sostenible, en su objetivo número dos: “Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible”. En su meta número 2.4 De aquí a 2030, asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicar prácticas agrícolas resilientes que aumenten la productividad y la producción, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático, los fenómenos meteorológicos extremos, las sequías, las inundaciones y otros desastres, y mejoren progresivamente la calidad de la tierra y el suelo.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de fungicidas y biochar sobre *Sclerotium rolfsii* en condiciones *in vitro*.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la sensibilidad *in vitro* a fungicidas comerciales, de *Sclerotium rolfsii*
- Definir el efecto de concentraciones de biochar en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*
- Establecer el efecto combinado *in vitro* de fungicidas con biochar sobre *Sclerotium rolfsii*

### **1.4. HIPÓTESIS PREMISAS Y/O IDEAS A DEFENDER**

¿Los fungicidas y biochar influyen sobre el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*?

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. FRIJOL

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las especies más significativa para el consumo humano, entre las leguminosas de grano alimenticias tiene gran importancia en la dieta diaria, por su alto contenido proteico de minerales esenciales, carbohidratos y proteínas que le atribuyen a un producto clave en la seguridad alimentaria de la población, se encuentra distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Suárez et al., 2016).

En el litoral ecuatoriano los pequeños agricultores son los principales cultivadores del frijol, orientada su producción al consumo propio o para el mercado local, esta leguminosa se siembra preferiblemente en la época seca, diferentes variedades de acuerdo a la demanda del consumidor que va desde el color claro: amarillo, blanco y rojo dependiendo de la región y gusto del consumidor (Garcés et al., 2015).

#### 2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según Cronquist (1981), el frijol tiene la siguiente clasificación taxonómica:

**Reino:** Plantae

**Subreino:** Tracheobiontha

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsidae

**Subclase** Rosidae

**Orden:** Fabales

**Familia:** Fabaceae

**Género:** *Phaseolus*

**Especie:** *vulgaris*

### 2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Según Valladares (2010), el frijol es una planta verde herbácea, erecta, arbustiva que posee abundantes hojas la cual presenta un tallo principal del cual se desprenden sus ramas con tamaño variable, de acuerdo a la variedad pueden ser erecto, semierecto miden entre 30-90 cm de longitud, presenta tallo, hojas y vainas pubescentes, es una leguminosa importante para el consumo poblacional ya que contiene proteínas ricas e indispensables para la dieta básica de aquellos que lo consuman.

Continúa describiendo que la raíz principal del frijol es pivotante y profunda, sus pequeñas ramificaciones laterales le permiten absorber agua y nutrientes disponibles, este sistema radical tiende a ser fasciculado o fibroso. *Phaseolus vulgaris* en sus raíces presenta pequeños nódulos los cuales tienen forma poliédrica donde habitan bacterias del género *Rhizobium* las cuales fijan nitrógeno en el suelo, para así satisfacer sus requerimientos nutricionales. El tallo es el eje que permite la estabilidad de la planta está formado por una asociación de nudos y entrenudos, erecto, semiprostrado.

Sigue mencionando que cuenta con dos tipos de hojas simples y compuestas, las hojas primitivas o también conocidas como falsas crecen de forma enfrentada (opuesta), unifoliadas y las hojas auténticas son trifoliadas; los folíolos pueden tener forma lineal, ovalada y/o lanceolada, estas presentan variación en tamaño color y forma de acuerdo a la variedad. Las flores crecen en grupos pequeños, estas pueden tener varios colores como: blancas, moradas, amarillas o blancas con manchas moradas, son hermafroditas (autógamas).

Finalmente, manifiesta que la semilla es la parte reproductora de la planta, el cual es el producto de la flor, las semillas tienen diferentes colores y tamaños dependiendo de la variedad como rojas, negras, blancas, amarillas y otros. Las vainas pueden llegar a tener alrededor de 6 a 21 granos, presenta una vaina lineal o encorvada de 10 a 25 cm de longitud.

### **2.1.3. ENFERMEDADES**

El cultivo de frijol presenta problemas que afectan sus plantaciones, una de ellos son las enfermedades como marchitez y pudriciones radicales donde sus autores son especialmente los hongos como *Rhizoctonia*, *Fusarium Phytium* y *Sclerotium*, causa que implica el aumento de fumigaciones siendo esta la principal estrategia de control, esta actividad contribuye al incremento de costos (BCE, 2020).

### **2.1.4. IMPORTANCIA DE ENFERMEDAD PROVOCADA POR *Sclerotium rolsii***

Madariaga et al. (2018), afirman que la pudrición blanca también conocida como marchitez ocasionada por el hongo patógeno *Sclerotium rolsii* S es una enfermedad destructora que afecta drásticamente a los cultivos de hortalizas, puede generar pérdidas del cultivo y por ende económicas considerables pues afecta directamente al cuello de la raíz, tallo, hojas y vainas. La importancia de esta enfermedad radica en que el patógeno puede atacar a la planta durante todo su ciclo de vida con pérdidas del 25% en época seca y hasta 100% en época lluviosa puede sobrevivir en residuos vegetales, malezas, suelo u otras plantas por al menos un año.

### **2.1.5. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD Y SINTOMATOLOGÍA**

Según Buechel (2020), la pudrición blanca es causada por el hongo *Sclerotium* spp el cual desarrolla estructuras de resistencia llamadas esclerocios de color negro o marrón se activan muchas veces con los compuestos azufrados presentes en las raíces, su forma es casi redonda mide alrededor de 0,2 a 0,5 mm de diámetro, tienen la capacidad de resistir en el suelo por más de 20 años sin perder su efectividad.

Continúa mencionando que una vez que los esclerocios germinan, las hifas crecen alcanzando los tejidos de la planta formando una estructura algodonosa de color blanco en el cuello de la planta, causando su pudrición del tallo, mientras que la parte aérea de la planta se torna de color amarillo hasta que finalmente muere.

### **2.1.6. CICLO DE LA ENFERMEDAD**

Según Madariaga et al. (2018), cuando el esclerocio el cual está en fase de reposo en el suelo y se expone a temperaturas mayores a 27 °C este germina y las hifas

crecen, penetrándose así en los tallos y otras estructuras de la planta ocasionando la enfermedad producida por el hongo *Sclerotium rolfsii*, generalmente este patógeno utiliza enzimas pectinolíticas en conjunto con ácido oxálico los cuales descomponen la pared celular de la planta muchas veces sin necesidad de existir heridas.

Continúa manifestando que después de que *Sclerotium rolfsii* se establece en el tejido de la planta, desarrolla micelio de color blanco tipo algodón en el lugar de la infección este termina con una forma reconocida de abanico, el cual continúa avanzando hacia otras partes estructurales de la planta. Si las temperaturas varían de 27 a 35 °C el micelio se comienza a enrollar, en el transcurso de 4 a 7 días después de la infección se forma esclerocio de color blanco pasando a color marrón o negro.

Finalmente menciona que *Sclerotium rolfsii* no produce esporas, como la mayoría de los agentes patógenos fúngicos, el esclerocio es levemente más pesado que las esporas, por lo tanto, la probabilidad de que el viento sea un mecanismo de transporte es mínima, pero si es probable que se disemine por el agua, animales, maquinaria e implementos agrícolas, de esta forma se propaga la enfermedad.

### **2.1.7. CONDICIONES ADECUADAS PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD**

Las temperaturas que oscilan entre 27-35°C en conjunto con la alta humedad proporcionan el máximo crecimiento miceliar. En suelos arenosos y ácidos con pH entre 2-5 el micelio crece, así mismo se produce la germinación de los esclerocios, mientras que un pH por encima de 7 puede inhibir su crecimiento, estos son factores que proporciona a la enfermedad una mayor severidad y estimulan la infección del hongo en la planta (Guardado y Ramírez, 2018).

### **2.1.8. SÍNTOMAS EN LA PLANTA**

Los iniciales síntomas claros de *Sclerotium rolfsii* se manifiestan en las raíces, tallos, hojas y frutos, una vez que estos han estado en contacto con el suelo. Habitualmente, se forman afectaciones color marrón convirtiéndose en tejido necrosado y acuoso, una vez afectadas estas partes la planta se marchitan y se



convierten cloróticas ya que existe una dificultad de la absorción de agua y nutrientes disponibles, muchas veces si el ambiente es cálido y húmedo se manifiesta el micelio blanco sobre los tejidos. Si existe una alta densidad de sombra y humedad la enfermedad tiende a propagarse en una misma planta o entre otras produciendo nuevas infecciones (Buechel, 2020).

### **2.1.9. PROPAGACIÓN Y DISEMINACIÓN**

Según el Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura (INTAGRI, 2017), el hongo se reproduce por medio de estructuras rígidas llamada esclerocios que son distribuciones de resistencia formados por compactación de hifas los cuales al incluirse en la planta germinan formando nuevas hifas, crece de manera intracelular hasta llegar al tejido vascular donde infecta con la ayuda de enzimas degradadoras, esta actividad de germinación ocurre a las 24 horas después del contacto, provocando así la muerte del tejido y por ende de la célula.

Sigue mencionando que la diseminación se puede dar por diferentes medios como: escorrentías, semillas infectadas, animales y personas que están en contacto con el suelo, aunque, una de las más comunes es a través del movimiento del suelo con herramientas y maquinarias agrícolas, ya que al arar el suelo puede trasportar estructuras del hongo, esclerocios o bulbos enfermos de un campo a otro.

### **2.1.10. CONTROL**

Una vez que el hongo se encuentra en el suelo es casi imposible eliminarlo, este necesita un control principalmente preventivo que se trata de medidas culturales como el lavado y desinfección de herramientas e implementos agrícolas antes trabajar en el campo, además la correcta eliminación de estructuras vegetales contaminadas (Madariaga et al., 2018).

### **2.1.11. RESISTENCIA A FUNGICIDAS**

En el Ecuador se utiliza tradicionalmente el uso excesivo e indiscriminado de fungicidas, como una alternativa fácilmente disponible causa que ha creado incremento en costo dentro de la economía de producción, contaminación ambiental, intoxicación severa a los agricultores, además el desarrollo de plagas y

enfermedades que cada vez se tornan más resistentes y agresivas. Produciendo así pérdidas cualitativas y cuantitativas en la producción agrícola (Chirinos et al., 2020).

La resistencia a fungicidas Alfaro (2019), la define como “la capacidad desarrollada por un hongo para sobrevivir y seguir reproduciéndose en presencia de una cantidad de fungicida que previamente fue nociva o fatal” (p.16), siendo un factor crítico ya que limita la eficiencia del manejo, disminuye la capacidad de efectividad, esta situación atribuye a costos económicos para el productor agrícola.

## **2.2. FUNGICIDAS**

Los fungicidas que comúnmente se utilizan para el control de *S. rolfsii* son de la familia de los benzimidazoles y las mezclas de estrobilurinas y triazoles; son aquellos que actúan de primero sobre la unión de la tubulina de los hongos durante la mitosis inhibiendo la división celular y provocan efectos negativos sobre la germinación de esporas y el crecimiento de hifas (Bravo, 2015).

### **2.2.1. BENZIMIDAZOLES**

Según Valerin (1996), los fungicidas de la familia química benzimidazoles más utilizados en la agricultura para el control de patógenos son: thiabendazol, tiofanato metil, benomyl y carbendazim. Los fungicidas pertenecientes a este grupo químico son ampliamente usados en la agricultura, estos presentan un alto grado de resistencia en algunas especies de hongos (FRAC, 2018).

#### **2.2.1.1. THIOFANATO METIL**

Según Edifarm (s.f.), thiofanato metil presenta las siguientes características:

**Nombre común:** Thiofanato Metil

**Acción Fitosanitaria:** Fungicida sistémico que tiene propiedades, preventivas y curativa característica que le permite controlar varias enfermedades sin necesidad de realizar varias aplicaciones.

**Modo de acción:** Este fungicida posee una eficacia selectiva, mantiene una actividad larga debido a su estabilidad sobre la luz solar. Debido a su acción

sistémica este puede ser aplicado en el suelo, las plantas lo adsorben por medio de las raíces hasta llegar al follaje, una vez penetrada en los tejidos de la planta empieza a ejercer su acción.

**Toxicidad:** Pertenece a la categoría Toxológica IV

#### 2.2.1.2. BENOMYL

A continuación, Tecniagrícola (2019), resalta las características más relevantes de benomyl:

**Composición:** Benomilo 50 %

**Efecto:** Evita las enfermedades fúngicas y las corrige.

**Modo de acción:** Sistémico, preventivo y curativo.

**Mecanismos de acción:** Ejerce su acción sobre los patógenos a nivel de la tubulina de las células, la cual impide la división celular es decir el proceso de mitosis, el cual inmoviliza cualquier desarrollo fúngico, el cual provoca la inmediata destrucción del patógeno.

**Control:** Este fungicida actúa sobre *Rhizoctnia solani*, *Rhizoctnia sp.*, *Sclerotinia sclerotium*, *sclerotinia, sp.*, *Sclerotium rolfsii*, entre otros.

**Toxicología:** Producto dañino si se inhala.

**Efecto:** Previene, atenúa, corrige enfermedades fúngicas.

#### 2.2.1.3. TIABENDAZOL

**Mecanismo de acción:** Producto que trabaja inhibiendo la división celular. Tiabendazol afecta esta formación del uso acromático. Se encarga de inhibir la mitosis la cual al unirse con la tubulina impide de esta manera el desarrollo y crecimiento del hongo.

**Modo de acción:** Se moviliza sistemáticamente por toda la planta brindando una protección adicional en los tejidos nuevos o expuestos.

**Modo de empleo-** Preparación Post – Cosecha (Syngenta S.A, s.f.)

#### **2.2.1.4. CARBENDAZIM**

Según la empresa de Insumos Agroquímicos (INSUAGRO, s.f.) el carbendazim tiene los siguientes componentes:

**Principio activo:** Carbendazim 50 %.

**Nomenclatura química:** 2- metoxicarbamoil- bencimidazol

**Clasificación química:** benzimidazol

**Formulación:** Suspensión concentrada

**Acción:** Sistémica preventiva y curativa

**Uso:** Fungicida

**Toxicología:** IV- verde

**Descripción:** Fungicida sistémico de suspensión concentrada, indicado para prevenir o curar mediante la pulverización o inmersión de baño a los diferentes cultivos los cuales se detallan en la etiqueta, ya sea este para plantas en post cosecha, para controlar los hongos durante el periodo de almacenamiento.

**Fitotoxicidad:** Es un producto no fitotóxico cuando este se usa con las indicaciones marcadas en el producto.

#### **2.2.2. TRIAZOLES**

Según Rúgeles (2017), a nivel mundial los triazoles es aquel grupo de mayor aplicación en protección de cultivos. Su acción tiene un amplio aspecto sobre enfermedades como las Royas, Oídium entre otros. Ejercen su actividad fúngica sobre los diferentes grupos como ascomycetos, deuteromycetos y basidiomicetos.

Continúa manifestando que en cuanto a su mecanismo de acción esos impiden la síntesis de ergosterol. Son de acción sistémica, los triazoles se movilizan a través de las hojas movimiento translaminar y movimiento acropetal mediante la xilema, desde abajo hacia arriba, su mecanismo de acción es preventivo y curativa de tal modo que destruyen el micelio del hongo dentro de la planta.

Finalmente menciona que tienen un efecto sobre los tejidos con el contenido de clorofila alargan su periodo de asimilación lo cual permite mejorar la fotosíntesis. Al analizar las características se les podría dar uso para cualquier enfermedad, pero la diferencia es el tamaño y su peso molecular solubilidad y coeficiente de partición que marcan su modo de acción.

#### **2.2.2.1. PROPICONAZOL**

Según Álvarez (2020), es un fungicida sistémico y residual, de amplio espectro, el cual aplicado al follaje este tiene un efecto protectante y curativo. Producto eficaz en arroz para el control de los hongos Ascomycetos y Basidiomycetos, debido a que la sustancia activa es absorbida rápidamente por vía ascendente, este puede ser aplicado en agua u emulsiones de aceite. Actúa sobre los hongos impidiendo la síntesis y función de las membranas y las paredes celulares.

**Composición:** Propiconazol 250 g/L

**Frecuencia y época de aplicación:** Aplique dentro de un programa de manejo integrado (MIP). Es un fungicida que debe aplicarse cuando aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad.

#### **2.2.2.2. DIFENOCONAZOL (Briones y Tinoco, 2012)**

Difenoconazol perteneciente al grupo de los triazoles, este fungicida es rápidamente absorbido por la planta cumple su función sobre el crecimiento de las hifas sobre todo en los tejidos lastimados, su aplicación para el control de las enfermedades causadas o producidas por Ascomycetos, Basidiomycetos y Deuteromycetes en diferentes cultivos.

**Modo de acción:** Este fungicida inhibe la biosíntesis del ergosterol de las membranas celulares, disminuyendo el desarrollo de los patógenos.

**Persistencia:** Permanente (persistente).

**Usos:** Genera un largo plazo en su actividad preventiva y curativa contra los Ascomycetes, Basidiomycetes, y Deuteromycetes, entre otros como; Alternaria,

Ascochyta, Cercospora, rhizoctonia y varios agentes patógenos que se transmiten por semillas.

### **2.2.3. PROTECTANTES**

#### **2.2.3.1. CLOROTALONIL**

Área de Asuntos Regulatorios (ADAMA, 2018), a continuación, resalta la descripción del fungicida odoón:

**Ingrediente activo:** Clorotalonil

**Formulación:** Suspensión concentrada

**Concentración:** 720 gramos por litro

**Modo de acción:** Fungicida protectante, curativo

Es un fungicida de contacto, debido a que este permanezca en la superficie dificultando la germinación de las esporas del hongo el clorotalonil posee un efecto residual sobre la superficie de la hoja ya que este es estable al fotolisis siempre y cuando este no sea lavado por otras aplicaciones o lluvias.

**Mecanismo de acción:** Implica una combinación con moléculas de glucation dentro de las células del hongo, debido a que estos amarran varias moléculas de glucation y dejan de funcionar a las enzimas dependientes del glucation.

**Riesgo de resistencia:** Bajo

**Frecuencia de Aplicación:** Su aplicación ya sea de una manera preventiva las óptimas condiciones que estos favorezca al desarrollo ya sea al inicio de la enfermedad.

#### **2.2.3.2. SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO (ADAMA, 2019)**

**Modo de acción:** Este fungicida tiene un mecanismo que al momento de ser aplicado de una forma preventiva este controla las esporas impidiendo su germinación al entrar en contacto debido a su actividad fungistática y bacteriostática, suprimiendo el crecimiento del hongo en la superficie de la hoja.

**Mecanismo de acción:** Sus iones de cobre -II (Cu ++) son atraídos por las esporas durante el proceso de germinación este se acumula hasta conseguir una suficiente concentración para poder destruir las paredes celulares de las esporas.

**Época y frecuencia de aplicación:** Es recomendable realizar las aplicaciones entre los 7 y 10 días es decir cuando se presenten los primeros síntomas.

**Fitotoxicidad:** Producto no toxico si realiza de manera correcta los métodos aplicaciones y sus adecuadas dosis.

## **2.2.4. DE SUELO**

### **2.2.4.1. VITAVAX**

Según ADAMA (2016), presenta la descripción de vitavax: Modo de acción: Carboxin es fungicida de acción sistemática producto preventivo y curativo el cual afecta la respiración de los hongos por otro lado el captan, es preventivo de contacto y de amplio espectro el cual inhibe la germinación de las esporas de los patógenos. Mecanismo de acción: Carboxin afecta la respiración de los hongos fitopatógenos y mediante el bloqueo de la enzima deshidrogenasa y el captan afecta a la respiración mitocondrial.

**Toxicidad:** Toxicológico, pero no afecta a la geminación de las semillas ni el desarrollo de los cultivos.

### **2.2.4.2. TERRACLOR (Edifarm, 2016)**

**Acción fitosanitaria:** Este fungicida de síntesis orgánica el cual sirve para la desinfección de suelos y semillas.

**Controla:** Es destacado por su amplia aplicación, por su efectividad sobre las enfermedades del género *Rhizoctonia*, *Sclerotium* spp., varias especies de *Botrytis* entre otras. hasta su acción preventiva acatando las dosis indicadas para su aplicación.

**Modo de acción:** Es un fungicida protectante el cual es recomendado para ciertas enfermedades que de suelos hortalizas y ornamentales, donde para obtener óptimos resultados se debe usar las aplicaciones como se recomiendan.

**Mecanismo de acción:** Es multisitio por lo cual la división celular la inhibe.

**Precauciones:** Durante la preparación y aplicación del producto no se come ni bebe además es un producto irritante para la piel y afecta al sistema respiratorio.

### **2.3. BIOCHAR**

El biocarbón también conocido como biochar es un material sólido, producto de una conversión termoquímica (pirolisis) procedentes de materiales orgánicos el cual tiene propiedades fisicoquímicas ayudando así a capturar carbono, aumentar la presencia microbiana, por ende, mejorar la fertilidad en los suelos, su uso es una alternativa que provee beneficios en el suelo, utilizado cada vez más en la agricultura. Es un producto económico y fácil de conseguir porque se puede obtener a partir de residuos agrícolas, de esta forma se logran disminuir los costos de producción e incrementar la productividad de los cultivos (Velázquez et al., 2019).

Se ha intentado estudiar las características y efectos de biochar procedentes de distintos materiales vegetales sobre las propiedades del suelo y los cultivos. El biochar tiene mucho potencial para mejorar la productividad de los suelos agrícolas su uso debe basarse a sus propiedades específicas de acuerdo al tipo de biocarbon y el efecto producido para incrementar la disponibilidad de nutrientes en el suelo (UTQ, 2019).

#### **2.3.1. PROPIEDADES**

Escalante et al. (2016), confirma que el biochar es considerado como una tecnología para mejorar la fertilidad del suelo ya que captura carbono, proviene de pirolisis de biomasa obtenida por residuos, la aplicación de este producto en el suelo obtiene acontecimientos positivos, mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas en los cultivos, por tener el elemento carbono tiene un efecto de larga duración y atrasa el retorno a la atmosfera como CO<sub>2</sub>, la materia prima es obtenida por desechos orgánicos coadyuvando así al medio ambiente, además los productores del sector



agroforestal pueden dar valor agregado a los residuos orgánicos y obtener un producto de valor comercial, generar así ingresos económicos extra.

Continúa aportando que esta tecnología que ha ingresado de a poco al campo agrícola, merece la aplicación de investigaciones para reconocer el efecto sobre las diferentes especies de plantas, microorganismos disponibles en el suelo, el proceso de pirolisis y el tipo de material utilizado para producir biochar.

### **2.3.2. PRODUCCIÓN**

Esencialmente el proceso para la producción de biochar es la pirolisis que se lleva a cabo con la ausencia de oxígeno, se lo realiza en cámaras de combustión térmica, la temperatura se monitorea con constancia para obtener un buen producto; generalmente existen tres tipos de pirolisis de acuerdo al rango de temperatura se clasifican en: pirolisis lenta, pirolisis media también conocida como convencional y la pirolisis rápida (Trujillo et al., 2020).

La pirolisis es un proceso térmico sin oxígeno que permite descomponer la materia orgánica por medio del calor y que lo transforma en un producto sólido. La pirolisis lenta combustiona la biomasa lento y equitativamente a una temperatura que fluctúa entre 300 a 450°C, obteniendo el 40% de residuo original. La convencional es aquella que se efectúa a medianas temperaturas entre los 550 a 800°C. La pirolisis rápida utiliza altas temperaturas mayores a 800°C, de este proceso se obtiene una porción líquida (60-70%), sólido (15-25%) y gas (10-20%), estos datos varían de acuerdo a la materia prima, temperatura, velocidad (Marín, García y Barrezueta, 2018).

### **2.3.3. COMPOSICIÓN**

El biochar representa altos contenidos de carbono, se caracterizan por seis anillos de carbono, los cuales al estructurarse forman compuestos aromáticos, en algunos casos se obtiene O e H, dependiendo de la materia prima (Oses, 2012); presenta en su composición N, P, K de acuerdo del tipo de biomasa, por ejemplo, en los de origen animal existe mayor presencia de N y P, en los de origen vegetal Mg, Mn, Na, Ca, Cu, Zn, Co, Si, Mo, Ni y metales pesados (Aragao et al., 2017). También compuestos de fenoles y metoxifenoles resultado de la lignina, hemicelulosas y junto

a las cetonas actúan como inhibidores de fitopatógenos a partir del proceso pirolítico (Graber y Elad, 2013).

Se estima que el biocarbón además de aportar propiedades físicas, químicas y biológicas, presentan la capacidad de biocontrol contra patógenos; aunque existe diferentes efectos al ser aplicados en los suelos agrícolas, pero aún no se tiene amplio conocimiento sobre qué actividad favorable o desagradable que puede representar, ni que comunidad microbiana es la favorecida, su estudio no ha sido ampliamente explorado en nuestro país (Abenza, 2012; Quito, 2020).

## **CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO**

### **3.1. UBICACIÓN**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular, Investigación y Vinculación de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL, ubicado en sitio “El Limón” del Cantón Bolívar situado geográficamente entre las coordenadas 00°49’23’’ Latitud Sur, 80°11’01’’ Longitud Oeste a 15 msnm<sup>1</sup>.

### **3.2. DURACIÓN DEL TRABAJO**

El presente trabajo de titulación tuvo una duración de seis meses desde septiembre/2020 a febrero/2021.

### **3.3. FASE I DE LA INVESTIGACIÓN**

Evaluación de grupos fungicidas sobre *Sclerotium rolfsii*

#### **3.3.1. FACTOR EN ESTUDIO**

A. Grupos de fungicidas

#### **3.3.2. NIVELES Y TRAMIENTOS**

**A1. Benzimidazoles (Benomyl, Carbendazim)**

**A2. Triazoles (Propiconazol, Difenconazol)**

**A3. Protectantes (Clorotalonil, Sulfato de cobre pentahidratado)**

**A4. De suelo (Carboxim-thiram, Pentacloronitrobenceno)**

**A5. Testigo**

#### **3.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

##### **3.3.3.1. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) monofactorial con 9 tratamientos incluyendo el testigo, 5 réplicas y 45 unidades experimentales.

---

<sup>1</sup> Estación meteorológica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabi “Manuel Felix López”.

Tabla 3. 1. Análisis de varianza

<b>ADEVA</b>		
<b>Fuentes de variación</b>		<b>Grados de libertad</b>
Repetición	r-1	4
Tratamientos	t-1	8
Error experimental	t(r-1)	32
Total	rt-1	44

### 3.3.4. UNIDAD EXPERIMENTAL

Cada unidad experimental estuvo constituida de una caja Petri de (90mm Ø) con medio de cultivo Agar PDA (Papa Dextrosa Agar) para todos los ensayos.

### 3.3.5. VARIABLES RESPUESTAS

#### 3.3.5.1. CRECIMIENTO RADIAL

El comportamiento *in vitro* del hongo *S. rolfsii* se lo evaluó por medio del crecimiento radial del micelio cada 24 horas durante 9 días, se utilizó cajas de Petri con medio PDA en conjunto con los tratamientos establecidos, este se evaluó de la siguiente manera:

Longitud horizontal y vertical del micelio de *S. rolfsii*, esta se midió en dirección a la longitud de la caja Petri, se determinó el crecimiento radial a través del promedio de crecimiento horizontal y vertical (diámetro). Para su medición se utilizó un calibrador digital, los datos numéricos fueron expresados en cm utilizando un solo decimal. A partir de estos se determinó el porcentaje de crecimiento e inhibición micelar.

#### 3.3.5.2. PORCENTAJE DE CRECIMIENTO

Esta variable se la evaluó sólo en la fase III, donde estableció el porcentaje de crecimiento con relación al testigo absoluto (sin aplicación) utilizando la siguiente fórmula propuesta por (Riveros, Sotomayor, Rivera, Secor y Espinoza, 2003):

Fórmula 1. Porcentaje de crecimiento

$$PC = \frac{DMCM-0,5\text{ cm}}{DMCAx} * 100$$

Donde:

**PC=** Porcentaje de crecimiento

**DMCM=** Diámetro medio de la colonia creciendo en tratamiento

**0,5 cm=** Corresponde a el diámetro del disco con micelio

**DMCA=** Diámetro medio de la colonia sin enmendar

### **3.3.5.3. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN**

Se lo evaluó en la fase I, II, IV las cuales se usaron como tratamientos fungicidas.

Una vez obtenido el crecimiento, se calculó los valores medios de Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) con la siguiente fórmula (Ezziyani, Sánchez, Requena, Rubio y Castillo, 2004):

Fórmula 2. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial

$$PICR = \frac{R1-R2}{R1} * 100$$

Donde:

**R1=** Diámetro del testigo

**R2=** Diámetro del tratamiento

### **3.3.5.4. NÚMERO DE ESCLEROCIOS**

El número de esclerocios se evaluó a los 40 días después de la inoculación excepto la fase III que fue a los 30 días, una vez emitidos los esclerocios, se contabilizaron con la ayuda de una pinza metálica en su respectiva unidad experimental.

### **3.3.5.5. VIABILIDAD DE ESCLEROCIOS**

A los 40 días después de la confrontación, se los aisló en 10ml de medio de cultivo PDA en cada caja Petri, antes de la dispensación del medio se añadió antibiótico (ampicilina) para evitar una contaminación de agentes externos y se dejó reposar 5 minutos. La siembra de los esclerocios obtuvo 4 réplicas por cada tratamiento y se la realizó en la cámara de flujo laminar (modelo CS8 120 serie 330602), posteriormente se ubicaron 10 esclerotes por caja excepto la fase IV que se colocó 5/caja, estas se sellaron con plástico adherente, una vez realizada la siembra se

ubicaron sobre una mesa de trabajo a temperatura de  $26\pm 30^{\circ}\text{C}$ . A las 24 horas después de la siembra se evaluó el porcentaje de germinación de los esclerotes. Es importante mencionar que en la fase III esta variable se evaluó a los 30 días después de la inoculación.

### **3.3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza al 5% de probabilidades de error y la separación de medias con la prueba de Tukey al 5% de probabilidades de error. Para el análisis de datos se utilizó el software Infostat.

### **3.3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

#### **3.3.7.1. OBTENCIÓN DE AISLADOS**

Las muestras de partes vegetales de frejol infestadas que presentaban esclerocios y micelio de *S. rolfsii* se cortaron con un cuchillo estéril (alcohol 70%) y fueron colocadas dentro de un recipiente para su respectivo traslado al laboratorio, se adicionó agua en cantidad suficiente con la finalidad de limpiar y separar de cualquier residuo no deseado, estos fueron colocados seguidamente en cámaras húmedas improvisadas realizadas con una funda (10cm x 16cm) y papel toalla humedecido en su interior se adicionó agua destilada para que formen esclerocios, una vez formados fueron extraídos y colocados en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, una vez realizada la desinfección se los conservó en tubos eppendorf de 2ml; también se los colocó en cajas Petri (90mm Ø) con medio PDA, con el pasar de los días se fue purificando los aislados, para posteriormente utilizarlos en los ensayos (Loor, 2017).

#### **3.3.7.2. REFRESCADO DE CEPAS**

De los aislados obtenidos, con ayuda de un sorbete (5mm Ø) previamente esterilizado se realizaron varios discos que contenían micelio, extraídos de la caja Petri con la ayuda de aguja hipodérmica descartable para ser inoculados. Se dispensó 10ml de medio de cultivo PDA con una concentración de 39 gramos por litro de agua según sugerencia del fabricante, previamente autoclavado ( $120^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ ); en cada caja Petri, cabe mencionar que antes de la dispensación

del medio, se añadió antibiótico (ampicilina) para evitar una contaminación de bacterias, se agitó y dejó reposar durante 5 minutos, de esta forma se colocó el disco obtenido de los aislados en la parte central de la caja Petri con su respectivo medio, una vez ubicado esta se envolvió con plástico adhesivo y se almacenó a temperatura de  $27\pm 30^{\circ}\text{C}$ . Las cepas se refrescaron de la misma forma para todos los ensayos.

### **3.3.7.3. TEST *IN VITRO* CON FUNGICIDAS**

Se efectuaron varios discos con un sorbete (5mm  $\varnothing$ ) de las cepas refrescadas, el inóculo fue tomado a partir de colonias de 120 horas de edad; este procedimiento y el tiempo de refrescado se efectuó en todos los ensayos posteriores.

La dosis considerada para todos los fungicidas fue la misma 2000mg por litro de agua (2000ppm) de Producto Comercial (P.C). Se utilizó fungicidas sólidos y líquidos; los sólidos se pesaron con la ayuda de la balanza digital (U.S. Solid USS-DBS2-50), la dosis respectiva fue  $0,2\text{g } 100\text{ml}^{-1}$  y los líquidos se los dispensaron con una micropipeta (Nichipet K10430731) graduada de 200 $\mu\text{l}$ , la dosis respectiva fue  $0,2\text{ml } 100\text{ml}^{-1}$ , esta dosis se adicionó a el PDA después de autoclavar, una vez aplicados los fungicidas se agitaron y dispensaron 20ml en cada caja de Petri, luego se adicionó los discos de las colonias de *S. rolfsii* en el centro de la caja, embaladas y rotuladas, se almacenaron a temperatura de  $27\pm 30^{\circ}\text{C}$ .

El procedimiento se realizó en el interior de la cámara de flujo laminar, todos los materiales a ser utilizados fueron previamente esterilizados. En todos los ensayos, se tomó como tratamiento de efectividad *in vitro*, aquellos tratamientos que no presentaron crecimiento micelial del patógeno.

## **3.4. FASE II DE LA INVESTIGACIÓN**

Evaluación de fungicidas benzimidazoles y dosis sobre *Sclerotium rolfsii*.

### **3.4.1. FACTORES EN ESTUDIO**

- A. Fungicidas benzimidazoles
- B. Dosis

### 3.4.2. NIVELES Y TRATAMIENTOS

#### Factor A (Fungicidas benzimidazoles)

- Benomyl
- Tiabendazol
- Carbendazim
- Metil tiofanato

#### Factor B (Dosis)

- 1ppm
- 10ppm
- 100ppm
- 1000ppm

#### Testigo

- Absoluto. 0 mg/L<sup>-1</sup>

### 3.4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.4.3.1. ESQUEMA DE ANÁLISI DE VARIANZA

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo combinatorio de A x B para la variable porcentaje de inhibición, con 17 tratamientos, 4 réplicas y un total de 68 unidades experimentales.

Tabla 3. 2. Análisis de varianza de benzimidazoles y dosis

<b>ADEVA</b>		
<b>Fuentes de variación</b>		<b>Grados de libertad</b>
Repetición	r-1	3
Tratamientos	t-1	16
Fungicidas (A)	(A-1)	3
Dosis (B)	(B-1)	3
AXB	(A-1)(B-1)	9
Error experimental	t(r-1)	48
Total	rt-1	67

Para el número de esclerocios se utilizó diseño DCA de A x B+1, para la variable porcentaje de viabilidad se efectuó una comparación no estadística de la



germinación *in vitro* de aquellos esclerocios (esto se efectuó en todas las fases de la investigación).

### **3.4.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

#### **3.4.4.1. TEST *IN VITRO* BENZIMIDAZOLES DOSIS**

Se manejó las siguientes dosis de P.C (0,001g L<sup>-1</sup>, 0,01g L<sup>-1</sup>, 0,1g L<sup>-1</sup> y 1g L<sup>-1</sup>) (benomyl) y (0,001ml L<sup>-1</sup>, 0,01ml L<sup>-1</sup>, 0,1ml L<sup>-1</sup> y 1ml L<sup>-1</sup>); (carbendazim, thiabendazol, y metil tiofanato) (Anexo. 13). A estas dosis se adicionaron a el PDA post autoclavado, una vez aplicados los fungicidas se agitaron y descargó 25ml en cada caja de Petri, luego se añadió los discos de las colonias del fitopatógeno en el centro de la caja, finalmente se las embaló, rotuló y almacenó a temperatura de 26±30°C.

### **3.5. FASE III DE LA INVESTIGACIÓN**

Evaluación de biochar y dosis sobre *Sclerotium rolfsii*

#### **3.5.1. FACTORES EN ESTUDIO**

A. Biochar

B. Dosis

#### **3.5.2. NIVELES Y TRATAMENTOS**

##### **Factor A (Biochar)**

- Algarrobo
- Arroz
- Cacao

##### **Factor B (Dosis)**

- 1 g 100ml<sup>-1</sup> PDA
- 3g 100ml<sup>-1</sup> PDA
- 5g 100ml<sup>-1</sup> PDA

##### **Testigo**

- Absoluto. 0 ml L<sup>-1</sup>

### 3.5.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.5.3.1. ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial de A x B con 10 tratamientos, 5 réplicas y un total de 50 unidades experimentales:

Tabla 3. 3. Análisis de varianza dosis de biochar

ADEVA		
Fuentes de variación		Grados de libertad
Repetición	r-1	4
Tratamientos	t-1	9
Biochar (A)	(A-1)	2
Dosis (B)	(B-1)	2
AXB	(A-1)(B-1)	4
Error experimental	t(r-1)	36
Total	rt-1	49

### 3.5.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO

#### 3.5.4.1. TEST *IN VITRO* BIOCHAR

Las dosis adicionadas fueron (1, 3 y 5 g 100ml<sup>-1</sup> PDA) para todos los tipos de biochar. Al ser sólido se pesó en la balanza digital, estas dosis se adicionaron a el PDA, se agitaron y autoclavaron, luego se dispensó 20 ml en cada caja de Petri, posteriormente se aplicó los discos de las colonias del hongo en el centro de la caja, finalmente se embaló, rotuló en la parte superior de la caja con sus respectivos códigos y se almacenó.

### 3.6. FASE IV DE LA INVESTIGACIÓN

Evaluación combinada de biochar y fungicidas sobre *Sclerotium rolfsii*.

#### 3.6.1. FACTORES EN ESTUDIO

A. Biochar

B. Fungicidas

#### 3.6.2. NIVELES Y TRATAMIENTOS

Factor A (Biochar)

- Algarrobo
- Arroz
- Cacao

### Factor B (Fungicidas)

- Benomyl
- Difenoconazol

### Testigo

- Absoluto. 0 aplicación litro

## 3.6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.6.3.1. ESQUEMA ANÁLISIS DE VARIANZA

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) en arreglo factorial A x B con 7 tratamientos, 5 repeticiones y 35 unidades experimentales.

Tabla 3. 4. Análisis de varianza de combinación biochar y fungicidas

ADEVA		
Fuentes de variación		Grados de libertad
Repetición	r-1	4
Tratamientos	t-1	6
Biochar (A)	(A-1)	2
Fungicidas (B)	(B-1)	1
AXB	(A-1)(B-1)	2
Error experimental	t(r-1)	24
Total	rt-1	34

## 3.6.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO

### 3.6.4.1. REFRESCADO DE CEPAS

Se realizó el mismo procedimiento detallado en el punto 3.3.7.2.

### 3.6.4.2. TEST BIOCHAR Y FUNGICIDAS

La dosis para biochar adicionado fué 3 g 100ml<sup>-1</sup> PDA para todos los tipos de biochar y la dosis para los fungicidas 2000mg L<sup>-1</sup> (2000ppm). El biochar y los fungicidas sólidos se pesaron en una balanza digital, una vez aplicadas las dosis de biochar se agitaron y autoclavaron, luego se adicionó los fungicidas en el agar compuesto

de biochar, se dispensó 20ml en cada caja de Petri, posteriormente se ubicó los discos de las colonias de *S. rolfsii* refrescadas en el centro de la caja, embaladas y previamente rotuladas en la parte superior, se almacenaron a temperatura de  $27\pm 30^{\circ}\text{C}$ .

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. SENSIBILIDAD *IN VITRO* A FUNGICIDAS COMERCIALES, DE *Sclerotium rolfsii*

El análisis de varianza demostró la existencia de diferencias estadísticas ( $p=0,0001$ ) entre los grupos de fungicidas estudiados para las variables porcentaje de inhibición y número de esclerocios, siendo que los fungicidas pertenecientes a los grupos triazoles (propiconazol, difenoconazol), de suelo (carboxim-thiram, pentacloronitrobenceno) y protectantes (sulfato de cobre pentahidratado) consiguieron impedir el crecimiento micelial totalmente (100%) hasta las 216 horas posteriores a la colocación del disco micelial; lo anterior origina, la capacidad eficiente que muestran estos fungicidas como posibles opciones de tratamiento para el control de la enfermedad.

En contraste con lo anterior se encuentran los fungicidas benzimidazoles (benomyl y carbendazim) que sólo redujeron el crecimiento del hongo desde las primeras 24 horas hasta las 120 horas, en las evaluaciones siguientes (144, 168 y 216 horas), el efecto provocado por estos fitosanitarios no inhibió el crecimiento del fitopatógeno, situación similar ocurre con clorotalonil, que inhibe de forma eficaz las primeras horas de estudio, pero sin embargo disminuye en conformidad con el pasar de los días, a partir de la hora 72 con (73,60%), 96 (61,60%), 120 (42,60%), 144 (13,80%), a la hora 168 y 216 es estadísticamente igual a benomyl y carbendazim (tabla. 4.1).

De los tratamientos que permitieron crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii*, el benomyl no permitió la formación de esclerocios; sin embargo, carbendazim y clorotalonil con medias de (16, 13) reportaron menor producción de esclerocios en relación al testigo que presentó 22 esclerocios, (tabla. 4.2). De la misma manera, estos dos tratamientos presentaron semejante índice de germinación; la viabilidad de los esclerocios 24 horas después de ser inoculados en el medio de cultivo fue del 100%.

**Tabla 4. 1.** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) *in vitro* en medio PDA con fungicidas sobre *Sclerotium rolfsii*

Inhibición en comparación al testigo (%) a diferentes periodos de incubación (h)									
G	T	24	48	72	96	120	144	168	216
1	Benomyl	40,80b	37,40b	22,60c	1d	0c	0c	0c	0c
	Carbendazim	20,60c	18c	17,20c	16,40c	1,40c	0c	0c	0c
2	Propiconazol	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
	Difenoconazol	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
3	Clorotalonil	100a	100a	73,60b	61,60b	42,60b	13,80b	5c	0c
	Sulfato de Cu penta-hidrat	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
4	Carboxim-thiram	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
	Pentacloronitrobenceno	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a

G=Grupos, T=Tratamientos, %=Inhibición, h=hora. Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ )

**Tabla 4. 2.** Resultado comparación de medias para el número de esclerocios y viabilidad

Producción de esclerocios (N°) Porcentaje de viabilidad (%)			
G	T	Número de esclerocios (N°)	Porcentaje de viabilidad(%)
1	Benomyl	0a	0%
	Carbendazim	16b	100%
2	Propiconazol	0a	0%
	Difenoconazol	0a	0%
3	Clorotalonil	13b	100%
	Sulfato de Cu penta-hidrat	0a	0%
4	Carboxim-thiram	0a	0%
	Pentacloronitrobenceno	0a	0%
5	Testigo	22b	100%

G=Grupos, T=Tratamiento. Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ ).

Los triazoles (difenoconazol y propiconazol), demostraron efectividad probablemente a su mecanismo de acción de inhibir la síntesis de ergosterol, el cual comprende lípidos principales que favorecen la acción de quitina sintetasa, encargada del crecimiento y división celular fúngica, los azoles son antimicóticos con un excelente efecto como tratamiento de hongos (Nocua et al., 2020), lo que concuerda con Torres et al. (2018), quienes detallan la sensibilidad de hongos basidiomicetos frente al fungicida propiconazol. Así mismo Castellanos et al. (2011), mostraron el 100% de inhibición sobre *Beauveria bassiana* al utilizar difenoconazol en condiciones *in vitro*. Del mismo modo que el presente ensayo Shahzaman

(2020), determinó que los fungicidas propiconazol y vitavax inhiben totalmente el crecimiento de *S. rolfsii* a concentraciones de 100, 250 y 500ppm en cultivares de garbanzo.

Torres et al. (2018), menciona a sulfato de cobre penta-hidratado como el mejor fungicida para el tratamiento de *Moniliophthora perniciosa*, revela la efectividad del fungicida protectante sobre el crecimiento de hongo. Este actúa como un interruptor celular provocando daños al romper la pared celular del patógeno (Alburqueque y Gusqui, 2018).

Los otros fungicidas que inhibieron el crecimiento del fitopatógeno en comparación al testigo fueron los del grupo denominado de suelo (carboxim-thiram y pentacloronitrobenzeno); esto revela cierta relación con los resultados obtenidos por Rondón et al. (1995), que al utilizar carboxim-thiram y pentacloronitrobenzeno impide el desarrollo de *Sclerotium rolfsii*, parcialmente logra un ligero crecimiento debido a que la dosis (1-10ppm) fue inferior a la empleada en el ensayo (2000ppm).

El clorotalonil presentó un control parcial en la eficacia sobre *Sclerotium rolfsii*, los resultados hallados son equivalentes a los reportado por Alburqueque y Gusqui (2018), dado que con el fungicida clorotalonil, no lograron controlar el crecimiento de hongos *in vitro* a los 5 días posteriores a la inoculación con cifras inferiores al 100% y superior al 50% sobre *Penicillium spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Botrytis cinerea*; el mismo autor concluye que carbendazim presenta el mejor control (100%) de inhibición en el crecimiento micelial sobre los hongos antes mencionados, lo que difiere con los datos obtenidos en la investigación en comparación al testigo que obtuvo datos menores al 40%.

Por otra parte, el fungicida benomyl representa el menor potencial inhibitorio sobre *Sclerotium rolfsii*, lo que coincide con Folgueras et al. (2010), donde se utilizó varios fungicidas incluido benomyl contra *Sclerotium rolfsii* causante de la pudrición radical en yuca (*Manihot esculenta* Crantz), se demostró poco efecto del fungicidas a concentraciones de 300, 1800 y 3500ppm; resultados totalmente diferentes a los de

Guillén et al. (2017), donde el crecimiento *in vitro* sobre *Colletotrichum acutatum* fue inhibido totalmente por benomyl y difenoconazol.

El análisis de varianza aplicado a la variable porcentaje de inhibición, a las 24, 48, 72 y 96 horas mostró que existe diferencias estadísticas significativas ( $p=0,0001$ ) para los tratamientos evaluados tanto para el factor A: fungicidas benzimidazoles (Benomyl, carbendazin, metil-tiofanato y thiabendazol); como factor B: dosis (1000,100,10, y 1ppm); y para su interacción (tabla. 4.3.). Es decir que, al menos uno de los benzimidazoles tuvo un porcentaje de inhibición diferente y que sus dosis propiciaron al menos una diferencia en la inhibición de *S. rolfsii* durante las horas mencionadas.

Mientras tanto a partir de las 120 horas los fungicidas, dosis y su interacción evaluados son estadísticamente iguales para la variable porcentaje de inhibición. Lo anterior explica que los productos químicos empleados no ejercieron un efecto de control sobre el crecimiento y producción de *S. rolfsii*, (fig. 4.1).

En lo que respecta a el número de esclerocios producidos durante los 40 días después de la inoculación no presentan diferencias significativas (tabla.4.3); es decir los tratamientos evaluados son estadísticamente iguales en el desarrollo del patógeno (fig. 4.2). Además, se probó que todos los tratamientos presentan esclerocios viables (100%), (fig. 4.3).

**Tabla 4. 3.** Significancia del Análisis de varianza de la variable PCR y número de esclerocios producidos, a partir de aislados *S. rolfsii* tratados con fungicidas benzimidazoles a diferentes dosis bajo condiciones *in vitro*.

Variables	Fungicidas benzimidazoles (A)	Dosis (B)	Interacción(A*B)
% Inhibición 24h	**	**	**
" 48h	**	**	**
" 72h	**	**	**
" 96h	*	*	**
" 120h	NS	NS	NS
Número de esclerocios producidos por tratamientos (40d)	NS	NS	NS

NS=No hay significancia (probabilidad $>0,05$ ); \*=Significancia (probabilidad $<0,05$ ); \*\*=Alta significancia (probabilidad $<0,01$ ).



La acción anti fúngica se evidenció hasta la hora 96 en el desarrollo del experimento. De acuerdo a la separación de medias Tukey al 5% probabilidad de error, se afirmó diferentes categorías, en las que benomyl predomina como (A), (tabla. 4.4); este resultó ser el más eficaz, presentó una reducción del 62,75% en el crecimiento micelial promedio de *S. rolfsii* cuando se utiliza la concentración 1000ppm. Al mismo tiempo este produjo la menor cantidad promedio de esclerocios (n=4); estos resultados son equivalentes a los De Marcano et al. (2005), donde el número de esclerocios formados se disminuyó en los tratamientos que se utilizó 2500ppm de benomyl *in vitro*.

Soto et al. (2011), reportan que benomyl es un fungicida sistémico ampliamente utilizado en la agricultura, su acción es interferir en la síntesis de ADN y la mitosis impidiendo así la penetración del micelio y la germinación de esporas. La descripción expuesta demuestra la evidente resistencia de *S. rolfsii* a benomyl que a pesar de haber inhibido hasta un 62,75% durante las primeras 24 horas; su efectividad disminuyó al pasar los días de evaluación, datos que coinciden con los publicados por Manzo et al. (2012), que al utilizar el fungicida benomyl en *Mycosphaerella fijiensis* presenta la capacidad de crecer a una dosis de 10ppm. Resultados opuestos describen Pérez et al. (2015) y Tenesaca (2010), donde reportan que *Sclerotium cepivorum* ejerce sensibilidad a benomyl; y describe a benomyl y metil tiofanato como productos controladores de primer nivel a *Sclerotinia sclerotiorum* con dosis inferiores a 1ppm.

**Tabla 4. 4.** Prueba de comparación de medias Tukey 5% de error, en la actividad inhibitoria de benzimidazoles sobre *S. rolfsii* a diferentes concentraciones.

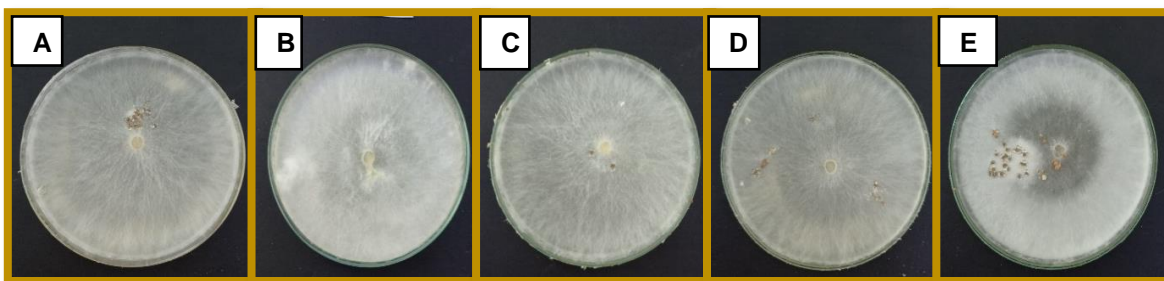
Fungicida+Dosis	Porcentaje de inhibición (%)	p-valor	Fungicida+Dosis	Porcentaje de inhibición (%)	p-valor
<b>24 horas</b>		0,0001	<b>48 horas</b>		0,0001
Benomyl/1000ppm	62,75A		Benomyl/1000ppm	48,25A	
Thiabendazol/1000ppm	40,00 B		Thiabendazol/1000ppm	31,00 B	
Benomyl/100ppm	31,50 BC		Benomyl/100ppm	25,25 BC	
Metil tiofanat/1000ppm	30,25 BC		Metil tiofanato/1000ppm	19,00 CD	
Tiabendazol/100ppm	27,50 BCD		Thiabendazol/100ppm	18,25 CD	
Tiabendazol/10ppm	27,25 BCD		Metil tiofanato/100ppm	17,75 CDE	
Tiabendazol/1ppm	24,50 CDE		Carbendazin/1000ppm	14,50 DEF	
Carbendazin/1000ppm	20,00 CDEF		Thiabendazol/10	14,50 DEF	
Benomyl/10ppm	18,00 CDEF		Carbendazin/100ppm	14,25 DEF	
Carbendazin/100ppm	15,75 DEF		Benomyl/10ppm	13,00 DEFG	
Benomyl/1ppm	14,50 DEF		Thiabendazol/1ppm	11,75 DEFG	
Carbendazin/10ppm	14,00 DEF		Carbendazin/10ppm	10,50 DEFG	
Carbendazin/1ppm	13,50 EF		Carbendazin/1ppm	9,50 EFG	
Metil tiofanato/100ppm	12,00 EF		Benomyl/1ppm	7,50 FG	
Metil tiofanato/10ppm	11,50 EF		Metil tiofanato/10ppm	7,00 FG	
Metil tiofanato/1ppm	9,25 F	Metil tiofanato/1ppm	4,75 G		
<b>72 horas</b>		1,0001	<b>96 horas</b>		1,0001
Benomyl/1000ppm	39,00A		Benomyl/1000ppm	5,25A	
Thiabendazol/1000ppm	24,50 B		Thiabendazol/1ppm	0,00 B	
Carbendazin/1000ppm	17,50 C		Carbendazin/1000ppm	0,00 B	
Benomyl/100ppm	16,75 C		Benomyl/100ppm	0,00 B	
Thiabendazol/100ppm	13,00 CD		Carbendazin/100ppm	0,00 B	
Thiabendazol/10ppm	12,25 CD		Metil tiofanato/100ppm	0,00 B	
Carbendazin/100ppm	9,00 DE		Metil tiofanato/1ppm	0,00 B	
Thiabendazol/1ppm	7,75 DE		Metil tiofanato/10ppm	0,00 B	
Benomyl/1ppm	7,25 DE		Thiabendazol/10ppm	0,00 B	
Benomyl/10ppm	7,25 DE		Benomyl/10ppm	0,00 B	
Carbendazin/10ppm	7,25 DE		Carbendazin/10ppm	0,00 B	
Metil tiofanat/1000ppm	7,00 DE		Metil tiofanato/1000ppm	0,00 B	
Metil tiofanato/100ppm	5,75 E		Thiabendazol/1000ppm	0,00 B	
Metil tiofanato/10ppm	5,00 E		Benomyl/1000ppm	0,00 B	
Metil tiofanato/1ppm	4,75 E		Thiabendazol/100ppm	0,00 B	
Carbendazin/1ppm	3,50 E	Carbendazin/1ppm	0,00 B		

Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ ).

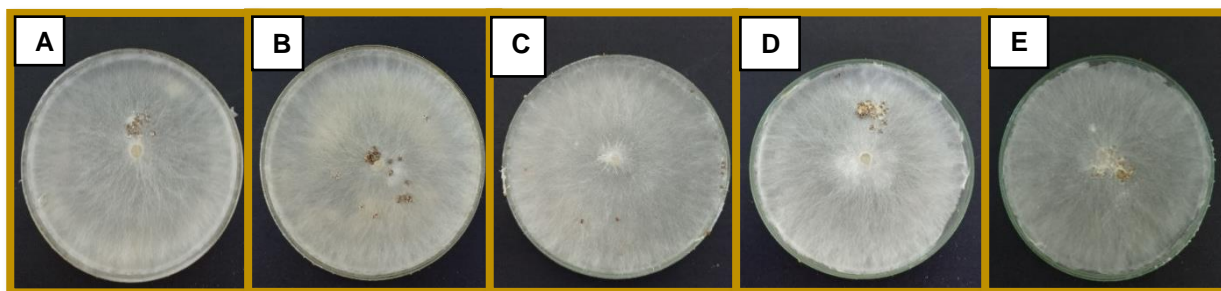
Thiabendazol fue el siguiente más efectivo (40%) de inhibición; además su eficiencia es diferente de benomyl, a 1000ppm. El fitopatógeno no es sensible a thiabendazol, únicamente atrasa el crecimiento micelial y disminuye la producción de esclerotes (Pérez et al., 2009). Datos opuestos encontró Romero (2015), donde este fungicida presenta acción inhibitoria sobre *Sclerotinia sclerotiorum* en concentraciones inferiores a 1 ppm en condiciones controladas.

De manera similar los fungicidas metil tiofanato y carbendazim dieron como resultado una reducción menor al 32% (tabla. 4.4) sobre el crecimiento del fitopatógeno, cuando se usa concentraciones de 1000, 100, 10 y 1ppm; desde las 24 horas hasta las 72 horas, en las evaluaciones posteriores (144, 168 y 216 horas) los tratamientos no impidieron el crecimiento del patógeno. Estos resultados coinciden a los reportados por Arce et al. (2019) quienes determinaron pruebas de sensibilidad a fungicidas benomyl, carbendazim y metil tiofanato sobre *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp. y *Mycoleptodiscus* sp., aquellos no inhibieron totalmente en el crecimiento de las cepas evaluadas durante el ensayo; unas con 0% y otras de ellas con porcentajes inferiores a 53%. De la misma manera acuerdan con los de Gea et al. (2012), donde *Moniliophthora perniciosa* tuvo factor de resistencia relativamente bajos para metil tiofanato, sin embargo, ellos mostraron a carbendazim como el segundo mejor fungicida en la fase inhibitoria.

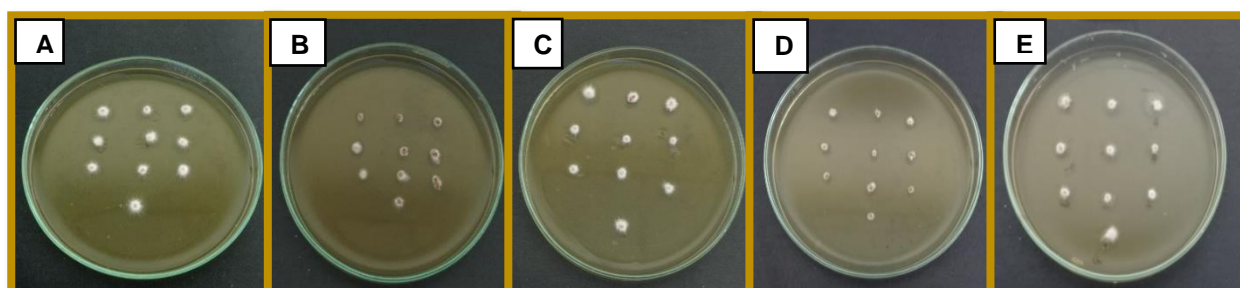
Los anti fúngicos empleados ejercieron efecto parcial de inhibición a las primeras 96 horas, luego de esto ningún benzimidazol (benomyl, carbendazin, metil tiofanato y thiabendazol) impidió en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* durante el ensayo en medio de cultivo PDA envenenado. Según FRAC (2019), a pesar de que los benzimidazoles metil carbamatos (BMC) específicamente interfiere en el ensamblaje de b-tubulina en el proceso de la mitosis, este grupo presenta riesgos elevados de forjar resistencia por varias especies de patógenos incluso dentro de la misma, el control de la resistencia está establecido por el riesgo específico del fungicida, hongo y cultivo. McGrath (2004), afirma que al utilizar fungicidas con alteraciones en dosis y consecutivas aplicaciones el patógeno desarrolla resistencia.



**Figura 4. 1.**Sensibilidad *in vitro* de fungicidas del grupo químico benzimidazoles sobre *Sclerotium rolfsii*; crecimiento de *S. rolfsii* a las 216 horas después de la inoculación: (A) Testigo R4; (B) Benomyl 1000ppm R1; (C) Metil tiofanato 100ppm R3; (D) Carbendazim 100ppm R1; (E) Thiabendazol 1000ppm R2.



**Figura 4. 2.** Desarrollo a los 40 días después de la inoculación. (A) Testigo R3; (B) Benomyl 100ppm R1; (C) Metil tiofanato 1000ppm R4; (D) Carbendazim 1ppm.R4; (E) Thiabendazol 1 ppm R2.



**Figura 4. 3.** Viabilidad de esclerocios producidos en sensibilidad de benzimidazoles con medio PDA evaluado las 24 horas después de la inoculación. (A) Testigo R2; (B) Benomyl 1ppm R1; (C) Metil tiofanato 1ppm R3;(D) Carbendazim 10ppm R3; (E) Thiabendazol 10ppm R1.

#### **4.2. EFECTO *IN VITRO* BIOCHAR Y DOSIS SOBRE *Sclerotium rolfsii***

Los resultados obtenidos muestran que el análisis de varianza entre el tipo de biochar (algarrobo, arroz, cacao), dosis (1,3 y 5g 100ml<sup>-1</sup>) y su interacción influyeron significativamente ( $p=0,0001$ ) en el crecimiento micelial sobre *S. rolfsii* a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la aplicación del disco. Lo que significa que los tratamientos evaluados propiciaron diferentes porcentajes de crecimientos sobre el hongo, y que al menos algún tipo de biochar u dosis propiciaron un crecimiento diferente. Sin embargo, para el factor B (dosis) no hubo diferencias estadísticas ( $p=0,9333$ ) a las 48 horas (tabla. 4.5). En relación a esto, todos los tratamientos evaluados alcanzaron un crecimiento radial total (100%) a las horas posteriores (144, 168, 192 y 216).

Así mismo, el factor (A) y su interacción (AXB) no presentaron diferencias estadísticas ( $p=0,0508$ ) ( $p=0,6772$ ), en el número de esclerocios producidos a los 30 días después de la inoculación; mientras tanto las dosis (B) si influyeron en el

desarrollo del fitopatógeno; esto significa que al menos una de las dosis de biochar influyó en la producción de esclerocios con un promedio diferente. La separación de medias (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ ) separó los tratamientos en dos categorías a las medias de la variable número de esclerocios; por lo tanto, el biochar de algarrobo a 3g presento a la clase (A), con la mayor producción de esclerocios ( $n=55,40$ ); no obstante, los tratamientos de algarrobo, arroz y cacao a concentración de 1g alcanzaron la menor creación de esclerocios en relación al testigo (49) (fig. 4.4); estos presentaron viabilidad del 100% (tabla. 4.7) a las 24 horas de haberlos aplicados en medio PDA, (fig. 4.5)

**Tabla 4. 5.** Significancia de Análisis de varianza (ADEVA), del efecto *in vitro* de biochar y diferentes dosis en el porcentaje de crecimiento micelial y número de esclerocios producidos sobre *S. rolfsii*.

Variables	Biochar (A)	Dosis (B)	Interacción(A*B)
% Crecimiento 24h	**	**	**
" 48h	**	NS	**
" 72h	**	*	**
" 96h	**	**	**
" 120h	**	**	**
" 144h	NS	NS	NS
" 168h	NS	NS	NS
" 192h	NS	NS	NS
" 216h	NS	NS	NS
Número de esclerocios producidos 30 días después de la inoculación	NS	*	NS

NS=No hay significancia (probabilidad $>0,05$ ); \*=Significancia (probabilidad $<0,05$ ); \*\*=Alta significancia (probabilidad $<0,01$ ).

Estos resultados demuestran la efectividad que presenta el biochar sobre el crecimiento y desarrollo de *S. rolfsii*; definiéndose así una alternativa poco fiable para el control del fitopatógeno; ya que al utilizarlos no impide el crecimiento micelial del hongo, sino que por lo contrario estimula su desarrollo. Estos se difieren a los expuesto por González et al. (2020), donde señalan que el biochar presenta una acción directa de inhibición sobre las plagas, además favorece las relaciones entre los microorganismos benéficos y plantas; así mismo menciona Graber y Elad (2013), que el biochar tiene la capacidad de limitar a la planta a compuestos que interfieren en su proceso fisiológico como las enzimas secretadas por fitopatógenos

Spokas et al. (2011), aseguran que en el proceso de pirolisis se produce benceno y etileno, sustancias que atribuyen a el biochar propiedades de inhibición microbianas. Mientras que Rogovska et al. (2016), estiman la capacidad significativa que presenta el biochar para disminuir afectaciones de patógenos como la pudrición en la raíz en soya (*Glycine max*) provocada por *Fusarium virguliforme*.

**Tabla 4. 6.** Comparación estadística de medias Tukey ( $p > 0,5$ ) de error, aplicada a la variable porcentaje de crecimiento utilizando biochar sobre *S. rolfsii* a diferentes concentraciones bajo condiciones *in vitro*.

Biochar+Dosis(g 100ml <sup>-1</sup> )	Porcentaje de crecimiento (%)	p-valor	Biochar+Dosis(g 100ml <sup>-1</sup> )	Porcentaje de crecimiento (%)	p-valor
<b>24 horas</b>		0,0001	<b>48 horas</b>		0,0001
Algarrobo/5	73,20A		Algarrobo/5	87,80A	
Algarrobo/3	68,20A		Algarrobo/3	83,80A	
Algarrobo/1	67,80A		Algarrobo/1	83,00AB	
Arroz/5	64,80A		Arroz/5	80,00ABC	
Arroz/3	33,60 B		Arroz/3	69,20 BC	
Arroz/1	21,00 BC		Arroz/1	67,20 C	
Cacao/1	17,80 BC		Cacao/1	37,80 D	
Cacao/3	14,20 C		Cacao/3	36,80 D	
Cacao/5	5,00 C	Cacao/5	19,20 E		
<b>72 horas</b>		0,0001	<b>96 horas</b>		0,0001
Algarrobo/5	93,20A		Algarrobo/5	94,00A	
Algarrobo/3	92,00A		Algarrobo/3	94,00A	
Algarrobo/1	92,00A		Algarrobo/1	94,00A	
Arroz/5	91,40A		Arroz/5	94,00A	
Arroz/3	79,80 B		Arroz/3	94,00A	
Arroz/1	78,40 B		Arroz/1	92,20AB	
Cacao/1	52,60 C		Cacao/3	80,20 B	
Cacao/3	50,60 C		Cacao/1	80,20 B	
Cacao/5	25,40 D	Cacao/5	40,80 C		
<b>120 horas</b>			<b>120 horas</b>		0,0001
Algarrobo/5			94,00A		
Algarrobo/3			94,00A		
Algarrobo/1			94,00A		
Arroz/5			94,00A		
Arroz/3			94,00A		
Arroz/1			94,00A		
Cacao/1			94,00A		
Cacao/3			94,00A		
Cacao/5			59,20 B		

Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ ).

Los resultados obtenidos en las evaluaciones de porcentaje de crecimiento se muestran en la (tabla. 4.6). Mientras tanto la comparación de medias Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ) probabilidad de error, evidencia que, para los tratamientos, biochar de algarrobo con dosis (1, 3, 5g) y arroz de 5g conllevan la misma categoría, presentándose con los mayores porcentajes de crecimiento  $>64\%$  a las 24, 48 y 72 horas después de la colocación del disco; estos consiguieron el crecimiento micelial total (100%) de *S. rolfsii* a las 96 y 120 horas. Resultados parecidos fueron percibidos por Guardado y Ramírez (2018), de este mismo fitopatógeno, cuyo trabajo reportan que al utilizar enmiendas ecológicas en el cultivo de frijol influye en el crecimiento del hongo, de esta forma potenciar el desarrollo de la enfermedad sobre el huésped.

Al evaluar la influencia del biochar sobre las plantas y las enfermedades Frenkel et al. (2017), establecieron que no sólo influye positivamente en el crecimiento de los cultivos; sino que al ser utilizados en concentraciones iguales o superiores al 3% permiten la proliferación de enfermedades sobre la planta, mientras tanto para reducirlas se recomienda utilizar dosis inferiores a 1%; estos resultados son aproximados a los que se definieron en el presente ensayo. Por este motivo las dosis deben ser evaluadas para mantener una relación constante de costos para el agricultor y los beneficios sobre el suelo y biota (Graber et al., 2014).

Lo antes expuesto se distingue a lo evaluado por Rahayu y Sari (2017), describen que el biochar derivado de madera presenta sustancias tóxicas que ayudan a eliminar nematodos y hongos fitopatógenos. Además, Velázquez et al. (2019), argumenta que el biocarbón obtenido de cascarilla de arroz, contiene macro y micro nutrientes es especial Ca, N y K que mejoran la calidad de los suelos agrícolas, adicionando porosidad, mejor absorción, reduce la lixiviación e influye sobre el desarrollo de microorganismos presentes en el suelo; así demuestra que es una alternativa viable y económica en el agro (Reyes, 2018). Así mismo Steiner et al. (2008), detallan que el biochar contiene ácido fórmico, acético, metanol, formaldehidos resultado de proceso pirolítico; estas sustancias en altas concentraciones producen un efecto biocidas.

Mientras que a diferencia de aquellos se encuentra biocarbón de cacao a concentraciones de 1,3 y en especial de 5 g que presentó los menores porcentajes de crecimiento micelial del hongo (5%; 19, 20%; 25,40%; 40,80% y 59,20%) hasta las 120 horas después de la colocación del disco (tabla. 4.6); en las evaluaciones siguientes el efecto del biochar incrementó el crecimiento del fitopatógeno (*Sclerotium rolfsii*). Estos datos se asemejan a los obtenidos por Sánchez et al. (2020), donde no hubo uniformidad en el crecimiento de *Trichoderma* spp a concentraciones de 1,25 y 3,75 g 80ml de biochar de cacao; mientras tanto la dosis más alta 7,5g si permitió inhibir su crecimiento en condiciones *in vitro*. Al evidenciar estos resultados se demuestra que no sólo confiere crecimiento de hongos benéficos (Escalante et al., 2016), sino también a fitopatógenos al ser incorporado al suelo como enmienda. (Barrow, 2012), también contrasta que las enmiendas como el biochar son alternativas ecológicas para el control de plagas y beneficios al suelo.

**Tabla 4. 7.** Prueba de comparación de medias, a la variable número de esclerocios producidos y porcentaje de viabilidad, a partir de aplicación 3 tipos de biochar a diferentes dosis sobre *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro*.

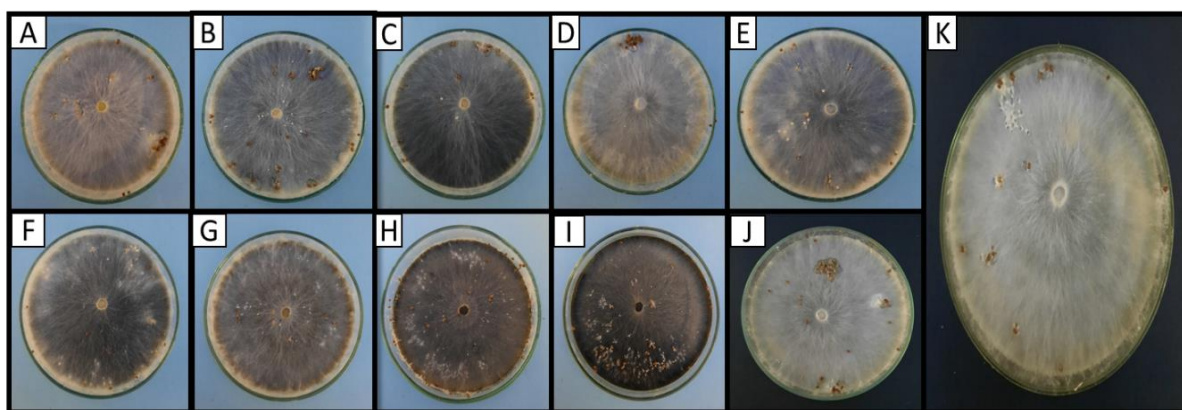
Tratamientos Biochar+Dosis (g 100ml <sup>-1</sup> )	Número de esclerocios (N°)	Porcentaje de viabilidad(%)
Algarrobo/3	55,40A	100%
Testigo	49,00A	100%
Cacao/3	39,40AB	100%
Algarrobo/5	36,00AB	100%
Arroz/3	35,80AB	100%
Cacao/5	31,20AB	100%
Algarrobo/1	26,80 B	100%
Arroz/5	23,60 B	100%
Arroz/1	23,00 B	100%
Cacao/1	21,00 B	100%

Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ ).

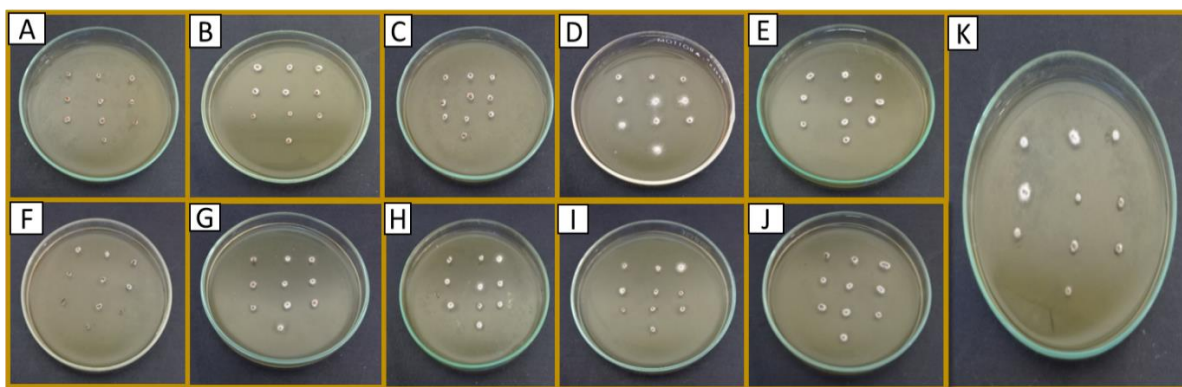
De acuerdo a la comparación de medias Tukey ( $p > 0,5$ ), entre los resultados adquiridos mostró (100% de crecimiento) de *S. rolfsii* con la misma categoría a las 144, 168, 192 y 216 horas después de la aplicación del disco micelial. Por lo que se estima que el biocarbón de cacao, arroz y algarrobo promueve el crecimiento del



fitopatógono. Así mismo, Vecstaudza et al. (2017), destaca que el biochar ejerce cómo un medio potenciador de sobrevivencia a microorganismos de origen bacteriano y fúngico; por otra parte, Graber et al. (2010) y Vecstaudza et al. (2018), sugieren la capacidad que tiene el biochar de madera en promover el crecimiento y cantidad de *Trichoderma* spp el cual actúa como agente de control ante patógenos que afectan al centeno *Secale cereale*, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annum*.



**Figura 4. 4.** Producción de esclerocios a los 30 días después de la inoculación. (A) Algarrobo 1g R5; (B) Algarrobo 3g R5; (C) Algarrobo 5g R4; (D) Arroz 1g R4; (E) Arroz 3g R4; (F) Arroz 5g R4; (G) Cacao 1g R4; (H) Cacao 3g R5; (I) Cacao 5g R4; (J) Testigo R2; (K) Testigo R5.



**Figura 4. 5.** Efectividad de biochar sobre la viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii*, en medio PDA evaluado las 24 horas después de la inoculación. (A) Algarrobo 1g R4; (B) Algarrobo 3g R1; (C) Algarrobo 5g R2; (D) Arroz 1g R1; (E) Arroz 3g R4; (F) Arroz 5g R3; (G) Cacao 1g R4; (H) Cacao 3g R1; (I) Cacao 5g R3; (J) Testigo R1; (K) Testigo R2.

### 4.3. EFECTO *IN VITRO* COMBINACIÓN BIOCHAR Y FUNGICIDAS SOBRE *Sclerotium rolfsii*

El análisis de varianza aplicado a la variable porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después de la colocación del disco,

presentó diferencias significativas ( $p=0,0001$ ). Lo cual indica que los biocarbons (A), fungicidas (B) y su interacción (AXB) evaluados propiciaron diferencias en el crecimiento micelial de *S. rolfsii*. Igual significancia para los fungicidas y no significancia para biochar y la interacción en las fases de evaluación 168, 192 y 216 horas después de la inoculación; significa que al menos uno de los fungicidas evaluados tuvo un crecimiento micelial diferente sobre el fitopatógeno en todas las etapas de evaluación. Así mismo presentó significancia ( $p=0,0039$ ) la variable número de esclerocios para el factor fungicidas a los 40 días después de la aplicación del disco micelial, (tabla. 4.8).

**Tabla 4. 8.** Análisis de varianza (ADEVA), del efecto *in vitro* de combinación biochar y fungicidas para la variable PICM y número de esclerocios producidos sobre *S. rolfsii*.

Variables		Biochar (A)	Fungicidas(B)	Interacción(A*B)
% Inhibición	24h	**	*	**
"	48h	**	**	**
"	72h	**	*	**
"	96h	**	**	**
"	120h	**	**	**
"	144h	*	**	*
"	168h	NS	**	NS
"	192h	NS	**	NS
"	216h	NS	**	NS
Número de esclerocios 40 días después de la inoculación		NS	*	NS

NS=No hay significancia (probabilidad $>0,05$ ); \*=Significancia (probabilidad $<0,05$ ); \*\*=Alta significancia (probabilidad $<0,01$ ).

Según la prueba de medias Tukey ( $p>0,5$ ) en la variable PICM, mostró que los biocarbons de algarrobo, arroz y cacao con difenoconazol presentaron la misma categoría, aquellos que consiguieron reducir (100%) el crecimiento del aislado durante todo el proceso evaluativo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas), (tabla. 4.9). En esta investigación el difenoconazol tuvo un comportamiento similar a los obtenidos por Agustí et al. (2016), resultó ser el producto químico más eficaz para el control de *S. rolfsii* en condiciones de campo; estos resultados son de gran interés ya que permite verificar el efecto del fungicida sobre el individuo evaluado e implementarlo como estrategia de control contra la enfermedad. Así mismo en el ensayo *in vitro* realizado por Amezquita y Chinchilla (2021), se evidenció la

inhibición (100%) sobre el crecimiento de otros fitopatógenos *Cylindrocarpon* spp, *Cylindrocladium* spp y *Fusarium* spp. Por lo contrario, se evidenció bajo condiciones controladas que *Dactylonectria torresensis* no es totalmente sensible a este fungicida, pero benomyl si logró inhibir el 100% del crecimiento miceliar. (Racines et al., 2019). Dienoconazol presenta mecanismo de acción sobre la síntesis de ergosterol (Pérez et al., 2005) sobre la cepa de *S. rolfsii*.

Todos los tratamientos que contenían benomyl presentaron la misma categoría en el porcentaje de inhibición (<2,60) a las 192 y 216 horas de evaluación. Sin embargo, el tratamiento de algarrobo diluido con benomyl logró inhibir el crecimiento (<72%) del hongo desde las 24 (71,20%) hasta 120 horas (4,60%) posteriores de la inoculación. Al contrario de los resultados logrados, Tuz (2018), detalla que el biocarbón mejora y aumenta el sistema radicular de las plantas, propicia tolerancia a fitopatógenos. Por consiguiente, Alzate et al. (2008) considera que el algarrobo *Hymenaea courbaril* presenta sustancias como flavonoides, terpenoides y taninos concediéndole una acción sobre microorganismos patógenos.

Así mismo el tratamiento arroz+benomyl (desde las 48 horas) y cacao+benomyl (72 horas) hasta las 192 horas después de la aplicación del disco; en la evaluación siguiente estos no inhibieron en el crecimiento (0%) del fitopatógeno. Este fitocontrolador ha perdido efectividad con el pasar de los años ya que Yaqub y Shahzad (2006), reportan porcentajes mayores al 50% de inhibición sobre el crecimiento de *S. rolfsii* a una concentración de 1000ppm; por tanto, la pérdida de efectividad del fungicida hacia este fitopatógeno es evidente.

A diferencia de estos datos, Pérez et al. (2011), determina que benomyl es efectivo para la desinfección de semillas de vegetales en dosis de 10g/L/1minuto al inhibir totalmente el desarrollo de la enfermedad causada por *Verticillium* spp. Algo similar a lo entronado por el anterior autor ocurrió en el 2003 en la investigación de Gutiérrez y Gutiérrez donde los aislados de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* Penz fueron sensibles a benomyl a 0,1; 5; 10; 50 y 100ppm. Hasta la actualidad este fungicida sigue presentando eficacia sobre el control de

*Colletotrichum* (Carreño et al., 2021); sin embargo, el aislado de *S. rolfsii* no presenta sensibilidad a benomyl.

**Tabla 4. 9.** Comparación estadística de medias Tukey ( $p>0,5$ ) de error, aplicada a la variable porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) utilizando biochar, benomyl y difenoconazol sobre *S. rolfsii* bajo condiciones *in vitro*.

Biochar+Fungicida	PICM(%)	p-valor	Biochar+Fungicida	PICM(%)	p-valor
<b>24 horas</b>			<b>48 horas</b>		
		0,0001			0,0001
Arroz/Difenoconazol	100A		Arroz/Difenoconazol	100A	
Cacao/Difenoconazol	100A		Cacao/Difenoconazol	100A	
Algarrobo/Difenoconazol	100A		Algarrobo/Difenoconazol	100A	
Cacao/Benomyl	100A		Cacao/Benomyl	100A	
Arroz/Benomyl	100A		Arroz/Benomyl	85 B	
Algarrobo/Benomyl	71,20B		Algarrobo/Benomyl	70,40C	
<b>72 horas</b>			<b>96 horas</b>		
		0,0001			0,0001
Arroz/Difenoconazol	100A		Arroz/Difenoconazol	100A	
Cacao/Difenoconazol	100A		Cacao/Difenoconazol	100A	
Algarrobo/Difenoconazol	100A		Algarrobo/Difenoconazol	100A	
Cacao/Benomyl	91,80A		Cacao/Benomyl	79,20B	
Arroz/Benomyl	77,00 B		Arroz/Benomyl	63,80 C	
Algarrobo/Benomyl	60,40 C		Algarrobo/Benomyl	30,20 D	
<b>120 horas</b>			<b>144 horas</b>		
		0,0001			0,0005
Arroz/Difenoconazol	100A		Arroz/Difenoconazol	100A	
Cacao/Difenoconazol	100A		Cacao/Difenoconazol	100A	
Algarrobo/Difenoconazol	100A		Algarrobo/Difenoconazol	100A	
Cacao/Benomyl	61,60B		Cacao/Benomyl	40,40B	
Arroz/Benomyl	43,20B		Arroz/Benomyl	20,80 C	
Algarrobo/Benomyl	4,60 C		Algarrobo/Benomyl	0,00 D	
<b>168 horas</b>			<b>192 horas</b>		
		0,0857			0,5942
Arroz/Difenoconazol	100A		Arroz/Difenoconazol	100A	
Cacao/Difenoconazol	100A		Cacao/Difenoconazol	100A	
Algarrobo/Difenoconazol	100A		Algarrobo/Difenoconazol	100A	
Cacao/Benomyl	16,00B		Cacao/Benomyl	2,60 B	
Arroz/Benomyl	7,00 BC		Arroz/Benomyl	1,80 B	
Algarrobo/Benomyl	0,00 C		Algarrobo/Benomyl	0,00 B	

Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha\leq 0,05$ ).

El biocarbón de cacao, arroz y algarrobo no influyen sobre la disminución del crecimiento micelial de *S. rolfsii*. Por lo que se acuerda con lo concluido por Guerra (2015), que de acuerdo a la materia prima el biochar presenta un comportamiento

diferente, algunos son apropiados para ciertos entornos y otros no. En el caso de contenido de carbono orgánico total más bajos los representa el biochar de cascarilla de arroz (586,37 g/kg) y cáscara de cacao (610,17 g/kg).

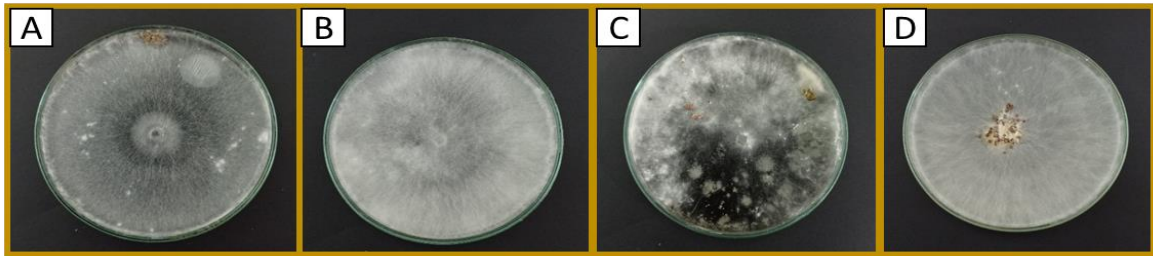
Los tratamientos sometidos a la prueba de comparación de medias Tukey, ( $\alpha \leq 0,05$ ) de error, aplicado a la variable número de esclerocios, presentaron la misma categoría (tabla.4.10); mientras que si demostró diferente clase el testigo ( $n=45$ ), (fig. 4.6). Aquellos tratamientos que permitieron el crecimiento micelial del patógeno presentaron índice de germinación y viabilidad (100%) (fig. 4.7), a las 24 horas después de la inoculación.

**Tabla 4. 10.** Número promedio de esclerocios producidos y porcentaje de viabilidad, a partir de aplicación 3 tipos de biochar y fungicidas (benomyl, difenoconazol) sobre *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones controladas.

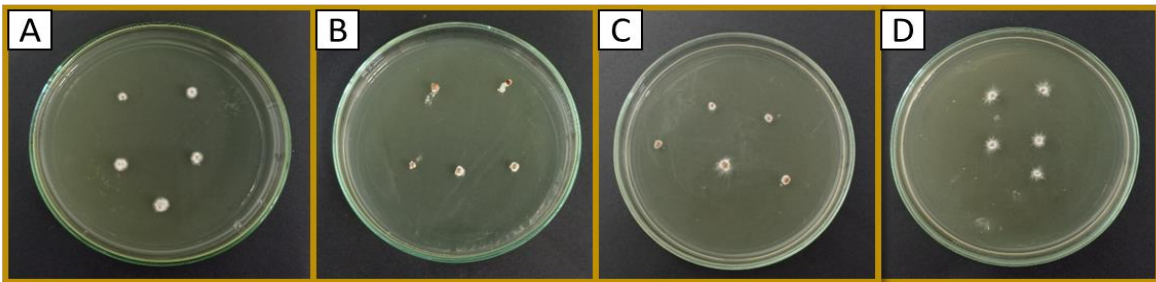
Tratamientos Biochar+Dosis (g 100ml <sup>-1</sup> )	Número de esclerocios (N°)	Porcentaje de viabilidad(%)
Cacao/Benomy	13,60A	100%
Algarrobo/Benomy	4,40A	100%
Arroz/Benomy	4,00A	100%
Cacao/ Difenoconazol	0,00A	0%
Algarrobo/ Difenoconazol	0,00A	0%
Arroz/ Difenoconazol	0,00A	0%
Testigo	45,00 B	100%

Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales según (Tukey,  $\alpha \leq 0,05$ ).

Lo antes expuesto muestra que el agroquímico difenoconazol fue eficaz en impedir el crecimiento micelial de *S. rolfsii* indistintamente de los biocarbones empleados; mientras que benomyl mostró inhibición únicamente en las primeras horas, sin embargo, su efecto disminuye al pasar los días.



**Figura 4. 6.** Producción de esclerocios a los 40 días después de la siembra. (A) Algarrobo+benomyl R1; (B) Arroz+benomyl R5; (C) Cacao+benomyl R3; (D) Testigo R1.



**Figura 4. 7.** Efecto combinado de fungicidas y biochar sobre la viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii*, en medio PDA evaluado las 24 horas después de la inoculación. A) Algarrobo+benomyl R4; (B) Arroz+benomyl R4; (C) Cacao+benomyl R2; (D) Testigo R1

## **CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. CONCLUSIONES**

Los fungicidas carboxim-thiram, difenoconazol, propiconazol, pentacloronitrobenzoceno y sulfato de cobre penta-hidratado presentaron eficacia *in vitro* en el control sobre *Sclerotium rolfsii*, mientras que los fungicidas del grupo químico benzimidazoles, tales como benomyl, carbendazim, tiofanato metil y thiabendazol, no mostraron efecto sobre el fitopatógeno.

El biocarbon de algarrobo y arroz a concentraciones 1,3, y 5 gramos permiten el crecimiento (100%) y desarrollo de *S. rolfsii* bajo condiciones controladas, mientras que el biochar de cacao únicamente lo retrasa; por lo tanto, no presenta reacciones que puedan inhibir su crecimiento. Razón por la cual se estima que no es una herramienta eficiente para el manejo de la enfermedad.

Los resultados demuestran la sensibilidad de *S. rolfsii* a difenoconazol, en contraste a esto benomyl en combinación con biochar de cacao, arroz y algarrobo retardan el crecimiento micelial y reducen la producción de esclerocios; existe la posibilidad de que se haya utilizado periódicamente para su control, razón por la ha generado variabilidad genética y habilidad fisiológica de resistencia. Además, se demuestra una vez más que los biocarbones de cacao, arroz y algarrobo no presentan capacidad inhibitoria sobre el patógeno en condiciones *in vitro*.

### **5.2. RECOMENDACIONES**

Con la necesidad de controlar y evitar la enfermedad de la pudrición del tallo en el cultivo de frijol, se debe usar los fungicidas (propiconazol, difenoconazol, sulfato de cobre pentahidratado, carboxim-thiram y pentacloronitrobenzoceno de forma racional; ya que estos tienen un efecto de inhibición sobre el patógeno. Se necesita realizar rotación de cultivos y mejorar el manejo integrado de la enfermedad como una herramienta clave en el control de *S. rolfsii*.

Emplear técnicas para caracterizar los biocarbones y así definir sus propiedades físicas, químicas y biológicas que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de *S.*

*rolfsii*. Por otra parte, interactuar con la composición, dosis y aislados bajo condiciones *in vitro* y de esta forma ser aplicados en el campo agrícola para evaluar su comportamiento. Además, realizar confrontaciones de *S. rolfsii* y controladores biológicos como *Trichoderma* spp en medio de cultivo con biochar, de esta forma aportar con el control de la enfermedad.

Realizar análisis molecular del aislado *S. rolfsii* para identificar los genes de resistencia y que estos sean evaluados para inducir al mejoramiento genético en las plantas asociadas a la enfermedad.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abenza, D. (2012). Evaluación de efectos de varios tipos de biochar en suelo y planta. The European Union's Eco-Management and Audit Scheme (EMAS), 111. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3492-x\\_2](https://doi.org/10.1007/1-4020-3492-x_2)
- ADAMA (Área de Asuntos Regulatorios). (2016). VITAVAX® 300 WP. Ficha técnica recuperado de [https://www.adama.com/documents/392363/398803/FT+VITAVAX+300WP\\_tcm104-58131.pdf](https://www.adama.com/documents/392363/398803/FT+VITAVAX+300WP_tcm104-58131.pdf).
- ADAMA (Área de Asuntos Regulatorios). (2018). Odeón 720 sc. Ficha técnica. Recuperado de: [https://www.adama.com/documents/456494/458452/FT+Odeon+720+SC+2018\\_may.pdf](https://www.adama.com/documents/456494/458452/FT+Odeon+720+SC+2018_may.pdf)
- ADAMA (Área de Asuntos Regulatorios). (2019). Mastercop ®. Ficha técnica. Recuperado de: [https://www.adama.com/documents/381468/384470/Mastercop\\_FT\\_151119](https://www.adama.com/documents/381468/384470/Mastercop_FT_151119)
- Agustí, L; Roca, M. Raya, F; Luque, J; Romero, A. (2016). Estudios preliminares sobre etiología, resistencia varietal y control de *Sclerotium rolfsii*, agente causal de la podredumbre blanda de patata en postcosecha. En J. Diez (presidencia). VIII Congreso de la sociedad española de fitopatología. Congreso llevado a cabo en Palencia. 260.
- Alburquerque, D. y Gusqui, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498. DOI: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>.
- Alfaro, F. (2019). Estudio genético de la resistencia a las estrobilurinas en aislamientos de *Pseudocercospora fijiensis* de plantaciones de banano en Costa Rica. Tesis a Obt. Magister Scientiae en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular. Universidad de Costa Rica. p 16-20. <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/79163/TFG%20-%20F.%20Alfaro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Álvarez, M. (2020). Propiconazol 250 EC-DVA. Ficha técnica. Recuperado de: <https://dva.com.co/wp-content/uploads/2020/02/FT-PROPICONAZOLE-250-EC-DVA.pdf>
- Alzate, Luz; Arteaga, D y Jaramillo, Y. (2008). Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* L) de interés para la industria de alimentos *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2): 100-111.
- Amezquita, J y Chinchilla, K. (2021). Ensayo *in vitro* de fungicidas para el control de *Cylindrocarpon* spp, *Cylindrocladium* spp y *Fusarium* spp. Metroflor. Recuperado de <https://www.metroflorcolombia.com/ensayo-in-vitro-de-fungicidas-para-el-control-de-cylindrocarpon-spp-cylindrocladium-spp-y-fusarium-spp/>.

- Aragao de Figueredó, N; da Costa, L y Car, L. (2017). Caracterización de biochars de diferentes fuentes y evaluación de liberación de nutrientes y contaminantes. *Revista Ciencia Agronómica*, 48(3): 395-403.
- Arce, C., Varela, I y Torres, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*), *Agronomía Mesoamericana*, 30(2):381-393.
- Barrow, C. J. (2012). Biochar: Potencial para contrarrestar la degradación de la tierra y mejorar la agricultura. *Geografía aplicada*, 34, 21–28.
- BCE (Banco Central del Ecuador). (2019). Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario. Recuperado de: <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201804.pdf>.
- BCE (Banco Central del Ecuador). (2020). Reporte de Coyuntura Sector Agropecuario. Recuperado de: <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc202001.pdf>.
- Beebe, S., Ramirez, J., Álvarez, P., Ricaurte, J., Mora, A., Guerrero, A., Rosas, J., Rodríguez, J., y Van, M. (2017). Modelación del frijol en Latinoamérica. 3-41. Recuperado de: [https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC110112/modelacion\\_de\\_frijol\\_en\\_latinoame%CC%81rica\\_20180202\\_final\\_online.pdf](https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC110112/modelacion_de_frijol_en_latinoame%CC%81rica_20180202_final_online.pdf).
- Bonanomi, G., Lorito, M., Vinale, F y Woo, S. (2018). Enmiendas orgánicas, microbios beneficiosos y microbiota del suelo: hacia un marco unificado para la supresión de enfermedades. *Revisión anual de fitopatología*, 56(1):1–20.
- Bravo, M.B. (2015). Estudio de la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Cercospora sojina* Hara, agente causal de la mancha ojo de rana en el cultivo de soja. Tesis. Obt. Magister. Universidad de Buenos Aires. Córdoba-Argentina. Recuperado de: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/tesis/maestria/2019bravomariabelen.pdf>
- Briones, D. y Tinoco, C. (2012). Degradación de los pesticidas propiconazol y difenoconazol de las aguas de desecho de los cultivos de banano mediante procesos fotoquímicos”. Tesis de grado. Ing Agrónomo. Escuela Superior Politécnica del Litoral. p 2-36. Ecuador. <https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/43949/D-105631.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>
- Buechel, T. (2020). Perfil de agente patógeno: *Sclerotium*. Recuperado de: <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/perfil-de-agente-patogeno-sclerotium/>
- Carreño, J; Sánchez, L; Guzmán, A; Suarez, C; Vélez, S (2021). Efecto *in vitro* de fungicidas para el control de *Colletotrichum* spp., en frutales Manabí – Ecuador, 14(35): 37-42. *Ciencia UNEMI*, <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol14iss35.2021pp37-42p>.

- Castellanos, L., Muiño, B., García, B., Lorenzo, M., Rodríguez, A., y Gómez, M. (2011). Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.). Vuil. Fitosanidad, 15(1), 1-10.
- Chirinos, D., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Peñarrieta, S., Solis, L y Geraud, F. (2020). Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. Ciencia Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia), 21(1): 1-16. DOI: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol21\\_num1\\_art:1276](https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1276).
- Cronquist, A. (1981). Un Sistema integrado de clasificación de plantas con flores. Estados Unidos (Nueva York). Prensa de la Universidad de Columbia: Jardín Botánico de Nueva York. p 1261.
- De Marcano, A., Vargas, N y Pire, A. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Rev. Fac. Agron, 22(4):315-324.
- Edifarm. (2016). Terraclor. Ficha técnica. Recuperado de: <https://quickagro.edifarm.com.ec/pdfs/productos/TERRACLOR-20160816-094637.pdf>
- Edifarm. (s.f.). Novak 50. Ficha técnica .Recuperado de: [https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm\\_quickagro/pdfs/productos/THIOFAN-ATO%20METIL%2070%20WP%20&%2361474%3B%20NOVAK%AE%2050%25%20SC-20181107-100823.pdf](https://gestion.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/THIOFAN-ATO%20METIL%2070%20WP%20&%2361474%3B%20NOVAK%AE%2050%25%20SC-20181107-100823.pdf)
- Escalante, A., Pérez, G., Hidalgo, C., López, J., Campo, J., Valtierra, E y Etchevers, J. (2016). Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo. Terra Latinoamericana, 34: 367-382
- Ezziyyani, M., Sánchez, C., Requena, M., Rubio, L., y Castillo, M. (2004) Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Análisis de Biología. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia (26). p. 61-68.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura). (2018). Nuestras legumbres nuestras pequeñas semillas grandes soluciones. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/ca2597es/CA2597ES.pdf>.
- Folgueras, M., Herrera, L., Rodríguez, S y Rojas, X. (2010). Efectividad biológica *in vitro* de varios fungicidas frente a patógenos causantes de pudriciones radicales en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Centro Agrícola, 37(1), 11-15; enero-marzo, 2010
- FRAC (Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas). (2018). Fungicides sorted by mode of action. FRAC - Fungicide Resistance Action Committee, 1–14.
- FRAC (Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas). (2019). Sustancias activas fungicidas según el modo de acción. 1 ed. 12-13. <https://www.syngenta.es/sites/g/files/zhg516/f/2019/04/clasificacion-fungicidas-bactericidas-segun-modo-accion.pdf>.

- Frenkel, O; Jaiswal, A; Elad, Y; Lew, B y Graber, E. (2017). El efecto del biocarbón en las enfermedades de las plantas: ¿qué debemos aprender al diseñar sustratos de biocarbón? *Revista de ingeniería ambiental y gestión del paisaje*, 25 (2), 105-113. <https://doi.org/10.3846/16486897.2017.1307202>.
- Garcés, F., Olmedo, I., Garcés, R., y Díaz, T. (2015). *Potencial agronómico de 18 líneas de fréjol F6 en Ecuador*. IDESIA (Chile), 33(2), p 107.
- Gea, F., Lainez y Navarro, M. (2012). Eficacia de diferentes fungicidas en el control de mole húmeda del champiñón (agente causal: *Mycogone pernicioso*). *Sanidad vegetal. Plagas*, 38:133-141.
- González, I; Rodríguez, M; Delgado, B y Schmidt, P. (2020). Biochar y su distribución a la nutrición, crecimiento y defensa de las plantas. *Protección Vegetal*, 35(2): 1-11.
- Graber, E y Elad, Y. (2013). Impacto de biocarbón en la resistencia de plantas a las enfermedades. En *biocarbón y biota del suelo*. Editado por Ladygina N and Rineau F. CRC Press. 41-68.
- Graber, E, Frenkel, O; Jaiswal, A y Elad, Y. (2014). ¿Cómo puede influir el biocarbón en la gravedad de las enfermedades causadas por patógenos del suelo?, 5(12): 169-183.
- Graber, E; Meller Harel, Y; Kolton, M; Cytryn, E, Silber, A y Rav, D. (2010). Impacto del biocarbón en el desarrollo y la productividad de pimientos y tomates cultivados en medios sin suelo fertilizados. *Suelo y planta*, 337, 481-496.
- Granados, M. (2020). Diversidad de hongos asociados a la marchitez del frijol común. Recuperado de: [http://ofinase.go.cr/wp-content/uploads/boletin01\\_pitta032020.pdf](http://ofinase.go.cr/wp-content/uploads/boletin01_pitta032020.pdf).
- Guardado, Y y Ramírez, A. (2018). Control biológico del añublo sureño (*Sclerotium rolfsii* L.) en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con *Trichoderma harzianum* R. y tres biopreparados como enmienda al suelo y tratamiento a la semilla. Tesis. Ing. Agrónomo. Universidad de El Salvador. p 8-14.
- Guerra, P. (2015). Producción y caracterización de Biochar a partir de la biomasa residual de sistemas agroforestales y de agricultura convencional en la Amazonía Peruana. Ing. ambiental. La Molina. Lima-Perú. 59-72.
- Guillén, D., Cadenas, C., Alia, I., López, V., Andrade, M y López, J. (2017). Inhibición colonial in vitro de un aislado de *Colletotrichum acutatum* Simmonds a tratamientos con fungicidas. *Centro Agrícola*, 44(4), 11-16. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852017000400002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852017000400002&lng=es&tlng=es).
- Gutiérrez, O y Gutiérrez, J. (2003). Evaluación de resistencia a benomyl, thiabendazol y azoxystrobin para el control de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* P en frutos de guayaba *Pisidium guajaba* L en poscosecha.

- Revista Mexicana de Fitopatología, 21(2): 228-232.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221219>.
- INSUAGRO (Insumos Agroquímicos). (s.f.). Carbendazim 50 Ficha técnica. Recuperado de:  
<http://www.insuagro.com.ar/images/pdf/productos/carbendazim-50-f.pdf>
- INTAGRI (Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura). (2017). Pudrición Blanca (*Sclerotium cepivorum*) en el Cultivo de Cebolla. Serie Hortalizas Núm. 12. Artículos Técnicos de Intagri. México. 4. Recuperado de: <https://www.intagri.com/articulos/hortalizas/pudricion-blanca-sclerotium-cepivorum-en-el-cultivo-de-cebolla>
- Kelpie, W. (2014). Cómo funciona el biochar en el suelo. *El diario de Biochar*, 32, 25–33. <https://doi.org/10.1021/jf205278v>
- Loor, K. (2017). Sensibilidad in vitro de *Sclerotium rolfsii* aislado de pimiento (*Capsicum annuum*) y efectos de su inoculación en híbridos de pimiento Marcato y Quetzal. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Manabí, Santa Ana.
- Madariaga, M, Sepúlveda, P y Horta, M. (2018). Pudrición blanca. Recuperado de: <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/66935>.
- MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca). (2016). Especialización productiva ecuatoriana: contrastes y diferencias territoriales según zonas de planificación y agendas de política por zona. Recuperado de: <http://www.competencias.gob.ec/wp-content/uploads/2017/05/01PPP2016-POLITICA01.pdf>.
- Manzo, S., Carrillo, H., Guzmán, G y Orozco S. (2012). Análisis de la sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra del banano a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxistrobin. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:81-85.
- Marín, J., García, R y Barrezueta, S. (2018). Elaboración de biocarbón obtenido a partir de la cáscara del cacao y raquis del banano. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(3), 75-81. <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>.
- McGrath, M.T. (2004). ¿Qué son los fungicidas? Trans. Luisa Santamaria, José Carlos Ureta R., 2014. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01
- Medina, H., Munar, D., Mestizo, Y., García, J y Sarria, G. (2020). Ensayos exploratorios de la interacción del biocarbón sobre *Phytophthora palmivora* (Butler), agente causal de la Pudrición del cogollo en palma de aceite en Colombia. *Cenipalma: Tecnología e innovación para una palmicultura colombiana resiliente* (1):1.
- Nocua, L., Uribe, P., Tarazona, L., Robles, R y Cortés, J. (2020). Azoles de antes y ahora: una revisión. *Revista chilena Infectol*, 37 (3), 219-230.

- Ocegueda, M; Casas, J; Virgen, G; González, D y López, E. (2020). *Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagónicas a Sclerotium*. Revista Mexicana de Fitopatología, 38(1), 146-159. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-2.
- ONU (Organización de Naciones Unidas). (2015). Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Recuperado de: [https://www.equidad.org.mx/pdf/2\\_Agenda%202030%20Desarrollo%20Sostenible.pdf](https://www.equidad.org.mx/pdf/2_Agenda%202030%20Desarrollo%20Sostenible.pdf).
- Oses, A. (2012). Efectos de la aplicación del biochar en el modelo jerárquico de agregación de un suelo forestal bajo condiciones oceánicas. Universidad Autónoma de Barcelona. 26. <https://core.ac.uk/download/pdf/18416021.pdf>.
- Pérez, A; Fernández, D, De vicente, A; Torés, J y López, F. (2005). Resistencia a inhibidores de la biosíntesis de ergosterol y a estrobilurinas en oídio de cucurbitáceas. Phytoma. Recuperado de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/173-noviembre-2005/resistencia-a-inhibidores-de-la-biosntesis-de-ergosterol-y-a-estrobilurinas-en-odio-de-cucurbitceas>
- Pérez, L., Belmonte, J., Núñez, H., Mendoza, B y Guzmán, R. (2015). Sensibilidad de especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum*. a agentes de control biológico y fungicidas. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 256-267.
- Pérez, L., Villalpando, J., Castañeda, C. y Ramírez, R. (2009). Sensibilidad *in vitro* de *Sclerotium rolfisii* Saccardo, a los fungicidas comúnmente usados para su combate. Revista Mexicana de Fitopatología 27:11-17.
- Pérez, L; Abreu, J; Pérez, M; Martínez de la Parte, E y Pueyo, M. (2011). Eficacia del Benomyl y el Fludioxonil para el control de *Verticillium albo-atrum*. Reinke & Berthold y v. *Dahliae* Klebahn en semillas de vegetales. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Fitosanidad, 15 (2): 107-115. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209122297006.pdf>
- Quito, J. (2020). Biochar como enmienda edáfica para bajar los niveles de absorción de cadmio en cacao (*Theobroma cacao* L), cultivar CCN-51. UTMACH. 47.
- Racines, M; Tamayo, E; Jarrín, M; Báez, F y Tello, C. (2019). Alternativas de control orgánico in vitro para *Dactylonectria torresensis* en la mora de castilla (*Rubus glaucus*) en Ecuador. Enfoque UTE, 10, 67-77. [https://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/public/journals/1/html\\_v10n4/art006.html](https://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/public/journals/1/html_v10n4/art006.html).
- Rahayu, D y Sari, N. (2017). Desarrollo de *Pratylenchus coffeae* en suelo aplicado con biocarbón, raíces de café y su efecto sobre el crecimiento vegetal. Perlita Perkebunan, 33(1): 24-32
- Reyes, G. (2018). Aprovechamiento de residuos forestales en forma de biocarbón como alternativa agroecológica para la producción de madera de calidad de

*Acacia mangium* Willd. Tesis Dr Agroecología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C-Colombia. 225-226.

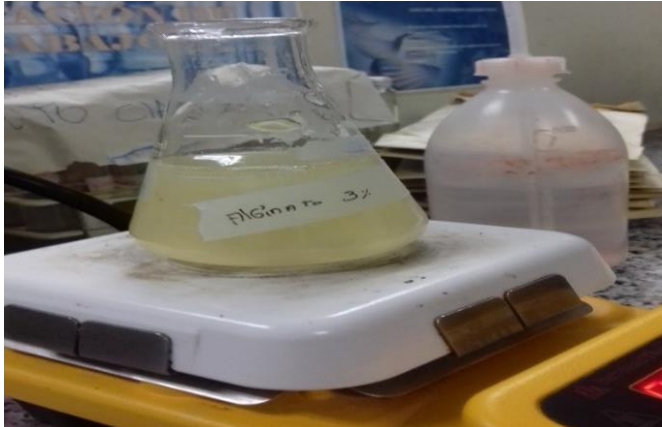
- Riveros, F; Sotomayor, R; Rivera, V; Secor, G y Espinoza, B. (2003). *Resistencia de Phytophthora infestans (Montagne) de Bary a Metalaxyl en el cultivo de papas en el norte de Chile*. Agricultura técnica, 63(2), 117-14.
- Rogovska, N; Larid, D; Leandro, L; Aller, D. (2016). Efecto del biocarbón sobre la gravedad de la de la enfermedad de la raíz de la soja causada por *Fusarium virguliforme*. Plant Soil. 111-126. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3086-8>
- Romero, J. (2015). Manejo integrado de la pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*) en lechuga, en Tenango del valle, estado de México. Ing Agronomo Fitotécnista. UAEM. 66.
- Rondón, A., Flores, Y., Soto, E., y Mujica, Y. (1995). Control químico *in vitro* y en umbráculo del hongo causante de la pudrición blanca. Rev. Fac. Agron,12: 1-13.
- Rúgeles, O. (2017). Triazoles, todos iguales se deben mezclar. Ficha técnica. Recuperado de: <https://www.metroflorcolombia.com/triazoles-todos-iguales-se-deben-mezclar/>
- Sánchez, S; Condo, A; Sisalima, P; Barrezueta, S y Jaramillo, E. (2020). Uso de biocarbones en medios de cultivo para el crecimiento de *Trichoderma* spp. *in vitro*. Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas, 3(2), 66-72.
- Shahzaman, A. (2020). Respuesta de fungicidas en cultivares selectivos de garbanzo contra la pudrición del collar en garbanzo. Revista de estudios de entomología y zoología, 8 (4): 51-55.
- Soto, K., Flores, L., Brabosa, G y Sabanero, M. (2011). Citocalasina y benomil: aspectos químicos y biológicos. CHEMISTRY, 3(1): 11-17.
- Spokas, K; Novak, J; Stewart, C; Cantrell, K., Uchimiya, M; Dusare, M. (2011). Qualitative analysis of volatile organic compounds on biochar. Chemosphere,85:869-882.
- Steiner, C; Das, KC; Garcia, M; Förster, B; Zech, W. (2008). Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. Pedobiologia 51(5-6):359- 366.
- Suárez, S., Ferriz, R., Vega, R., Elton, J., Carbot, K & García, T. (2016). Semillas del frijol: fuente líder de nutraceuticos para la salud humana. CyTA-J. Food 14: 131-137. doi: 10.1080/19476337.2015.1063548.
- Syngenta S.A., (s.f.). Mertec tiabemdazole. Ficha técnica Recuperado de: [https://www.syngenta.com.ec/sites/g/files/zhg486/f/ec\\_ficha\\_tecnica\\_mertec\\_t\\_20\\_s\\_mar17.pdf?token=1535986014](https://www.syngenta.com.ec/sites/g/files/zhg486/f/ec_ficha_tecnica_mertec_t_20_s_mar17.pdf?token=1535986014)
- Tecniagrícola. (2019). Benomyl 50. Ficha técnica. Recuperado de: <https://www.buscador.portalteconoagricola.com/vademecum/mex/producto/BENOMYL%2050>

- Tenesaca, A. (2010). Dosis letales invitro de cuatro fungicidas químicos en el control de la pudrición basal de la lechuga producida por *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary. Ing Agronomo. Universidad de Cuenca. 93. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3040/1/tag287.pdf>.
- Torres, M., Quevedo, I., Ortiz, C., Lagúnez, L., Nieto, D y Pérez, M. (2018). Control químico de *Moniliophthora roreri* en México. Revista de ciencias Biológicas y de la Salud, 21(2), 55-60.
- Trujillo, E., Valencia, C., Alegría, M., Honorata, A y Césare, E. (2020). Producción y caracterización química de biochar a partir de residuos orgánicos avícolas, Rev Soc Quím Perú, 85(4): 489-503.
- Tuz, I. (2018). Manejo integrado del cultivo de banano (*Musa x paradisiaca* L.) clon williams, usando biocarbón y microorganismos eficientes. Tesis. Ing agrónoma. UTEMACH. Machala-Ecuador. 71. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13263/1/DE00030\\_TRABAJODETITULACION.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/13263/1/DE00030_TRABAJODETITULACION.pdf).
- UTQ (Universidad Técnica de Quevedo). (2019). Biochar (carbón vegetal) como enmienda edáfica y sumidero de CO2 para optimizar la nutrición y bajar los costos de fertilización en cultivos. Recuperado de: [https://cidecuador.org/wp-content/uploads/congresos/2019/x-congreso-latinoamericano-de-agronomia/diapo/biochar-como-enmienda-edafica-y-sumidero-de-co2-para-optimizar-la-nutricion-y-bajar-costos-de-fertilizacion-en-los-cultivos\\_jose-quevedo.pdf](https://cidecuador.org/wp-content/uploads/congresos/2019/x-congreso-latinoamericano-de-agronomia/diapo/biochar-como-enmienda-edafica-y-sumidero-de-co2-para-optimizar-la-nutricion-y-bajar-costos-de-fertilizacion-en-los-cultivos_jose-quevedo.pdf)
- Valerin, M. (1996). Uso de fungicidas para el combate de las plantas. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H20-5054.pdf>.
- Valladares, C. (2010). Taxonomía y Botánica de los Cultivos de grano. Recuperado de: <https://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/unidad-ii-taxonoma-botanica-y-fisiologia-de-los-cultivos-de-grano-agosto-2010.pdf>.
- Vecstaudza, D; Grantina, L; Makarenkova, G; Kasparinskis, R; Selga, T; Steinberga, V y Muter, O. (2018). El impacto del biocarbón derivado de la madera en la supervivencia de *Trichoderma* spp. y crecimiento de *Secale cereale* L. en suelo arenoso. Ciencia y tecnología de biocontrol, 28 (4), 341–358. doi: 10.1080 / 09583157.2018.1450488.
- Vecstaudza, D; Senkovs, M; Nikolajeva, V; Kasparinskis, R y Muter, O. (2017). Biocarbón de madera como portador de aislamientos endofíticos. Rizosfera, 3, 126–127. doi:10.1016/j.rhisph.2017.04.002.
- Velázquez, J., Juárez, P., Anzaldo, J., Gelacio, A., Valdez, L., Alia, I., López, V., Pérez, A., Guillén, D. (2019). Concentración nutrimental de biocarbón de cascarilla de arroz. Rev. Fitotec. Mex, 42 (2): 129 – 136.
- Yaqub, F y Shahzad, S. (2006). Efecto de los fungicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. Pak. J. Bot, 38 (3): 881-883. [https://www.researchgate.net/publication/266609012\\_Effect\\_of\\_fungicides\\_on\\_in\\_vitro\\_growth\\_of\\_Sclerotium\\_rolfsii](https://www.researchgate.net/publication/266609012_Effect_of_fungicides_on_in_vitro_growth_of_Sclerotium_rolfsii).

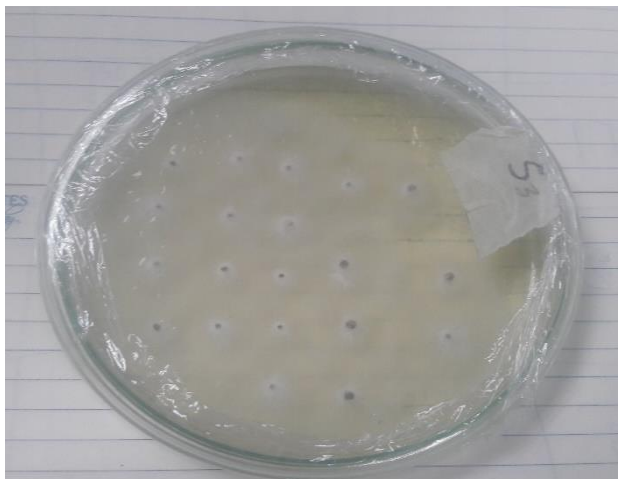


## **ANEXOS**

### Anexo 1. Preparación del medio de cultivo (PDA)



### Anexo 2. Aislamiento del patógeno



### Anexo 3. Fungicidas utilizados







Anexo 4. Biochar (macerado)

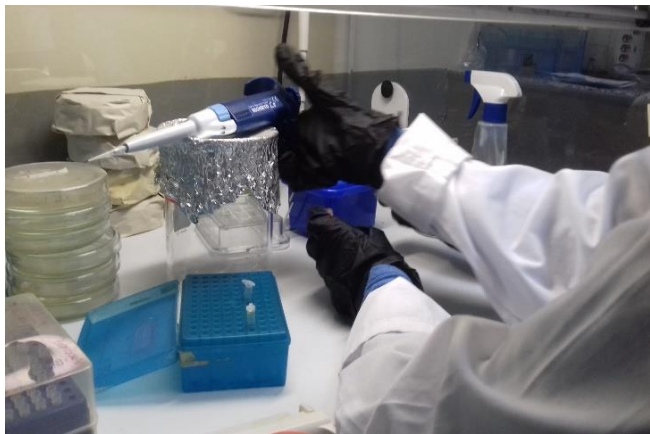


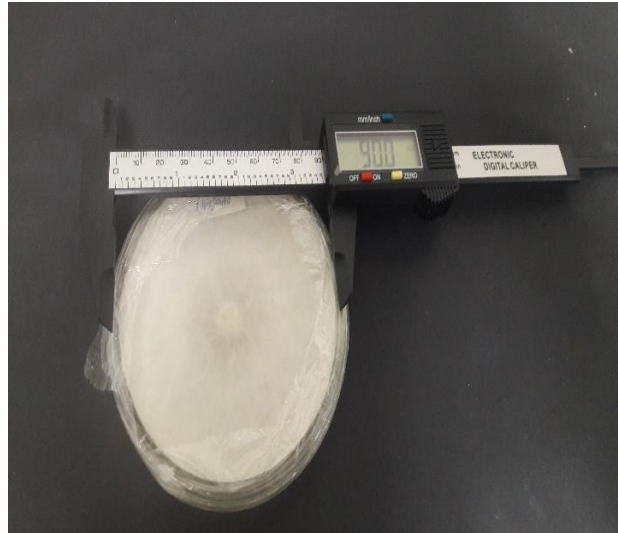
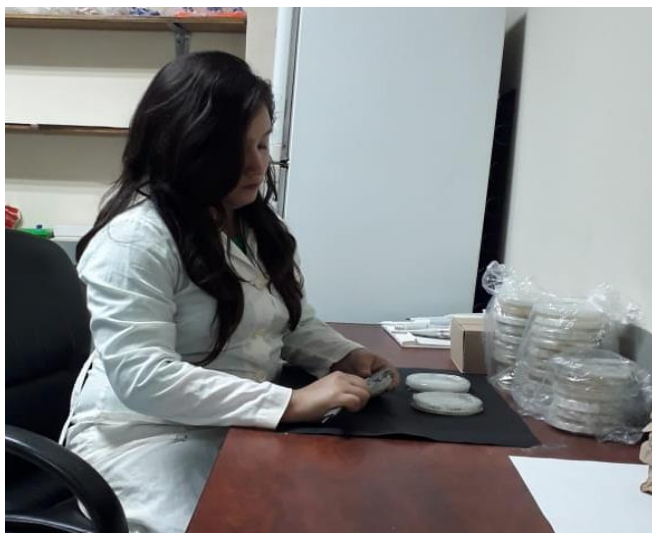
Anexo 5. Biochar (preparación)



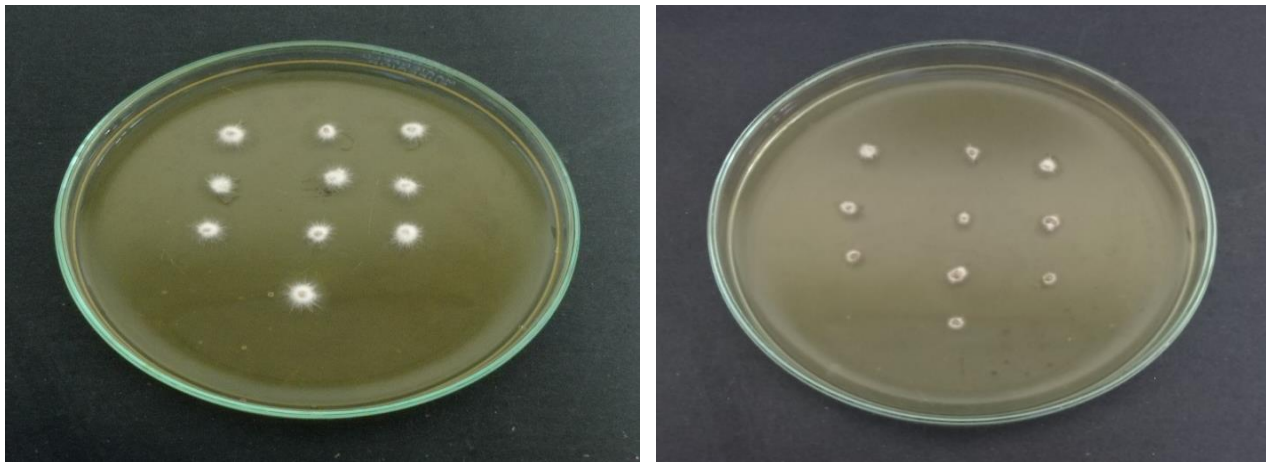
**Anexo 6. Refrescado de cepas****Anexo 7. Aplicación de fungicidas (sensibilidad)**



**Anexo 8. Aplicación de concentraciones (biochar)****Anexo 9. Aplicación combinada de fungicidas y biochar**

**Anexo 10. Conteo y siembra de esclerocios****Anexo 11. Toma de datos del crecimiento micelial**



**Anexo 12. Viabilidad****Anexo 13. Dosis utilizadas en el ensayo 2 (benzimidazoles)**

<b>CÓDIGO</b>	<b>CONCENTRACIÓN mg/L (ppm)</b>	<b>VOLUMEN EN 100ml</b>
DB	1	0,1 $\mu$ l
DM	10	1 $\mu$ l
DMA	100	10 $\mu$ l
DA	1000	100 $\mu$ l
Testigo	0	0