

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades

Para muchas enfermedades de las plantas los métodos tradicionales de control químico no son siempre económicos o efectivos implicando riesgos para la salud humana y para la seguridad del medio ambiente. Surge entonces el control biológico como una alternativa natural que involucra el uso de microorganismos benéficos tales como hongos, bacterias, nematodos y virus, que por diferentes mecanismos atacan y regulan los patógenos de las plantas y las enfermedades que ellos causan. El control biológico ofrece una alternativa amigable para el medio ambiente, la cual puede ser incorporada junto con métodos de control cultural y el uso limitado de químicos en un sistema de manejo integrado de enfermedades (Cristancho, 2003).

Las especies de la *Trichoderma sp*, han sido investigadas como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas por cerca de 70 años, pero es sólo reciente que las cepas han comenzado a ser comercialmente aprovechables. El éxito de las cepas de la *Trichoderma sp* como es debido su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción de crecimiento en plantas e inducción de mecanismo de defensa. Estas propiedades han hecho que *Trichoderma* se presente en cualquier hábitat en una alta producción (Benítez, 2004).

El éxito de las cepas de *Trichoderma* como agentes de control biológico se debe a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción del crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa. Las diferentes especies se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas, que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo (Intagri, 2016)

1.2. Biología de la *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* fue identificado en 1871 y ha sido ampliamente estudiado, se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos para su multiplicación.

Trichoderma es un hongo anaerobio facultativo. La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, después se torna a verde oscuro o amarillento, como consecuencia de una densa esporulación. *Trichoderma*, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas “conidias”. Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. Estos cuerpos especializados se caracterizan por poseer una gruesa pared exterior, constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) que protegen el interior del conidio (protoplasto).

Esta gruesa pared se diferencia de la pared celular de las células vegetativas del hongo (hifas y clamidosporas), las cuales son mucho más delgadas y no está formada por

capas constitutivas como las esporas. La ventaja del conidio de poseer una pared celular gruesa es la posibilidad de aislarlo de su medio natural y que sobreviva a condiciones adversas, manteniéndolo en dormancia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación (Sivila y Álvarez, 2013).

1.3. Habitación

La *Trichoderma sp.*, es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprofito o parasito, este hongo se caracteriza por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y puede estar en suelos con pH neutro ácido y también en ambientes acuáticos. Son muy diversos, pueden ser de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas y mico parásitos (Garnica y Esparza, 2016).

1.4. Clasificación Taxonómica

La *Trichoderma sp.* se encuentra clasificado según Alexopoulos et al., 1996 como:

Reino: *Fungi*

División: *Trichoderma sp*

Subdivisión: *Deuteromycotina*

Clase: *Hypomycetes*

Orden: *Hyphales*

Familia: *Monilaceae*

Género: *Trichoderma*

Especie: *Harzianum, hamatum, viride, longibranchiatum, entre otras.*

1.5. Características

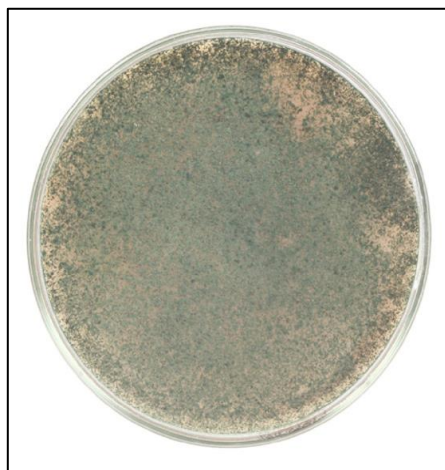
Macroscópicamente el hongo presenta un micelio blanco algodonoso, que se torna de color verde, debido a la rápida y abundante esporulación. Es un hongo que posee conidias hialinas, uniceluladas y ovoides, que tienden a agregarse formando masas; presenta un conidióforo hialino, largo y no verticilado. Tiene la capacidad de producir clamidosporas que son globosas o subglobosas, ubicadas en la parte terminal o intermedia de las hifas y miden menos de 15 μm de diámetro; éstas son estructuras de resistencia, vitales e importantes para la sobrevivencia del hongo bajo condiciones adversas (Castro y Rivillas, 2012).

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración blancas- verdes- amarillas- verdosas; las áreas con conidios se presentan con anillos concéntricos. Al revés de las colonias usualmente no coloreado, amarillo, ámbar o amarillo verde (Chávez 2006).

Aspecto in vitro y crecimiento de *Trichoderma sp.*, Ocho días después de sembrado en el medio de cultivo PDA (Castro y Rivillas, 2012).

Figura N°1.

Crecimiento de *Trichoderma sp.*



1.6. Factores que influyen en el crecimiento

1.6.1 Temperatura

La temperatura es un factor importante para determinar la cantidad y la tasa de crecimiento de estos organismos.

Varios estudios han demostrado el efecto de la temperatura en la germinación de las esporas y el crecimiento del tubo germinal, crecimiento del micelio, habilidades competitivas y producción del metabolismo volátiles en la especie *Trichoderma sp.* Estableciendo que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre las diferentes especies, sin embargo, al igual que la gran mayoría de los hongos y éstos se desarrollan en rangos de temperatura mesófilas entre 10° y 40° C, pero en la mayoría de los casos la temperatura óptima se encuentra entre 15° y 30° C.

La temperatura ayuda al desarrollo de procesos biológicos tal que puede generar de naturación de proteínas, inhibición de enzimas, y promoción o supresión de la producción de un metabolito particular, viabilidad y muerte celular (Ayarde, 2017).

1.6.2. Disponibilidad de agua

Un factor que puede afectar la densidad de población de especies de *Trichoderma sp.* en el suelo es la humedad; en este sentido se reportan altas poblaciones en suelo húmedos, comparados con los suelos secos (Wakelin, 1999) citado en (Michel 2001).

Las condiciones de agua afectan las actividades de este hongo, en especial la germinación de las esporas y el crecimiento del tubo germinal, así como el crecimiento del micelio y tiene un efecto crítico en la interacción con otros hongos y la producción de enzimas. Este hongo crece mejor en condiciones moderadas que en altas, lo cual es debido a que la aireación del suelo y por ende el suministro de oxígeno es limitado cuando el contenido de humedad es alto.

Los hongos prefieren una humedad suficiente para su supervivencia de tal manera que esta no interfiera con su metabolismo. Del mismo modo un nivel de humedad menor que el óptimo lleva a una mayor tensión de agua y reduce la solubilidad de los nutrientes del sustrato sólido. Aunque el contenido de humedad es un factor crítico durante este proceso el nivel óptimo de la misma depende del microorganismo y de la matriz sólida empleada, sin embargo, el contenido de agua en el sustrato por lo general oscila entre 30 y 75% (Muiño, 1994).

1.6.3. pH

El pH juega un papel importante en la regularización de la producción de enzimas extracelulares, la mayoría de las cepas de *Trichoderma sp* tiene la habilidad de crecer en un rango de pH que fluctúa entre 5,5 y 7,5, con un óptimo de 6,6. Si se encuentra en medios con pH alcalinos (por encima de 7,0) tiene la capacidad de acidificar el medio mediante la liberación de ácidos orgánicos (Castro y Rivillas, 2012).

1.6.4. Aireación

Dos componentes del aire son esenciales para los hongos: el oxígeno y el dióxido de carbono. Las especies de *Trichoderma sp*, como anaeróbicos facultativos, tienen la habilidad para crecer en hábitats como suelos profundos donde el oxígeno es relativamente insuficiente. Sin embargo, en los cultivos de estos organismos es necesario tener en cuenta que altas concentraciones de dióxido de carbono resultado de la respiración celular se pueden acumular en ambientes cerrados y de esta forma inhibir el crecimiento de este microorganismo, los hongos usualmente son inhibidos en concentraciones de dióxido de carbono mayores de 10 a 15% (Romero, Huerta, Damián, Domínguez y Arellano, 2009).

1.7. Colonización de *Trichoderma sp.* en raíces

El género *Trichoderma* está en el ambiente y especialmente en el suelo. Además, posee un rápido crecimiento y desarrollo, puede proliferar en una amplia gama de suelos, es tolerante a condiciones ambientales extremas, puede tolerar altas concentraciones de agroquímicos y es capaz de parasitar, controlar y destruir hongos, nematodos y otros fitopatógenos es por estas propiedades que se le considera uno de los principales agentes para el control biológico en diferentes sistemas de producción (Villegas, 2005).

1.8. Defensa en plantas

Estudios recientes revelan a niveles celular y molecular explican la diversidad de vías y mecanismos de la acción de este hongo, según este autor se descubrió que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa de la planta conocido como inducción a la resistencia sistémica, esto supone que pueden controlar

a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista. Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por la *Trichoderma* en la rizosfera y estar relacionados por la resistencia sistemática en las plantas (Martínez, Infante y Reyes, 2013).

La colonización de la raíz por *Trichoderma* ejerce un efecto multifuncional en la biología de los cultivos como el maíz, el jitomate y la soya, por mencionar algunos. Por ejemplo, se incrementan las defensas y las plantas se hacen más resistentes a las enfermedades causadas por hongos y bacterias. Este fenómeno puede ser ocasionado por la inducción de compuestos químicos llamados fitoalexinas, los cuales se acumulan en altas concentraciones en la planta y ayudan a limitar la dispersión del patógeno o por la activación de rutas de señalización implicadas en defensa como la del ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno (Garnica y Esparza, 2016).

1.9. Mecanismos de Acción

Las diferentes especies de *Trichoderma* ejercen mecanismos de control mediante: competencia de espacio y nutrientes, producción de metabolitos antibiosis, la inactivación de enzimas del agente patógeno, modificación de las condiciones ambientales, producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y por micoparasitismo. A continuación, se describen los tres principales:

1.9.1. Competencia

La competencia por espacio y nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos clásicos de biocontrol de este género. Tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizósfera. Por otra

parte, tiene una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, siendo muy versátil para utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que permite colonizar un medio rápidamente, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat. La *Trichoderma sp.* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Intagri, 2016).

1.9.2. Antibiosis

Los metabolitos con actividad fúngica secretados por la *Trichoderma sp.* constituyen una capacidad muy importante en producir estos compuestos volátiles y no volátiles muy diversos en cuanto estructura y función. Muchas de las cepas de *Trichoderma sp.* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros organismos, con los que se establecen un contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas antibióticos.

Se identificaron compuestos segregados por *Trichoderma sp.* del tipo de las alquilpironas (6- α -pencil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichoianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina). La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos anti fúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos, aspecto relevante desde el punto de vista práctico. Estos resultados ejemplifican la importancia de la antibiosis como parte de la actividad antagonista de este hongo (Martínez et al., 2013).

1.9.3. Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados.

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del Fito patógeno. El micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma sp.* ha sido ampliamente estudiado. No obstante, existen aspectos en el mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales (Infante, Martínez, Gonzales y Reyes, 2009).

1.9.3.1.- Crecimiento quimiotrófico

El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (27). En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico (Infante et al., 2009).

2.10. Ventajas de la Trichoderma

- Posee un amplio rango de acción. Se propaga en el suelo, ejerciendo un control duradero tiene un marcado efecto preventivo de enfermedades de la raíz y el follaje.
- Protege las semillas agrícolas y botánicas de fitopatógenos.
- Controla patógenos de la raíz y el follaje (*Botrytis* y *Mildiu*) antes que puedan ser los destacados y evita el ataque de (*Phytophthora*).
- Disminuye o elimina la dependencia de pesticidas químicos y actúa como biodegradante de agrotóxicos.
- Promueve el crecimiento de raíces y pelos absorbentes, moviliza nutrientes en el suelo para las plantas, mejorando la nutrición y la absorción de agua.
- Es compatible con micorrizas, azobacter, otros biofertilizantes y con bioagentes controladores de plagas y enfermedades.
- Acelera la descomposición de la materia orgánica, puede ser empleado en el proceso de compostaje donde también cumple funciones de biofungicida.
- Estimula el crecimiento de los cultivos al producir metabolitos que promueven los procesos del desarrollo en las plantas.
- Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagónicos (Yedida, 1999)

1.11. *Alternaría sp.*

La *Alternaría sp.* es un hongo ascomiceto esto es, del filo de las Ascomycotas. Las diferentes especies de este género son uno de los mayores patógenos de plantas. Hay cuarenta y cuatro especies conocidas, pero puede haber cientos de ellas aún por descubrir. Son una especie omnipresente en el ambiente y parte fundamental en la flora de hongos en cualquier sitio. Son agentes activos en la descomposición. Al menos el 20% de las pérdidas de la agricultura, están causadas por alguna especie de la *Alternaría sp* (Rivas, 2014).

1.11.1. Condiciones

La *Alternaría sp.* se expande mediante los conidios, tejido hospedero del hongo, desde donde son capaces de diseminarse mediante el agua y el aire. El entorno, climático, adecuado para la reproducción de *Alternaría sp* es de 27°C de temperatura, por su parte, otros elementos del hongo, las conidias y conidióforos requieren de una temperatura óptima entre 19° a 23°C para su desarrollo. La colonia del hongo es de color marrón gris a negro (Ecured, 2015).

1.11.2. Síntomas

La *Alternaría sp.* suele ser mortal cuando ataca a las plantas recién germinadas, un riesgo excesivo los primeros días de vida de la misma planta, lo que provocará un estrechamiento y oscurecimiento del tallo, haciéndose blanco y muy frágil hasta este momento. Por lo que interrumpirá la llegada de la comida desde las raíces hasta las partes altas de la planta, causándole la muerte. El hongo en sí no se puede apreciar, sino las consecuencias de la infección, que son manchas secas, más o menos redondas de

forma irregular, teniendo en el centro una parte marrón con varios anillos oscuros de células muertas y un margen amarillo. El tallo se vuelve de color marrón

Las manchas necróticas pueden ser de 1 a 2mm de diámetro en las hojas basales (a ras de suelo). La mancha puede expandirse hasta los 2 cm de diámetro, y pueden unirse y formar áreas muy grandes que abarcan gran parte de los folíolos. Cuando esto sucede, el fenómeno se le llama defoliación y muerte temprana de la planta. En tallos y peciolo se producen lesiones negras alargadas observándose a veces anillos concéntricos. (Ecured, 2015).

1.12. *Fusarium sp.*

Es un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprófitas y son unos miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo. Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si éstas entran en la cadena alimentaria. Las principales toxinas producidas por estas especies de *Fusarium* son fumonisinas, tricotecenos y zearalenona.

Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología. Algunas especies son Fitopatógenas causando la enfermedad conocida como fusariosis (Tapia y Amaro,2014).

1.12.1. Condiciones

Es un hongo de temperaturas cálidas el desarrollo óptimo se presenta a 20° C el rango va de 12 a 18 ° C. Esta temperatura con alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio. Las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o nematodos como es el caso de *Melodogyne incognita* aumentan la susceptibilidad al marchitamiento y favorece al desarrollo del hongo (Gonzales, 2006).

1.12.2. Síntomas

Lo primero que se observa a campo es un amarillamiento en las hojas basales posteriormente se marchitan se secan, pero permanecen adheridas a la planta. Esta sintomatología va progresando hacia la parte superior de la planta a veces sólo toma un sector de la misma. Al comienzo las plantas muestran marchites en las horas más calurosas del día recuperándose al final del mismo, pero finalmente se marchitan y mueren. Las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón (Gonzales, 2006).

1.13. *Botrytis sp.*

Es un hongo fitopatógeno importante que infecta una amplia variedad de plantas y que puede hacer uso de diferentes mecanismos de infección. Aunque se ha observado cierta variabilidad genética en algunas especies en cuanto a su resistencia, en ningún caso se ha encontrado una relación gen a gen. El desarrollo de genotipos resistentes resulta, por lo tanto, complicado. Cualquier intento de control de la enfermedad exige un

conocimiento detallado tanto de los mecanismos de infección del hongo como de los mecanismos de defensa de la planta. La aplicación de distintas aproximaciones experimentales está permitiendo analizar en detalle el proceso de infección del patógeno sobre distintos huéspedes, describir los elementos que participan en cada fase del mismo e identificar aquellos factores de patogenicidad que son esenciales para que tenga lugar el establecimiento de la interacción. La caracterización de estos últimos proporcionará información acerca de elementos clave sobre los que intervenir con el objeto de desarrollar estrategias de control duraderas, efectivas y respetuosas con el medio ambiente (Benito, Arranz y Eslava, 2000).

1.13.1. Condiciones

Para desarrollar su ciclo requiere temperaturas de 18-23°C. La enfermedad es más abundante cuando prevalece alta humedad y los cultivos son más susceptibles durante la floración y madurez de los frutos (Guerrero, 2012).

1.13.2. Síntomas

En las hojas de las plantas se observan manchas localizadas, que se prolongan a lo largo de las nervaduras, con presencia de esporulación característica. Los tallos presentan lesiones, las cuales los hacen de consistencia quebradiza.

En flores y frutos, el hongo penetra por heridas más fácilmente y promueve una esporulación grisácea, tipo felpa, que permanece en presencia de alta humedad. Se han observado ataques severos en etapa de plántulas, cuando se producen en forma masiva dentro de invernadero donde el hongo tiene todas las condiciones climáticas necesarias para su desarrollo y puede llegar a eliminar estas plantas (Guerrero, 2012).

1.14. *Rhizoctonia* sp.

Rhizoctonia es un hongo transmitido por el suelo que se encuentra de forma natural en el suelo de los campos agrícolas, jardines, etc. Produce esclerocio, una estructura de consistencia dura y de color marrón oscuro que le permite sobrevivir en el suelo o infectar tejido vegetal por años. Con una amplia variedad de huéspedes, *Rhizoctonia* puede provocar una variedad de enfermedades, como la pudrición del tallo, la pudrición de la raíz, mildiú de las plántulas y roya de las hojas.

Por lo general, es la causa de pudrición en los esquejes, especialmente los que se colocan bajo vaporización. La especie más común que infecta a las plantas es *Rhizoctonia* sp. Aunque hay otras especies conocidas por causar enfermedades de las plantas, no todas las especies de *Rhizoctonia* son agentes patógenos de las plantas (Lawson, 2018).

1.14.1. Condiciones

Las temperaturas altas de 12 a 32 °C favorecen la proliferación de *Rhizoctonia*, por lo que es más problemático al final de la primavera y el verano. *Rhizoctonia* no necesita agua libre para su ciclo de vida, prefiere una humedad más moderada y pareja en el sustrato, no condiciones húmedas y saturadas. Debido a que tiende a vivir cerca de la superficie del sustrato, prefiere la humedad alta, al igual que todos los agentes patógenos fúngicos. Cuando la humedad es alta, se pueden apreciar redes de color marrón en las zonas afectadas de la planta. La vaporización frecuente, el espacio cerrado de las plantas, hojas y tallos húmedos y la falta de flujo de aire, todo esto favorece el desarrollo de *Rhizoctonia*. Por lo tanto, es un problema común con los esquejes y las plantas jóvenes. La susceptibilidad de la planta aumenta mayormente si

hay heridas abiertas en partes de la planta cerca del nivel del sustrato. Estas heridas sirven como puntos de acceso para *Rhizoctonia* (Lago, 2016).

1.14.1. Síntomas

El patógeno *Rhizoctonia* crece junto a la superficie superior del sustrato, así que comúnmente ataca el tallo de la planta en el nivel del suelo. Por lo general, los tallos se descomponen rápidamente, comienza con la formación de lesiones marrones y marrones rojizas que aumentan, lo que produce canchales hundidos cerca del nivel del suelo.

Los tallos infectados tienen una apariencia seca, marchita, "tiesa". Los canchales aumentan y rodean el tallo, lo que limita el movimiento de agua y nutrientes hacia la planta y causa la defoliación prematura, especialmente durante el calor del día, y posible deficiencia de nutrientes (Lago, 2016).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del Ensayo

El presente trabajo de investigación se realizó previamente en las instalaciones del Centro Experimental de Chocloca (CECH) donde se recolectaron las muestras del suelo contaminado, posteriormente el trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho.

2.2. Localización

- Localización del lugar de muestreo del suelo contaminado se la realizará en los suelos del centro experimental de Chocloca, la comunidad de Chocloca está ubicada en la primera sección de la provincia Avilés del departamento de Tarija distante a 36 Km de la ciudad de Tarija.

Imagen N°2. Imagen satelital del Centro Experimental de Chocloca C.E.CH.

(Google, Earth)



Cuadro N°1: Ubicación y condiciones meteorológicas (Senamhi)

Latitud sud	21°45`
Longitud	64°44`
Altitud m.s.n.m.	1800 m.s.n.m.
Temp. Max.	27°C
Temp. Min.	9,4°C
Mp. Max. Externa.	41,0°C
Temp. Min interna	-12,0°C
Temp. Media	17.9° C
Humedad Relativa	55%

- La localización del laboratorio donde se realizó el trabajo de investigación es el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo In-Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho ubicado en la ciudad de Tarija en latitud: 21°32`34`` S. y 64°43`17`` W.

2.3. Características del área de estudio

El presente trabajo del lugar de muestreo del suelo tiene una temperatura máx. de 27°C y una temperatura min. de 9,4°C y una humedad relativa del 55%.

Los suelos de esta zona son casi en su totalidad de origen aluvial, variando la textura de moderadamente liviana a mediana y pesada, de moderadamente profunda.

Entre la flora y fauna nativa más importante tenemos la siguiente; *Shinus molle* L., *Salis humboldtiana* W., *Acacia caven* M., *Prosopis alapatco* P. y *Geoffiraea decortcans* G. estas son las especies arbóreas y entre arbustivas podemos mencionar *Cestrum parquii* L'Her. y *Baccharis capitalensis* Heering; y las gramíneas las siguientes *Cenchrus* L. y *Cynodon dactylum* (L) Pers. Y la fauna son los roedores como por ejemplo ratones de campo liebres, etc.

2.4. Materiales

2.4.1. Materiales de Estudio

En el trabajo de investigación se tomó en cuenta como principal material a estudiar el hongo *Trichoderma* sp. y la capacidad anti fúngica frente a otros hongos Fito patógenos que son los siguientes:

- *Alternaria* sp
- *Botrytis* sp.
- *Fusarium* sp.
- *Rhizoctonia* sp.

2.4.2. Materiales de Campo

- Pala
- Azadón
- Barreno
- Saca bocado

- Etiquetas
- Bolsas separadoras
- Pequeñas cucharas

2.4.3. Materiales de escritorio

- Libreta de campo
- Cámara Fotográfica
- Marcadores
- Etiquetas
- Calculadora

2.4.4. Materiales de Laboratorio

- Bata blanca
- Guantes
- barbijo
- Cajas Petri de vidrio
- Pipetas
- Piceta con agua
- Espátulas
- Mecheros
- Papel aluminio
- Sacabocado de 1/8

2.4.5. Equipo

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Autoclave
- Balanza
- Microondas
- Microscopio
- Horno de esterilización
- Refrigerador

2.4.6. Productos químicos

- Alcohol
- Agua destilada
- Medio de cultivo Agar de Dextrosa y Papa (PDA)

2.5. Metodología

La metodología de investigación que se utilizó es la investigación experimental y análisis estadístico, se realizara 9 repeticiones por cada tratamiento y sus respectivos testigos, las variables que se evaluaron fueron el crecimiento radial del hongo y el porcentaje de inhibición del antagonismo.

2.5.1. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 9 repeticiones de acuerdo al siguiente orden.

2.5.2. Tratamientos en estudio

1. *Trichoderma sp.* + *Alternaría sp.*
2. *Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*
3. *Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*
4. *Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*

Cuadro N°2 Cuadro de Tratamientos en Estudio

Tratamientos	Códigos	Descripción de los tratamientos
T1	T1TA	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Alternaría sp.</i>
T2	T2TB	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Botrytis sp.</i>
T3	T3TF	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Fusarium sp.</i>
T4	T4TR	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Rhizoctonia sp.</i>

2.5.3. Descripción de los Tratamientos

Cuadro N°3 Cuadro de Descripción de Tratamientos

Hongo Antagonista	Hongos Fitopatogenos	Tratamientos	Repeticiones	Unidades experimentales	Composición de las unidades experimentales
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	T1	9	36	Estará compuesta por un total de 36 cajas Petri
	<i>Botrytis sp.</i>	T2			
	<i>Fusarium sp.</i>	T3			
	<i>Rhizoctonia sp.</i>	T4			

2.5.4. Variables

- ❖ Crecimiento radial del micelio del hongo antagonista a 1, 3, 5, 7 y 10 días
- ❖ Crecimiento radial de los hongos Fito patógenos a 1, 3, 5, 7 y 10 días.
- ❖ Porcentaje del antagonismo de la *Trichoderma sp.* frente a los diferentes hongos Fito patógenos a 1, 3, 5, 7 y 10 días.

2.6. Procedimiento Experimental

2.6.1. Metodología de muestreo

Para el muestreo del suelo se tomó en cuenta los terrenos del centro experimental de Chocloca conformado por parcelas, de donde se tomaron muestras de suelo al azar.

2.6.2. Muestreo del suelo

Para tomar el muestreo se tomó en cuenta cuadrantes, dentro de los cuales se realizó el muestreo, utilizando un barreno a 15 cm del suelo obteniendo las sub-muestras y el método fue al azar, de forma sistemático con diseño de cuadrícula.

Todas las muestras fueron en bolsas de plástico con sus respectivas etiquetas, éstas fueron transportadas y procesadas el mismo día en el laboratorio para lo cual cada muestra fue tamizada se utilizó un tamiz de 2mm. Posteriormente se llevaron a cabo los procesos de aislamientos.

2.7. Metodología del Laboratorio

2.7.1. Medio del Cultivo

Para el aislamiento e identificación del hongo *Trichoderma sp* se utilizó el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. los hongos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio.

Con los mismos ingredientes, excluyendo el agar, se obtiene el medio líquido de Papa Dextrosa (PD), muy utilizado para la preparación del inóculo en forma masiva.

- Papa sin pelar 200 g
- Dextrosa 10 g
- Agar 18 g
- Agua destilada 1 litro

Se lavaron y cortaron las papas posteriormente se las hizo hervir en un litro de agua destilada por 20 minutos, se realizó la colación y disolución en el líquido dextrosa y el agar. Se esterilizó en la autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Para la preparación del medio de cultivo se utilizó 18,5 gr de agar papa dextrosa (PDA), diluido en 500ml de agua destilada. Este medio de cultivo tiene que estar esterilizado, por lo que utilizaremos la autoclave donde lo dejaremos durante aproximadamente 30 min. a 120° C.

2.7.2. Método de aislamiento

- **Método dilución de la placa**

Este método se llevó a cabo realizando diluciones de cada muestra de suelo obtenida. se pesó 10gr. de suelo fresco dentro de un frasco, con 50ml de agua destilada posteriormente se procedió a agitarlas por 10min. para lograr una buena dilución y mezcla, se dejó reposar y esperar a que el suelo se sedimente en la parte baja del frasco y a su vez se suspendió en el agua estéril por 24 horas.

La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada con alcohol para que no exista contaminación, de igual manera se realizó con todos los materiales de laboratorio deben estar correctamente esterilizados para su uso.

Teniendo todo el material dentro de la cámara se realizó primeramente la preparación de las cajas Petri vertiendo 10 ml del medio de cultivo (PDA) por caja y posteriormente se realizó la siembra masiva del suelo ya diluido.

Una vez hecho esto se llevó las muestras a incubar por un periodo de 3 a 7 días a 25°C durante este tiempo se podrá observar el crecimiento de diferentes colonias de hongos y bacterias, dentro de las cuales se observó e identificó el crecimiento del hongo *Trichoderma sp.* con sus características microscópicas y macroscópicas. Posteriormente se llevaron las muestras a incubar durante 3 a 7 días a 26°C para observar el crecimiento de las colonias de hongos.

Así es como se realizó la identificación y obtención del Hongo *Trichoderma sp.* para el siguiente trabajo cabe recalcar que este hongo ya está presente en el Laboratorio de Fitopatología y Cultivo In vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la U.A.J.M.S.

2.7.3. Aislamiento de hongos Fito patógenos

Ahora bien, de acuerdo al protocolo aplicado por Jiménez (2008), primeramente, se recolectaron las muestras de material vegetal contaminado con los fitopatógenos en estudio que muestren síntomas o signos de la presencia de *Botrytis sp*, *Alternaría sp*, *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.*

Luego las muestras vegetales fueron colocadas en fundas plásticas y transportadas al laboratorio. El material muestreado se colocó en las cámaras húmedas durante el tiempo necesario (3 a 5 días) para propiciar esporulación del hongo. El material se incubó a temperatura de laboratorio.

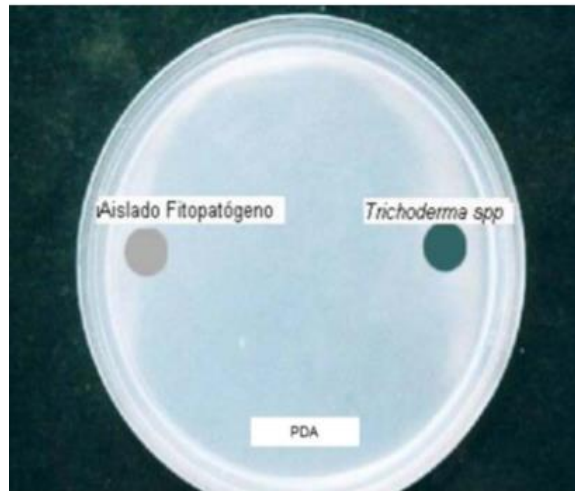
Después que el hongo esporuló se procedió a realizar su aislamiento. Utilizando un asa de transferencia se realizó un barrido sobre las estructuras de fructificación inoculándose los propágulos en cajas Petri con medio PDA y con medio agar agua (AA).

Las cajas fueron incubadas a 26°C Luego de obtener las colonias de *Botrytis sp*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp*. y *Rhizoctonia sp.*; los hongos purificados y luego conservados en cajas Petri con PDA, material experimental fue almacenado en un refrigerador.

2.7.4. Metodología de evaluación

Se utilizó el método del cultivo dual que consiste en un enfrentamiento equitativo del hongo patógeno y el hongo antagonista. En una caja Petri de 90 × 15 mm con medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) en un extremo a 5 mm desde la orilla se colocó un disco (del sacabocado) de 8 mm de diámetro del micelio del hongo patógeno y en el otro extremo un disco (del sacabocado) de 8 mm del micelio del antagonista, existiendo una distancia entre hongos (Reyes et al. 2007).

Figura N°3. Enfrentamiento del hongo patógeno y antagonista mediante el método del cultivo dual (Jaramillo, 2014).



2.7.5. Evaluación del antagonismo

Para evaluar la capacidad antagónica del hongo *Trichoderma sp.*, se valoraron los siguientes parámetros de 1, 3, 5, 7 y 10 días después de la siembra puntual:

Crecimiento por áreas de invasión (cm), medición del Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), comparación del crecimiento radial de *Trichoderma sp* + *Alternaría sp.*; *Trichoderma sp* + *Fusarium sp.*; *Trichoderma sp* + *Botrytis sp.*; *Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*; se tomaron los datos correspondientes de cada una de las muestras planteadas en el diseño experimental.

La medición para el crecimiento radial del hongo se realizó con una regla de cada 1, 3, 5, 7 y 10 días después de la siembra puntual, respectivamente estos datos se aplicó la fórmula de Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) del antagonismo para cada tratamiento.

a) Método Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Para la obtención del PICR se utilizó la fórmula

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

(Ezziyyani et al. 2005)

Donde:

R1= es el radio del patógeno testigo

R2= es el radio del patógeno

b) Comparación del crecimiento de los patógenos enfrentados de la *Trichoderma sp.*, con los testigos de los patógenos

Se midió el radio de crecimiento de los hongos patógenos y antagonistas; y también de los testigos para realizar la respectiva comparación 1, 3, 5, 7 y 10 días después de la siembra puntual.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación del crecimiento radial (cm) del hongo antagonista frente a los hongos patógenos

Del cultivo previo realizado el cual contaba con 9 repeticiones y 4 tratamientos siendo en total 36 muestras con sus respectivos testigos de cada patógeno; como resultado se obtuvieron estos diferentes resultados que a continuación detallaremos en los siguientes cuadros y gráficas.

3.2. Evaluación del Primer Día

En el primer día no mostró crecimiento radial en el cultivo dual de enfrentamiento hongo antagonista y hongo patógeno en ninguno de los tratamientos establecidos para poder realizar mediciones y tabular los respectivos datos.

3.3. Evaluación del Tercer Día

En el tercer día se observó un leve crecimiento radial en comparación del primer día, en todos los hongos Fito patógenos y el hongo antagonista.

Cuadro N°4 Análisis del porcentaje de Inhibición al tercer día

DÍA 3					
Réplicas	TRATAMIENTOS				Σ
	T1TA	T2TB	T3TF	T4TR	
1	33,33	4,34	20	12,5	70,17
2	27,77	17,39	20	25	90,16
3	44,44	73,91	20	12,5	150,85
4	22,22	56,52	20	0	98,74
5	22,22	60,86	20	37,5	140,58
6	16,66	60,86	0	37,5	115,02
7	33,33	73,91	0	25	132,24
8	16,66	73,91	20	12,5	123,07
9	22,22	73,91	0	12,5	108,63
Σ	238,85	495,61	120	175	
x	26,54	55,07	13,33	19,44	

Las mediciones obtenidas fueron transformadas a través de la fórmula de P.I.C.R. y dieron los siguientes resultados representados en el siguiente cuadro; donde se muestra que el Tratamiento *Trichoderma sp.*+ *Alternaria sp.* presenta un 26.54% de inhibición, el Tratamiento *Trichoderma sp.*+*Botrytis sp.* presenta un 55.07% de inhibición, el Tratamiento *Trichoderma sp.*+*Fusarium sp.* presenta un 13.33% de inhibición y el el Tratamiento *Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.* presenta un 19.44% de inhibición.

3.3.1. Análisis de varianza

Cuadro N°5 cuadro ANOVA

Fuente de varianza	g.l.	SC	CM	FC	F _t	
					5%	1%
Total	35	17427,4				
tratamientos	3	9195,2	3065,1	11,9**	2,96	4,60
error	32	8232,3	257,3			

El cuadro ANOVA nos refleja que los tratamientos si existen diferencias estadísticamente significativas al 5% y al 1% de probabilidad de error en relación a la F calculada, como consecuencia nos dice que los tratamientos son distintos entre sí.

3.3.2. Prueba de medias

Cuadro N°6 media de diferencia significativa de % de inhibición

TUKEY=18.66	55,07	26,54	19,44	13,33
13,33	**	NS	NS	0
19,44	**	NS	0	
26,54	**	0		
55,07	0			

3.3.3 Diferencia de medias de los tratamientos

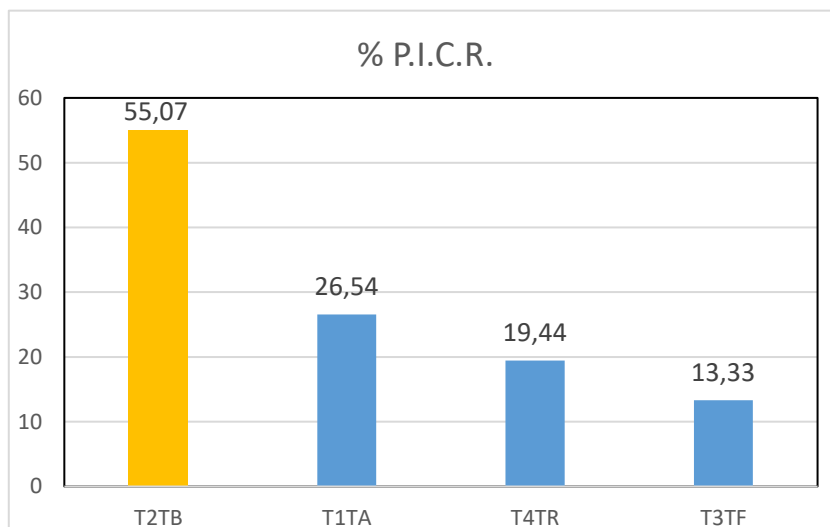
Cuadro N°7 diferencia de medias de tratamientos %de inhibición

Trat.	descripción	%	rango
T2TB	<i>Trichoderma sp. + Botrytis sp.</i>	55,07	a
T1TA	<i>Trichoderma sp. + Alternaria sp.</i>	26,54	b
T4TR	<i>Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.</i>	19,44	b
T3TF	<i>Trichoderma sp. + Fusarium sp.</i>	13,33	b

Los tratamientos T1TA, T4TR y T3TF no refleja una diferencia estadística porcentual alta entre sí, mientras que en comparación con el tratamiento T2TB donde existe un 55,07% de inhibición, que es estadísticamente diferente a los demás tratamientos, existiendo un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento.

3.3.4 Análisis del Porcentaje Inhibición del Crecimiento Radial

Gráfico N°1 gráfico de % de inhibición a los 3 días



En el siguiente gráfico observamos como mejor resultado en el tercer día es el segundo tratamiento T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) que presenta un 55,07% de inhibición de crecimiento en comparación con los demás tratamientos mostrando T1TA (*Trichoderma sp.*+ *Alternaria sp.*) un 26.54%, el T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) un 19.44% y el T3TF (*Trichoderma sp.*+ *Fusarium sp.*) un 13.33% de inhibición.

Estudios realizados por Ricaldi (2013), sostiene que el crecimiento de *Botrytis cinérea* en cultivo in vitro frente al antagonista *Trichoderma harzianum* presenta un porcentaje de inhibición al 31.25% al tercer día de evaluación en su trabajo, lo cual nos indica que los resultados obtenidos en el presente trabajo son mejores al tercer día en la inhibición del crecimiento de *Botrytis sp.* frente a *Trichoderma sp.*

Teniendo en cuenta a Infante et al., (2009), mecanismos de acción de *Trichoderma*; la principal acción es el micoparasitismo teniendo acción directa frente al hongo patógeno; es una simbiosis antagónica donde se implican enzimas extracelulares como quitinasas y celulasas, tiene un crecimiento quimiotrópicamente hacia el patógeno enrollándose en sus hifas y degradando la pared celular.

3.4. Evaluación del Quinto Día

En el quinto día se mostró un mayor crecimiento radial en comparación del tercer día, en todos los hongos Fito patógenos y el hongo antagonista.

Cuadro N°8 Análisis del porcentaje de Inhibición al quinto día

Día 5					
Réplicas	TRATAMIENTOS				
	T1TA	T2TB	T3TF	T4TR	Σ
1	52	47,61	20	20	139,61
2	36	54,76	20	13,33	124,09
3	36	85,71	13,33	0	135,04
4	32	76,19	33,33	6,66	148,18
5	44	66,66	46,66	46,66	203,98
6	36	69,04	46,66	26,66	178,36
7	40	83,33	6,66	26,66	156,65
8	24	85,71	26,66	0	136,37
9	28	83,33	0	6,66	117,99
Σ	328	652,34	213,3	146,63	
x	36,44	72,48	23,70	16,29	

Las mediciones obtenidas fueron transformadas a través de la fórmula de P.I.C.R. y dieron los siguientes resultados representados en el siguiente cuadro; el T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) un 72,48%, el T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaria sp.*) un 36,44%, el T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*) un 23,7% y el T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) un 16,29%.

3.4.1 Análisis de varianza

Cuadro N°9 cuadro ANOVA

Fuente de varianza	gl	SC	CM	FC	F TABULADA	
					5%	1%
Total	35	22937,74	****	****	****	****
tratamientos	3	16783,06	5594,35	29,08	2,96	4,6
error	24	6154,67	192,33	****	***	***

El cuadro ANOVA nos determina que los tratamientos si existen diferencias estadísticamente altamente significativas al 5% y al 1% de probabilidad de error en relación a la F calculada, como consecuencia nos dice que los tratamientos son distintos entre sí.

3.4.2. Prueba de medias

Cuadro N°10 media de diferencia significativa de % de inhibición

TUKEY=18.53	72.48	36.44	23.7	16.29
16.29	*	*	NS	0
23.7	*	NS	0	
36.44	*	0		
72.48	0			

3.4.3 Diferencia de medias de los tratamientos

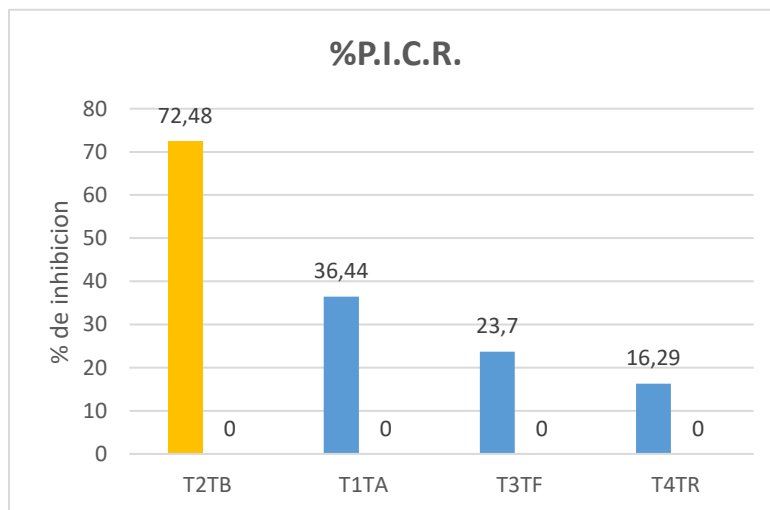
Cuadro N°11 diferencia de medias de tratamientos %de inhibición

Trat.	descripción	% P.I.C.R.	ran go
T2TB	<i>Trichoderma sp. + Botrytis sp.</i>	72,48	a
T1TA	<i>Trichoderma sp. + Alternaría sp.</i>	36,44	b
T3TF	<i>Trichoderma sp. + Fusarium sp.</i>	23,7	bc
T4TR	<i>Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.</i>	16,29	c

La prueba de Tukey ejecutada determina que estadísticamente el tratamiento T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) con un 72,48% de inhibición de crecimiento difiere con los demás tratamientos demostrando diferencia alta. Mientras tanto el tratamiento T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*), no difiere con los tratamientos T1TA y T4TR; sin embargo, los tratamientos T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaría sp.*) y tratamiento T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) si existe diferencia entre sí.

3.4.4 Análisis del Porcentaje Inhibición del Crecimiento Radial.

Gráfico N°2 grafico dé % de inhibición a los 5 días



En el siguiente gráfico se muestra que el tratamiento T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) un 72,48% de inhibición, mostrando que hubo mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Botrytis sp.* en comparación con los demás tratamientos; ahora los tratamientos T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaría sp.*) un 36,44% de inhibición, el

tratamiento T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*) un 23,7% de inhibición y el tratamiento T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) un 16,29% de inhibición de crecimiento.

Estudios realizados por Ricaldi (2013), sostiene que el crecimiento de *Botrytis cinérea* en cultivo in vitro frente al antagonista *Trichoderma harzianum* presenta un porcentaje de inhibición al 36.1 % al quinto día de evaluación en su trabajo, lo cual nos indica que los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación el resultado de inhibición de *Trichoderma sp.* al crecimiento de *Botrytis sp.* es mayor; ahora si mencionamos a Calvo, Rivera y Orozco (2012), manifiesta que en su trabajo realizado en el enfrentamiento dual de *Botrytis cinérea* con el antagonista *Trichoderma sp.* presenta un 91.43% de inhibición de crecimiento en el cuarto día de evaluación.

3.5. Evaluación del Séptimo Día

En el séptimo día se mostró un crecimiento radial en comparación del quinto día casi similar, en todos los hongos fitopatógenos y el hongo antagonista.

Cuadro N°12 Análisis del porcentaje de Inhibición al séptimo día

DÍA 7					
Réplicas	TRATAMIENTOS				
	T1TA	T2TB	T3TF	T4TR	Σ
1	57	53,06	48	26,31	184,37
2	42,8	59,18	12	15,78	129,76
3	39,3	87,75	44	5,26	176,31
4	39,3	79,59	60	5,26	184,15
5	46,4	67,34	68	47,36	229,1
6	39,3	63,26	52	42,1	196,66
7	35,7	81,63	28	36,84	182,17
8	28,6	87,75	66,66	15,78	198,79
9	28,6	85,71	32	5,26	151,57
Σ	357	665,27	410,66	199,95	
x	39,67	73,92	45,63	22,22	

Las mediciones obtenidas fueron transformadas a través de la fórmula de P.I.C.R. y dieron los siguientes resultados representados en el siguiente cuadro; el T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) un 73.92% de inhibición, el T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaria sp.*) un 39.67% de inhibición, el T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*) un 45.63% de inhibición y el T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) un 22.22% de inhibición.

3.5.1. Análisis de varianza

Cuadro N°13 cuadro ANOVA

Fuente de varianza	gl	SC	CM	FC	F TABULADA	
					5%	1%
Total	35	17901,8				
tratamientos	3	10811,5	3603,80	16,26**	2,96	4,6
error	24	7090,3	221,57			

El cuadro ANOVA nos muestra que los tratamientos si existen diferencias estadísticamente altamente significativas al 5% y al 1% de probabilidad de error en relación a la F calculada, como consecuencia nos dice que los tratamientos son distintos entre sí.

3.5.2. Prueba de medias

Cuadro N°14 media de diferencia significativa de % de inhibición

TUKEY=17.72	73,91	45,63	36,44	22,22
22,22	*	*	NS	0
36,44	*	NS	0	
45,63	*	0		
73,91	0			

3.5.3. Diferencia de medias de los tratamientos

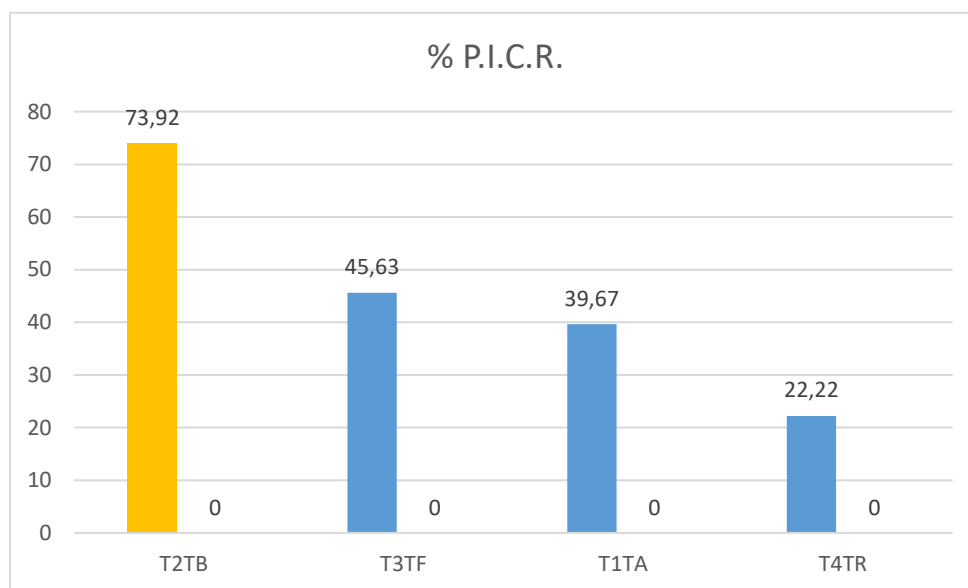
Cuadro N°15 diferencia de medias de tratamientos %de inhibición

Trat.	Descripción	% P.I.C.R.	rango
T2TB	<i>Trichoderma sp. + Botrytis sp.</i>	73,92	a
T3TF	<i>Trichoderma sp. + Fusarium sp.</i>	45,63	b
T1TA	<i>Trichoderma sp. + Alternaría sp.</i>	39,67	bc
T4TR	<i>Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.</i>	22,22	c

Después de ejecutar la prueba de Tukey se determina que el tratamiento T2TB (*Trichoderma sp. + Botrytis sp.*) con un 73.92% de inhibición presentando diferencias estadísticas con los demás tratamientos demostrando que hubo mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Botrytis sp.* en comparación con los demás tratamientos, mientras tanto en el séptimo día evaluación en comparación con el quinto día el tratamiento T3TF (*Trichoderma sp. + Fusarium sp.*).no difiere con el tratamiento T1TA (*Trichoderma sp. + Alternaría sp.*) con un 39.67 % de inhibición, pero si difiere con el tratamiento T4TR (*Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.*). Mientras tanto que el tratamiento T1TA (*Trichoderma sp. + Alternaría sp.*) no existe diferencias significativas con los tratamientos T3TF y el tratamiento T4TR.

3.5.4. Análisis del Porcentaje Inhibición del Crecimiento Radial

Gráfico N°3 gráfico de % de inhibición a los 7 días



En el gráfico se muestra que el mejor resultado en el Séptimo día de evaluación se puede observar que el tratamiento T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) con un 73.92% de inhibición con mayor porcentaje de inhibición en comparación con los demás tratamientos; seguido por el T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*) con un 45.63% de inhibición, el tratamiento T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaria sp.*) con un 39.67% de inhibición y el T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) con un 22.22% de inhibición de crecimiento.

De acuerdo con Ricaldi (2013), sostiene que el crecimiento de *Botrytis cinérea* en cultivo in vitro frente al antagonista *Trichoderma harzianum* presenta un porcentaje de inhibición al 50.1 % al séptimo día de evaluación en su trabajo, mientras tanto otro autor Memenza (2009), deduce en su trabajo de cultivo duales de *Trichoderma viride* con *Botrytis cinérea* presenta el 54.7 % de inhibición de crecimiento en el séptimo día de evaluación.

Teniendo en cuenta ahora al tratamiento T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*) podemos mencionar a Jaramillo (2014) el cultivo in vitro dual entre *Fusarium sp* y *Trichoderma koiningii* en su evaluación presenta un 56% de inhibición de crecimiento en el séptimo día de evaluación siendo su mejor resultado comparando con otras cepas de *Trichoderma*; tal como también señala Fernández y Suarez (2009), en el antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum rifai* frente *Fusarium oxysporum* muestra un resultado de 58% de inhibición de crecimiento radial del hongo patógeno.

Ahora de acuerdo con el tratamiento T1TA (*Trichoderma sp* + *Alternaría sp.*) según Jaramillo (2014), en sus cultivos de *Trichoderma harzianum* cepa Cholteca versus *Alternaría sp.* en su mejor resultado es el 73 % de inhibición de crecimiento en el séptimo día de evaluación, utilizando otro tipo de cepa de *Trichoderma*.

3.6. Evaluación del Décimo Día

En el décimo día se mostró un crecimiento radial similar al décimo día en todos los hongos Fito patógenos y el hongo antagonista. A continuación, los datos obtenidos:

Cuadro N°16 Análisis del porcentaje de Inhibición al décimo día

DÍA 10					
Réplicas	TRATAMIENTOS				Σ
	T1TA	T2TB	T3TF	T4TR	
1	68,42	53,06	62,85	60	244,33
2	57,9	59,18	37,14	54,28	208,5
3	55,3	87,75	60	48,57	251,62
4	55,3	79,59	71,42	48,57	254,88
5	60,52	67,34	77,14	71,42	276,42
6	55,3	63,26	65,71	68,57	252,84
7	52,63	81,63	48,57	65,71	248,54
8	47,4	87,75	57,14	54,28	246,57
9	47,4	85,71	51,42	48,57	233,1
Σ	500,17	665,27	531,39	519,97	
x	55,57	73,92	59,04	57,77	

Los resultados que se muestra en el siguiente cuadro del décimo día de evaluación muestra que el tratamiento T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) con un 73,92%, el tratamiento T3TF (*Trichoderma sp.* + *Fusarium sp.*) con un 59,04%, el tratamiento T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaría sp.*) con un 55,57% y T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) con un 57,77%.

3.6.1. Análisis de varianza

Cuadro N°17 cuadro ANOVA

Fuente de varianza	gl	SC	CM	FC	F TABULADA	
					5%	1%
Total	35	5483,97				
tratamientos	3	1883,1	627,70	5,57	2,96	4,6
error	24	3600,87	112,50			

El cuadro ANOVA nos muestra que en los tratamientos sí existen diferencias estadísticamente significativas al 5% y al 1% de probabilidad de error en relación a la F calculada, como consecuencia nos dice que los tratamientos son distintos entre sí.

3.6.2. Prueba de medias

Cuadro N°18 media de diferencia significativa de % de inhibición

TUKEY=13.49	73,91	59,04	57,8	55,57
55,57	*	NS	NS	0
57,8	*	NS	0	
59,04	*	0		
73,91	0			

3.6.3. Diferencia de medias de los tratamientos

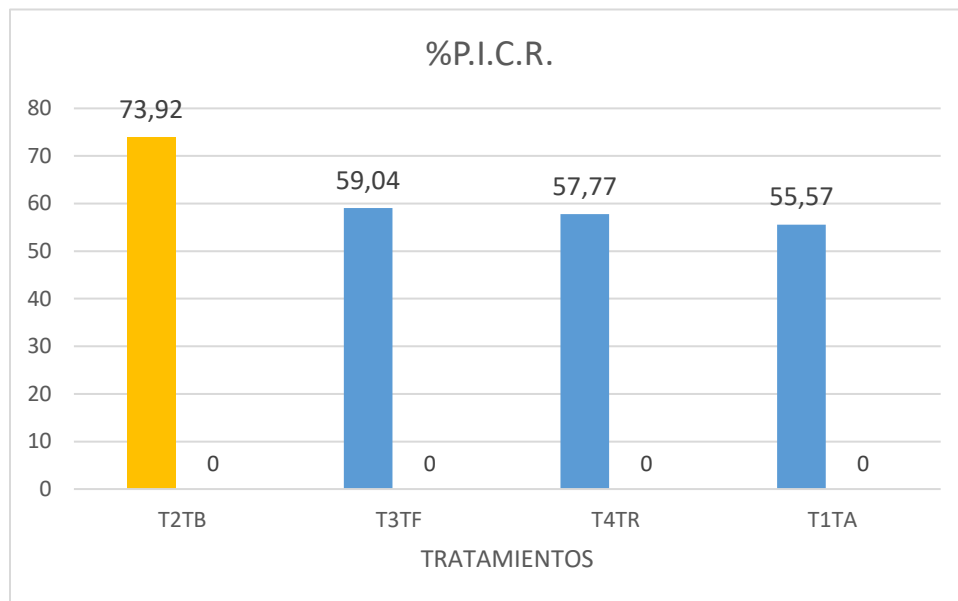
Cuadro N°19 diferencia de medias de tratamientos %de inhibición

Trat.	descripción	% P.I.C.R.	rango
T2TB	<i>Trichoderma sp. + Botrytis sp.</i>	73,92	a
T3TF	<i>Trichoderma sp. + Fusarium sp.</i>	59,04	b
T4TR	<i>Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.</i>	57,77	b
T1TA	<i>Trichoderma sp. + Alternaría sp.</i>	55,57	b

En el siguiente cuadro podemos observar después de haber realizado la prueba de Tukey se determina que el mejor tratamiento en el décimo día es el T2TB (*Trichoderma sp. + Botrytis sp.*) con 73,92% de inhibición de crecimiento de la *Botrytis sp.* existiendo diferencias estadísticamente significativas con los de demás tratamientos; ahora bien entre los demás tratamientos no existe diferencias entre sí, el T3TF (*Trichoderma sp. + Fusarium sp.*), el T4TR (*Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.*) y el T1TA (*Trichoderma sp. + Alternaría sp.*).

3.6.4. Análisis del Porcentaje Inhibición del Crecimiento Radial

Gráfico N°4 gráfico de % de inhibición a los 10 días



El mejor resultado en el décimo día se puede observar el segundo tratamiento T2TB (*Trichoderma sp.* + *Botrytis sp.*) con 73,92% con mayor porcentaje de inhibición en comparación con los demás tratamientos; seguido del tratamiento T3TF (*Trichoderma sp.* + *fusarium sp.*) con 59.04% de inhibición; después tenemos a T4TR (*Trichoderma sp.* + *Rhizoctonia sp.*) con 57.77% de inhibición y al final tenemos a T1TA (*Trichoderma sp.* + *Alternaría sp.*) con 55.57% de inhibición de crecimiento.

Dicho con las palabras de Memenza (2009), deduce en su trabajo de cultivo duales de *Trichoderma viride* con *Botrytis cinérea* a temperaturas de 28°C presenta el 92 % de inhibición de crecimiento en el décimo día de evaluación. En otras condiciones y distintos tratamientos mayor efectividad.

Estudios realizados por Suárez *Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum Rifai sobre Fusarium solani (Mart.) asociado a la marchitez en maracuyá (2008)* demostraron que el antagonismo de *Trichoderma harzianum rifai* hacia *Fusarium solani* al día 10 presentó una inhibición mayor al 50%; nombrando a este autor podemos decir que en el caso de *Fusarium sp. + Trichoderma sp.* realizado en el experimento lleva a similares resultados demostrando el antagonismo en un 59.04% de inhibición del hongo *Trichoderma* hacia el patógeno.

Evaluaciones por Camarena (2012) al estudiar el comportamiento *Trichoderma harzianum* frente a *Alternaría alternata* demostró un 62% de PICR; podemos mencionar que este caso presenta una similitud con *Trichoderma sp. + Alternaría sp.* que en el caso del experimento llegamos a un 55.67% de inhibían de crecimiento.

Desde la posición de Rodríguez y Flores (2018), deducen en su trabajo “Capacidad antagónica in vitro de *Trichoderma spp.* Frente *Rhizoctonia solani Kuhn* “que los tratamientos inhibieron significativamente a *Rhizoctonia solani Kuhn* presentando valores mayores al 50 % de inhibición de crecimiento, también como plantea Hernández (2006) quienes en condiciones similares obtuvieron un porcentaje de 53 y 58% de inhibición cuando evaluaron a *Trichoderma spp* frente a *Rhizoctonia sp.* Ahora podemos decir que tenemos valores similares en el presente trabajo de investigación en el tratamiento T4TR (*Trichoderma sp. + Rhizoctonia sp.*).

Lo cual nos indica que el hongo de *Trichoderma sp.* que se utilizó en el trabajo de investigación y que cuenta en el Laboratorio de Fitopatología, tienen un Porcentaje de inhibición de crecimiento muy similar a los reportes de otras evaluaciones para el control de los patógenos evaluados en este estudio.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se finalizó con éxito el aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos como son *Alternaria sp*, *Fusarium sp*, *Botrytis sp*. y *Rhizoctonia sp*.
- Se concluyó con éxito la evaluación in vitro de la capacidad antagónica del hongo *Trichoderma sp*. frente a hongos patógenos como *Botrytis sp*. inhibiendo su crecimiento en un 73.92%.
- El cultivo antagónico de *Trichoderma sp*. frente a *fusarium sp*. indica un 59.04% de inhibición crecimiento.
- Finalmente, los demás cultivos antagónicos que son, *Trichoderma sp*. + *Alternaria sp*. y el cultivo *Trichoderma sp*. + *Rhizoctonia sp*. tienen más del 50% de inhibición de crecimiento que se considera aceptable.

5.2 Recomendaciones

- Realizar la investigación cumpliendo con todos los protocolos de aislamiento y cultivo de hongos con rigurosidad, para evitar la contaminación de placas unas con otras.
- Hacer el aislamiento de los hongos patógenos con las medidas de seguridad impuestas por el laboratorio de cultivo in vitro, para evitar la contaminación de las muestras.
- Evaluar con mucha cautela y seguridad las cajas Petri al momento de tomar cada dato, para evitar la contaminación con hongos saprofitos y dañar la muestra.
- Realizar la selección de las plantas infestadas de los patógenos en estudio para un aislamiento y reconocimiento correcto en el laboratorio.
- Por lo tanto, el hongo *Trichoderma sp* se puede utilizar como medida de control en campo y observar su comportamiento, ya que la eficiencia de control sobrepasa el 50% en todos sus casos.