

CAPÍTULO I
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Generalidades

Los hongos del género *Trichoderma* han sido estudiados como agentes de control biológico que antagonizan una gran variedad de hongos fitopatógenos, tales como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, entre otros, que atacan cultivos de fresa, cebolla, ajo, tomate, trigo, col, etc. (Papavizas, 1985; Chet, 1987).

El mecanismo de acción de este género ha sido descrito en términos de la producción de antibióticos, competencia por nutrientes y espacio, así como micoparasitismo, que involucra el ataque directo de *Trichoderma* contra el fitopatógeno.

Trichoderma spp. es un hongo filamentoso micoparásito que tiene una variedad de aplicaciones, dentro de las cuales destacan su uso para la producción de metabolitos de interés industrial como lactonas, que son utilizadas en la industria alimentaria y farmacéutica y la producción de enzimas (celulasas, α y β -glucanasas) para la industria del papel y textil (Buchert et al, 1998; Galante et al, 1998).

1.2. Biología de la *Trichoderma sp*

El género *Trichoderma* pertenece al grupo de hongos filamentosos clasificados tradicionalmente como deuteromicetes, conocidos también como hongos imperfectos debido a que su fase sexual no es observable en condiciones normales. Estos organismos presentan hifas septadas, hialinas y ramificadas, y producen conidióforos con fiálides que generan conidios de forma ovoide, los cuales les dan un aspecto verde característico en los cultivos. Se encuentran ampliamente distribuidos en suelos agrícolas y rizosferas, donde actúan como antagonistas naturales de diversos patógenos vegetales gracias a su rápido crecimiento y capacidad de colonización (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004).

El género *Trichoderma* está catalogado entre los agentes de control biológico más eficientes debido al amplio espectro antagonista que presenta (Michel-Aceves et al., 2008); pueden ejercer antagonismo y controlar un amplio rango de patógenos de las

plantas económicamente importantes incluyendo hongos, virus y bacterias (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004).

Especies de *Trichoderma* son utilizadas en la agricultura para el manejo de enfermedades causadas por patógenos fúngicos del suelo tales como: *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Fusarium* (Bernal et al., 2000; Ferre y Santamarina, 2010) y *Verticillium spp.* (González et al., 2005).

Las colonias de *Trichoderma* generalmente crecen rápidamente, los tonos son típicamente verdes, gris o marrón, las hifas son septadas, generalmente hialinas, de pared lisa, los conidióforos en la mayoría de las especies con un eje principal muy ramificado, las fiálides 16 típicamente verticiladas, alternas u opuestas, conidios unicelulares, típicamente de color verdes o hialinos, de paredes lisas, ovoides o elipsoidales, clamidosporas abundantes, particularmente en medio de cultivo sumergido, de forma elipsoidal, hialina o color amarillo o verde, de pared lisa. Algunas especies de *Trichoderma* tienen fase sexual la cual es conocida como *Hypocrea* (Kubicek y Harman, 1998; Howell, 2003; García-Núñez et al., 2017; Hyder et al., 2017).

1.3. Habitat

Trichoderma spp. es un hongo que se encuentra en muchos ecosistemas (Hermosa et al., 2012); un organismo de vida libre y se puede encontrar principalmente en suelos y ecosistemas de raíz, donde se observan interacciones complejas entre la planta huésped, los patógenos y factores ambientales (Harman, 2006; Woo et al., 2006).

1.4. Características

En sus primeras etapas de crecimiento, las colonias de *Trichoderma* suelen presentar una coloración blanquecina, que con el tiempo se torna verde oscuro o amarillenta debido a la esporulación. El micelio es generalmente fino y poco denso, y bajo el microscopio se observan conidióforos ramificados, dispuestos en estructuras que recuerdan pequeños árboles. Estas estructuras terminan en fiálides, donde se forman conidios haploides, esenciales para la identificación de las especies dentro del género.

La pared celular de estos conidios está compuesta por enzimas extracelulares como quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales participan en los procesos de micoparasitismo. Asimismo, muchas especies de *Trichoderma* producen clamidosporas, que pueden presentarse de forma intercalar o terminal y contribuyen a la resistencia frente a condiciones ambientales adversas (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004).

1.4.1 Características macroscópicas

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas - verdes, amarillo – verdosas; las áreas con conidios se presentan con anillos concéntricos (Arango y col, 1988; Barnett & Hunter, 1972).

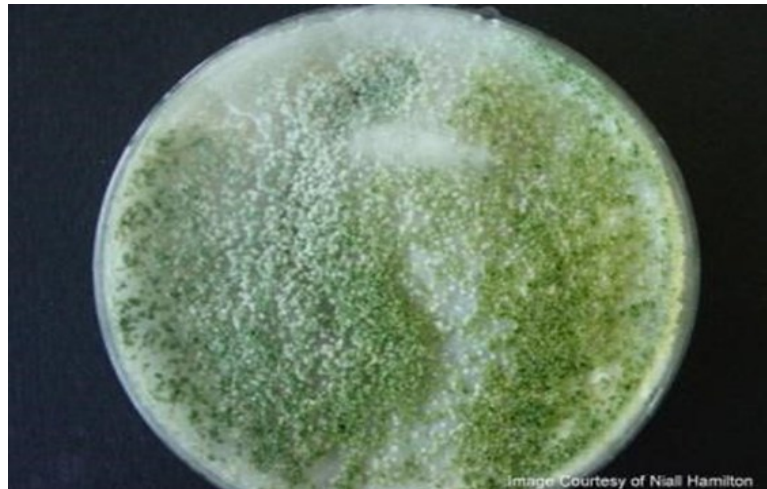


Figura N° 1: Características macroscópicas de *Trichoderma sp.*

Fuente: Kaminski Geraldine. Biblioteca de micología médica (Chávez 2006).

1.4.2 Características microscópicas

Los conidióforos son erectos, hialinos, en sus mayorías ramificadas, no verticiladas, pueden ser solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos. Hinchadas en la región central pero delgada hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Los conidios son unicelulares subglobosos u oblongas, lisas o equinadas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Chávez 2006).

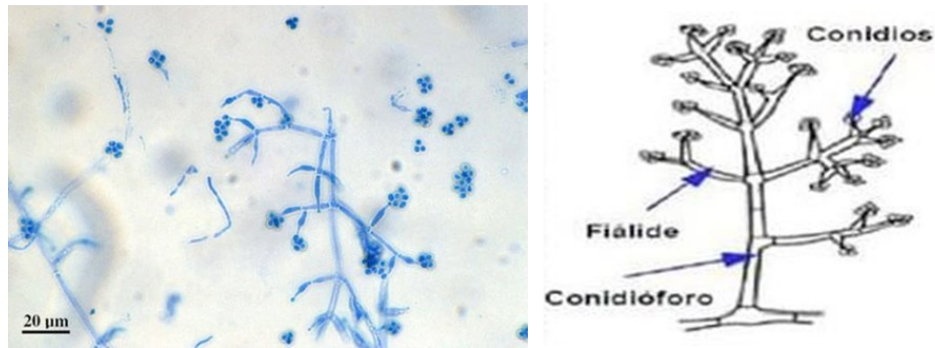


Figura N° 2: Características microscópicas de *Trichoderma sp.*

Fuente: Kaminski Geraldine. Biblioteca de micología médica (Chávez 2006).

1.5. Clasificación Taxonómica

La *Trichoderma sp.* se encuentra clasificado según Biosiembra 2014 como:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Sub-división: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceas

Género: *Trichoderma*

1.6. Factores que influyen en el crecimiento

1.6.1 Temperatura y agitación

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*, estableciendo que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre las diferentes especies; sin embargo, al igual que la gran mayoría de los hongos y estos se desarrollan

en rangos de temperatura mesofílicos 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 maduración de proteínas, inhibición de enzimas, promoción o supresión de la producción de un metabolito particular, viabilidad y muerte celular (Kredic Antal Z. 1994).

Se estudiaron a dos niveles: la temperatura (29 y 32 °C) y la agitación (500 y 700 rpm), de tal forma que se evaluaron cuatro condiciones diferentes. Dichas variables (temperatura y agitación) han sido reportadas como determinantes de los niveles de esporulación en otras cepas de *Trichoderma harzianum* (Jin et al, 1996; Felse and Panda, 2000).

La temperatura jugó un papel importante, ya que a 32°C y 500 rpm, se obtuvo la mayor esporulación de *T. harzianum*, habiendo un efecto combinado de estos dos parámetros. Caso contrario a 32°C y 700 rpm, donde posiblemente el estrés hidrodinámico extremo inhibió en cierto grado la esporulación.

1.6.2 Disponibilidad de agua

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

Las limitaciones más importantes de *Trichoderma* como biofungicida es su bajo nivel de tolerancia osmótica (0.5 M o menos). 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. (Muiño 1994).

En la fermentación sólida, un nivel de humedad mayor que el óptimo causa una disminución en la porosidad, alteración en la estructura de las partículas y menos transferencia de oxígeno. 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* tiene la habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 2 a 6, con óptimo de 4; y se ha reportado que la producción óptima de biomasa ocurre en un rango de pH entre 4, 6 y 6, 8. (Muiño 1994)

1.6.4 Aireación

Dos componentes del aire son esenciales para los hongos: el oxígeno y el dióxido de carbono. Las especies de *Trichoderma*, 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%. (Muiño 1994).

1.6.5 Condiciones de luz

El crecimiento de la mayoría de los hongos aparentemente no es afectado por la luz. El efecto más visible es la inhibición en una exposición de la luz fuerte. La luz también

puede afectar la formación de estructuras reproductivas o puede controlar la orientación de los movimientos fototrópicos de estas estructuras.

La mayoría de las especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, esporulando rápidamente sobre sustratos naturales o artificiales, en patrones anulares concéntricos en respuesta a la alternancia diaria de luz y oscuridad, con producción de conidios durante el periodo luminoso.

La máxima actividad fotoinductiva se encuentra entre 380nm y 440nm rango visible, no ocurriendo esporulación bajo los 245nm (Kredic Antal Z. 1994).

1.7. Mecanismos de acción

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

1.7.1 Competencia

Otro modo de acción antagonista de este hongo es la competencia por interferencia, que involucra un mecanismo químico (secreción de metabolitos) por el cual limita el acceso de otro microorganismo al sustrato. Así también, mediante el agotamiento de fuentes nutricionales por este organismo, sin limitar directamente el acceso de otro microorganismo a los sustratos (Howell, 1998)

Figura N° 3: Especies del género *Trichoderma* empleadas en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas en diferentes cultivos.

Especie	Antagonista frente a	Cultivo y autor que lo reporta
T. atroviride	Rhizoctonia solani	Papa (Lahlali y Hijri, 2010)
	Botrytis cinerea	Fresa (Fraize et al., 2003)
	Sclerotinia sclerotiorum	Alfalfa (Savazzini et al., 2008)
	Armillaria mellea	Uva (Savazzini et al., 2008)
T. asperellum	Fusarium oxysporum	Tomate (Cotxarrera et al., 2002; Segarra et al., 2010)
	Pseudomonas syringae	Pepino (Trillas et al., 2006)
	Pythium sp.	Tomate (Aerts et al., 2002)
T. hamatum	Fusarium oxysporum	Rábano (Heremans et al., 2005)
	Sclerotinia minor	Lechuga (Rabeendran et al., 2006)
	Botrytis cinerea	Begonia (Horst et al., 2005)
	Xanthomonas vesicaria	Tomate (Alfano et al., 2007)
T. harzianum	Botrytis cinerea	Pepino (Elad, 2000), tomate (Fiume, 2006).
	Sclerotinia sclerotium	Pepino (Elad, 2000)
	Pseuoperonospora cubensis	Pepino (Elad, 2000)
	Sphaeroteca fusca	Pepino (Elad, 2000)
	Fusarium oxysporum	Melón (Lopez et al, 2010), vid (El-mohamedy ket al. 2010.)
	Rhizoctonia solani	Tomate (Strashnov et al., 1985; Amer y Abou-El-Seoud, 2008), rábano (Lee et al., 2008)
	Pythium sp.	Maíz (Harman et al., 2004)
	Phaeomoniella chlamydospora	Vid (Di marco y Osti, 2007)

Fuente: López, 2011

1.7.2 Antibiosis

El género *Trichoderma* tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que juegan un papel importante inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. En estas interacciones están involucradas enzimas líticas como glucanasas, quitinasas y proteasas extracelulares, antibióticos y

compuestos de bajo peso molecular que, secretados en bajas concentraciones, impiden el crecimiento o las actividades metabólicas de patógenos, evitando la proliferación de la enfermedad (Hernández, Herrera 2009).

Se identificaron compuestos segregados por *Trichoderma sp.* del tipo de las alquilpironas (6- -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), 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).

1.7.3 Micoparasitismo

El complejo proceso de micoparasitismo consiste en varios eventos, incluyendo el reconocimiento del huésped, ataque y subsiguiente penetración y muerte. Durante este proceso *Trichoderma* secreta CWDEs que hidrolizan la pared celular del hongo huésped, liberando subsecuentemente oligómeros de la pared celular del patógeno (Kubicek et al., 2001; Howell 2003; Woo et al., 2006). Se cree que *Trichoderma* secreta enzimas hidrolíticas a un nivel constitutivo y detecta la presencia de otro hongo al detectar las moléculas liberadas del huésped por degradación enzimática (Harman et al., 2004; Lorito et al., 2006; Woo y Lorito, 2007).

1.8. Propágulos producidos por *Trihoderma spp.* para su aplicación como agente de control biológico

Trichoderma spp. produce tres tipos de propágulos, los cuales pueden ser utilizados como agentes de control biológico: micelio, clamidosporas y conidios. A continuación, se describen las características de cada uno de los propágulos.

1.8.1 Micelio

Las hifas son filamentos multinucleados, rodeados de una pared celular, que en su conjunto forman a lo que se conoce como micelio, el cual representa la forma vegetativa en hongos filamentosos (Moore-Landecker, 1996). El micelio de *Trichoderma spp.* ha sido evaluado como agente de control biológico.

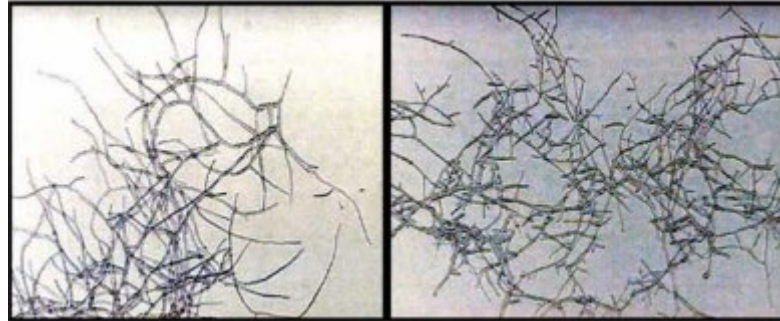


Figura N° 4: Micelio de *Trichoderma harzianum* cultivado en medio líquido.

Fuente: Moore-Landecker, 1996.

1.8.2 Clamidosporas

Las clamidosporas son estructuras producidas asexualmente, con pared celular gruesa y que surgen de la modificación de segmentos de hifas y que usualmente tienen la habilidad de resistir condiciones ambientales adversas (Lewis and Papavizas, 198).



Figura N° 5: Clamidosporas de *Trichoderma harzianum*.

Fuente: Lewis and Papavizas, 1983.

1.8.3 Conidios

Los conidios son un tipo de esporas, que se producen asexualmente y que son la forma natural de resistencia y dispersión de los hongos. Se caracterizan por tener una pared celular gruesa, aunque no mayor que las clamidosporas, pero mayor que la de micelio. Tienen una forma ovoide, un bajo contenido de agua y son resistentes a condiciones ambientales adversas.

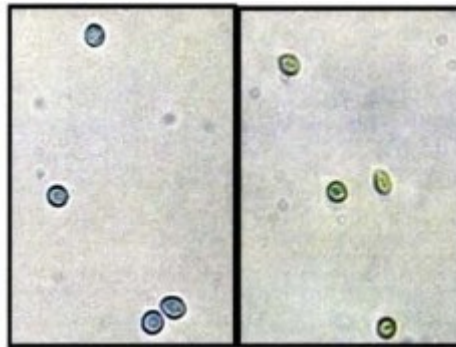


Figura N° 6: Conidios de *Trichoderma harzianum* producidos en medio líquido.

Fuente: Lewis and Papavizas, 1983

Tomando en cuenta las características con las que debe contar un agente de control biológico y de los propágulos producidos por *Trichoderma harzianum*, es evidente que los conidios ofrecen una alternativa interesante y presentan ventajas sobre las clamidosporas y el micelio, ya que son estructuras que se producen con mayor rapidez y en grandes cantidades, son resistentes al proceso de secado, tienen un porcentaje de germinación mucho mayor que las clamidosporas y una mayor vida de anaquel que el micelio.

Por tanto, los conidios parecen ofrecer la mejor opción para producir y aplicar a *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico. Finalmente, las características necesarias con las que debe contar un agente de control biológico a base de esporas para su uso efectivo son: 1) eficacia antagónica, 2) ser producido en grandes cantidades rápidamente ($>1 \times 10^7$ esporas/ml y en tiempos no mayores a 2 semanas), 3) ser resistente al proceso de secado ($>50\%$), 4) tener un alto nivel de germinación y propagación, y 5) conservar las cualidades de un lote a otro (Agosín y Aguilera, 1998).

1.9. Aspectos generales sobre la esporulación asexual en hongos filamentosos

El proceso de esporulación asexual es una forma muy común en hongos filamentosos y ha sido estudiado principalmente en *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Adams et al, 1998).

Este proceso comienza con el crecimiento del tallo del conidióforo -que se elonga por extensión apical- a partir de una ramificación aérea semejante al crecimiento de las hifas. Posteriormente, la punta del tallo comienza a hincharse, formando una estructura denominada vesícula. Posteriormente, se forma una capa de esterigma en la superficie de la vesícula, denominada métula. La métula, por su parte, brota dos veces produciendo una capa de esterigmas uninucleados denominadas fiálides, que son producidos al final de la métula. La fiálide difiere de la métula, en que la fiálide permite el desarrollo de cadenas de esporas uninucleadas llamadas conidios (Adams et al, 1998). En aspectos de la regulación genética de este fenómeno, se han identificado tres genes (*brlA*, *abaA* y *wetA*) en *Aspergillus nidulans* que han sido propuestos como la vía central de regulación genética del proceso de conidiación, tanto en la etapa de la formación del conidióforo como en la maduración de las esporas (Adams et al, 1998; Calvo et al, 2002).

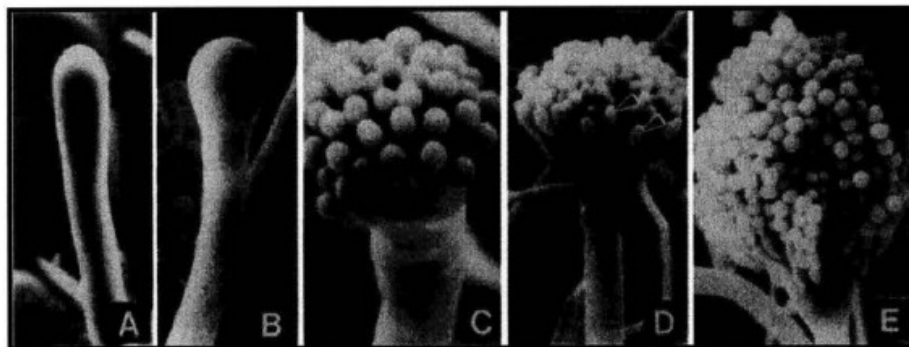


Figura N° 7: Micrografía de las etapas de conidiación en *Apergillus nidulans*.
 (A) Tallo temprano del conidióforo. (B) Formación de la vesícula en la punta del tallo. (C) Desarrollo de la métula. (D) Desarrollo de las fiálides. (E) Conidióforo maduro con cadenas de conidios.

Fuente: adaptado de Adams et al, 1998.

El gen *brlA* expresa dos reguladores transcripcionales en condiciones de limitación de glucosa y nitrógeno en cultivo sumergido, cuya función es mediar la transición del crecimiento del tallo del conidióforo a la formación de la vesícula y activar la expresión de *abaA*, entre otros genes específicos de esta vía (Skromne et al, 1995; Adams et al, 1998). Por su parte, *abaA*, gene intermedio de esta vía, se expresa cuando la métula se forma y dirige la diferenciación de las fiálides, así como la activación de *wetA*, *brlA* y otros genes (Sewall et al, 1990; Han y Adams, 2001). Finalmente, *wetA* es responsable de la maduración de los conidios, mediante la síntesis de componentes cruciales de la pared celular que hacen impermeables a los conidios y que al mismo tiempo regula la expresión de otros genes específicos de esta vía (Marshall et al, 1991).

1.10. Ventajas del *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 antagonistas (Yedida, 1999).

1.11. Obtención de inoculantes

Los hongos se reproducen por intermedio de esporas (reproducción sexuada) o asexualmente (reproducciones vegetativas), por multiplicación de tejido celular. La producción sexual se inicia cuando germinan las esporas y producen células que se organizan en filamentos llamados hifas (Alave, 2008).

El proceso de esporulación involucra la formación de conidios, un tipo de espóra asexual, que se forman en estructuras hifales diferenciadas, denominadas conidióforos. Tal proceso es particularmente afectado por factores nutricionales (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y vitaminas) y factores fisicoquímicos como el pH, temperatura, luz y actividad de agua, entre otros (Moore-Landdecker, 1996).

1.12. Obtención de esporas

La recolección eficiente de las esporas maduras es crucial. Métodos comunes incluyen el raspado mecánico de la superficie del agar utilizando instrumentos estériles (espátulas, asas) o el lavado de la superficie con soluciones acuosas estériles que contienen agentes humectantes suaves como Tween 80 (0.01-0.1%) para facilitar la suspensión de las esporas sin dañar su viabilidad (Lee & Hwang, 2017).

La suspensión obtenida se puede filtrar a través de gasa estéril o mallas de diferentes tamaños de poro para eliminar fragmentos de micelio y agar.

1.13. Condiciones de limpieza y esterilización

La asepsia es una de las partes más importantes debió al alto porcentaje de contaminación que se tiene, todo se realiza en la zona estéril (cama de flujo laminar) y con el ambiente desinfectado (cloro, alcohol y lysol) cerca del mechero y evitando corrientes de aire externo (Avila, 2013).

1.14. Preparación de una jeringa de esporas

Abrimos los sellos de esporas y se raspan con una navaja estéril hasta que caigan todas las esporas en unos pocos milímetros de agua previamente esterilizadas (aproximadamente 5 ml) se observa suficiente cantidad de ellas en el agua; posteriormente se abre una jeringa nueva cerca del mechero (una jeringa de alto calibre para que

no se tape) y se absorbe el líquido. Con este sembramos simplemente poniéndolo en el medio de cultivo previamente ya preparado en cajas Petri o tubos de ensayo (Avila, 2013).

1.15. Producción del inóculo

1.15.1 Elaboración del cultivo

Para el desarrollo del micelio de los hongos en el laboratorio, se emplean medios de cultivo preparados en placas Petri, que le proporcionan al hongo los nutrientes necesarios para su desarrollo. Los diferentes medios de cultivo generalmente se venden preparados listos para diluirlos en agua destilada, como el caso del agar con papa y dextrosa y el agar con extracto de malta, pero también es posible prepararlos utilizando insumos que se venden en el comercio cotidiano (Montenegro & Stuardo, 2021)

1.15.2 Sustrato

El sustrato es denominado al medio de cultivo del cual los hongos, obtienen alimento para la difusión directa a través de paredes hifálica, causando una desintegración de materia orgánica que utilizan como alimento (Sanchez et al, 2001).

1.15.3 Arroz

Nutricionalmente, el grano de arroz es una fuente importante de carbohidratos, principalmente almidón, lo que lo convierte en una fuente primaria de energía (Eat This Much, n.d.). También contiene cantidades significativas de vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina), así como minerales como el hierro y el manganeso (MyPlate.gov, n.d.). La composición nutricional puede variar según el tipo de arroz (blanco, integral) y el procesamiento (MDPI, 2022). El arroz integral, al conservar el salvado, presenta un mayor contenido de fibra y otros nutrientes beneficiosos (MDPI, 2022).

1.15.4 Cebada

En cuanto a su composición nutricional, la cebada es una buena fuente de carbohidratos complejos y fibra dietética, especialmente betaglucanos, conocidos por sus efectos beneficiosos en la salud cardiovascular (Healthline, 2018). También aporta vitaminas

del grupo B, como el niacina y la tiamina, así como minerales como el selenio, el magnesio y el manganeso (Healthline, 2018; MyPlate.gov, n.d.).

1.15.5 Maíz

El grano de maíz es una carióspside relativamente grande, compuesto principalmente por el endospermo (rico en almidón), el germen (rico en lípidos y proteínas) y el pericarpio (capa exterior). (Healthline, 2018).

Maíz Entero: La colonización del grano entero por *Trichoderma* comienza en la superficie y el micelio debe penetrar las capas externas para acceder a los nutrientes internos. Esto puede llevar más tiempo en comparación con granos partidos.

Maíz Partido o Quebrado: Al romper la integridad del grano, se expone una mayor superficie del endospermo y el germen, facilitando una colonización más rápida y uniforme por el micelio de *Trichoderma*. La mayor disponibilidad de nutrientes superficiales puede acelerar el crecimiento y la esporulación

1.16. Medios de cultivos

Los medios de cultivos de microorganismos (hongos, bacterias y levaduras) son esenciales en el Laboratorio de Fitopatología por lo que a diario se preparan y utilizan; son una mezcla de nutrientes, que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos (Tovar 2008).

Condiciones que debe reunir un Medio de cultivo. - Para que los microorganismos crezcan adecuadamente, un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones: contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios, disponer de oxígeno, temperatura adecuada, humedad y pH. Exento de microorganismos contaminantes. (Arias, Poñeros 2008)

Disponibilidad de nutrientes en los Medios de cultivo. - Un medio de cultivo para que permita el crecimiento adecuado de microorganismos debe contener como mínimo: Carbono, Nitrógeno, Azufre, Fósforo y Sales inorgánicas que suplan iones (K, Mg, Fe, Ca, etc.) (Arias, Poñeros 2008).

1.17. Medios de cultivo según su utilidad práctica

Generales: Sirven para el cultivo de una gran variedad de microorganismos. Ej: Agar Papa dextrosa (PDA); Agar Nutriente (NA).

Selectivos: Son medios a los que se les agregan sustancias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Medios selectivos: Son aquellos que favorecen por su diseño el crecimiento específico de un microorganismo particular o grupo de microorganismos. Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta Ej. Agar Malta acidificado y con antibiótico para inhibir el crecimiento de bacterias.

Diferenciales: Medios diferenciales: Son aquellos destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios (Tovar 2008).

1.18. Observación microscópica

1.18.1 Técnica de cinta pegante

Esta técnica es una de las más usadas, debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas. Además de permitir observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Para su realización, se toma una tira de cinta de 4cm, con el lado adhesivo hacia afuera, sosteniéndose con pinzas y presionando firmemente contra la superficie de la colonia del hongo que se desea estudiar. Posteriormente, la tira de cinta se coloca en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol (Arias, Poñeros 2008).

1.18.2 Montaje por disección

Se realiza con la aguja de disección, para tomar una parte de la superficie de la colonia que luego debe ser depositada sobre una gota de azul de lactofenol. Con la ayuda de otra aguja o de un asa se deberá extender el preparado y se cubre con una lámina cubreobjetos, para luego ser observada al microscopio con un aumento de 40 X (Arias, Poñeros 2008).

1.19. Manejo de la cámara Neubauer

La cuantificación de conidios se realiza mediante hemocitometría utilizando una cámara de Neubauer, siguiendo los criterios clásicos establecidos por Neubauer & Thoma (1902) y Búnker (1904).

Para obtener una concentración adecuada para el conteo, la suspensión esporal inicial se somete a diluciones, ejemplo: (1:10,1:100), procedimiento que optimiza la distribución y lectura de las esporas en el retículo (López & Bautista, 2005).

La fórmula usada para determinar la concentración de esporas/ml es la recomendada por autores como Martínez & Galindo (2007):

$$\text{Concentración (esporas/ml)} = \frac{(\text{Promedio de esporas contadas}) \times \text{Factor de dilución} \times 10^4}{1}$$

1.20. Método malla por puntos para control de crecimiento del hongo

La estimación del crecimiento micelial se realizó mediante el método de cuadrícula o malla por puntos, basado en el principio estereológico propuesto por Delesse (1847) y posteriormente desarrollado por Chalkley (1943), el cual permite estimar áreas ocupadas a partir del conteo de puntos sobre una retícula.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.3 Características del área de estudio

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales el cual está ubicado dentro del campus universitario, dentro de dicho laboratorio se contó con insumos, materiales y equipos necesarios para realizar dicha investigación.

2.4 MATERIALES

2.4.1 Materiales de Estudio

En el trabajo de investigación, el principal material a estudiar fue el hongo *Trichoderma sp.* con el que cuenta el laboratorio de Fitopatología de la F.CA.y F.

2.4.2 Material vegetal

Conidio = espora asexual, no móvil, de un hongo, formada en el extremo de un filamento o hifa

- ♣ Semilla de arroz (*Oryza sativa*)
- ♣ Semilla de cebada (*Hordeum vulgare*)
- ♣ Semilla de Maíz (*Zea mays*)

2.4.3 Materiales de escritorio

- ♣ Cámara Fotográfica
- ♣ Marcadores
- ♣ Etiquetas
- ♣ Calculadora

2.4.4 Materiales de Laboratorio

- ♣ Bata blanca
- ♣ Barbijo
- ♣ Cajas Petri de vidrio
- ♣ Pipetas
- ♣ Jeringas
- ♣ Mecheros
- ♣ Bisturí

- ♣ Frascos de vidrio

2.4.5 Equipo

- ♣ Cámara de flujo laminar
- ♣ Cámara neubauer
- ♣ Autoclave
- ♣ Balanza
- ♣ Microscopio
- ♣ Horno de esterilización

2.4.6 Productos químicos

- ♣ Alcohol
- ♣ Agua destilada
- ♣ Medio de cultivo Dextrosa Agar
- ♣ Azul de metileno

2.5 METODOLOGÍA

2.5.1 Diseño Experimental

El diseño que se empleó en el presente trabajo de investigación fue un diseño bifactorial 3 x 2 completamente al azar, con seis tratamientos y cuatro repeticiones, del cual se obtuvo un total de 24 unidades experimentales estudiadas.

2.5.2 Características del diseño experimental

Cuadro N° 1: Características del diseño experimental

Factor en estudio	Niveles del factor	Tratamientos	N° de tratamientos	Repeticiones	N° de unidades experimentales
Granos	G1-G2-G3	G1D1-G1D2 G2D1-G2D2 G3D1-G3D2	6	4	24
Dosis	D1= 5 ml D2= 10 ml				

Fuente: Elaboración propia

G1= Arroz

G2= Cebada

G3=Maíz

G1D1: 7×10^8 esporas/5ml (*Trichoderma sp.*) + 150g de grano de arroz.

G1D2: 1.4×10^9 esporas/10ml (*Trichoderma sp.*) + 150g de grano de arroz.

G2D1: 7×10^8 esporas/5ml (*Trichoderma sp.*) + 150g de grano de cebada.

G2D2: 1.4×10^9 esporas/10ml (*Trichoderma sp.*) + 150g de grano de cebada.

G3D1: 7×10^8 esporas/5ml (*Trichoderma sp.*) + 150g de grano de maíz.

G3D2: 1.4×10^9 esporas/10ml (*Trichoderma sp.*) + 150g de grano de maíz

2.5.3 Unidad experimental

Cada unidad experimental consistió en un frasco de vidrio, con un peso de 150g de un solo tipo de grano (arroz, cebada o maíz), previamente esterilizado. A cada frasco se le aplicó una dosis uniforme de inóculo de *Trichoderma sp.*, utilizando una suspensión conidial que fue preparada con una concentración de 1.4×10^8 conidios/ml *Trichoderma sp.*

Eso quiere decir que se utilizaron: 12 unidades experimentales $\times$ 5 ml= 60 ml de suspensión esporal a 7×10^8 conidios/5ml y 12 unidades experimentales $\times$ 10 ml = 120 ml de suspensión conidial a 1.4×10^8 conidios/10ml, dando así con un total de 24 unidades experimentales.

2.6 Descripción de los Tratamientos

Cuadro N° 2: Tratamiento en estudio

Tratamientos	Repeticiones	Descripción de los tratamientos
T1= G1D1	T1-R1	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
	T1-R2	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
	T1-R3	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
	T1-R4	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
T2= G1D2	T2-R1	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
	T2-R2	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
	T2-R3	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
	T2-R4	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de arroz
T3=G2D1	T3-R1	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
	T3-R2	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
	T3-R3	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
	T3-R4	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
T4=G2D2	T4-R1	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
	T4-R2	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
	T4-R3	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
	T4-R4	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de cebada
T5=G3D1	T5-R1	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
	T5-R2	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
	T5-R3	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
	T5-R4	7×10^8 esporas/5ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
T6=G3D2	T6-R1	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
	T6-R2	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
	T6-R3	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz
	T6-R4	1.4×10^9 esporas/10ml <i>Trichoderma sp.</i> x 150g de maíz

Fuente: Elaboración propia

2.7 MODELO MATEMÁTICO

El análisis de los datos se realizó mediante un diseño bifactorial, de acuerdo con el modelo lineal propuesto por Fisher (1935):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ij} ; Es j ésimo elemento perteneciente al i ésimo tratamiento

μ ; Es la media poblacional global.

A_i : Es el efecto del i ésimo del factor A.

B_j : Efecto del j-ésimo nivel del factor B.

$(AB)_{ij}$: Efecto de la interacción entre el nivel i del factor A y el nivel j del factor B.

ϵ_{ij} : Es el error experimental asociado.

2.8 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.8.1 Medio del Cultivo

Los granos de arroz, cebada y maíces esterilizados fueron empleados como un medio de cultivo sólido, actuando como sustratos nutritivos que permiten el crecimiento, colonización y esporulación de *Trichoderma sp.* Estos granos proporcionan carbohidratos, proteínas y minerales que favorecen un desarrollo micelial vigoroso, convirtiéndolos en un sustrato eficiente para la producción de inóculo fúngico en sistemas de fermentación sólida.



Fotografía N° 1: Granos de arroz, cebada y maíz.

Fuente: Elaboración propia

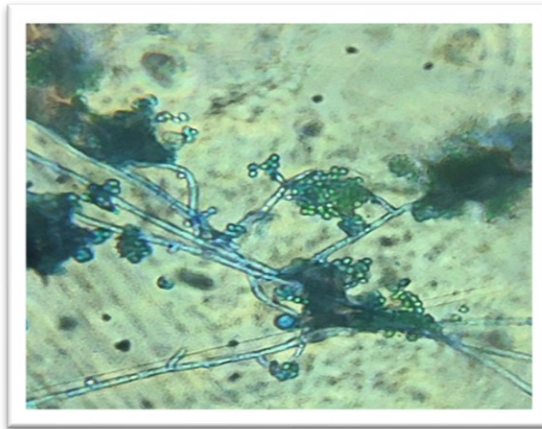
2.8.2 Multiplicación del hongo *Trichoderma sp.*

La reproducción asexual en *Trichoderma sp* se llevó a cabo principalmente mediante la producción de conidios, que son esporas asexuales unicelulares.

El proceso de conidiación siguió las etapas fisiológicas normales de crecimiento del tallo del conidióforo que se elonga por extensión apical a partir de una ramificación aérea semejante al crecimiento de las hifas. Posteriormente, la punta del tallo comienza a hincharse, formando una estructura denominada vesícula. Posteriormente, se forma una capa de esterigma en la superficie de la vesícula, denominada métula. La métula, por su parte, brota dos veces produciendo una capa de esterigmas uninucleados denominadas fiálides, que son producidos al final de la métula. La fiálide difiere de la métula, en que la fiálide permite el desarrollo de cadenas de esporas uninucleadas llamadas conidios.

2.8.3 Preparación inicial del hongo

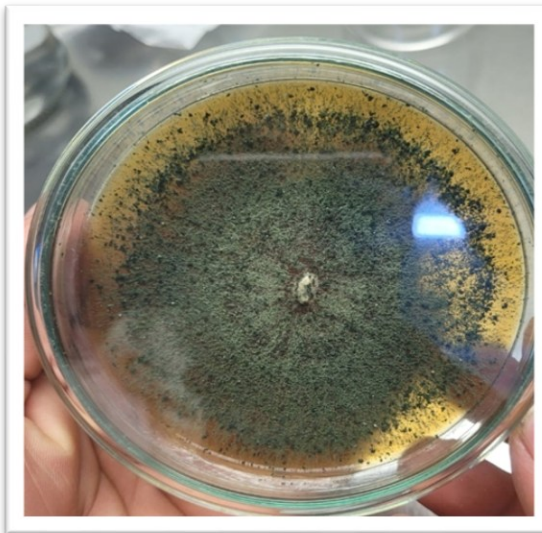
El cultivo inicial de *Trichoderma sp.* fue activado mediante una primera siembra en medio PDA. Una vez observado el crecimiento micelial, se realizó una segunda resiembra a partir de la primera placa, con el propósito de obtener un cultivo fresco, activo y libre de contaminantes, también se realizó una caracterización macroscópica y microscópica. Este cultivo fue utilizado como fuente de inóculo para los ensayos experimentales.



Fotografía N° 2: Observación microscópica, colonia *Trichoderma sp.*

Fuente: Elaboración propia

Presenta una estructura fácil de reconocer con conidióforos grandes y alargados que muestran una ramificación extensa, con métula y fiálides que reflejan la producción de conidios, los conidios son unicelulares de diferentes formas algunos redondeados u ovalados, ubicados en masas en los ápices de los filiales.



Fotografía N° 3: Observación macroscópica, colonia *Trichoderma sp.*

Fuente: Elaboración propia

La caracterización colonial de *Trichoderma sp.* implica un crecimiento fúngico rápido e invasivo, que inicialmente aparece como un micelio blanco y algodonoso antes de desarrollar pústulas conidiales distintivas de color verde amarillento a verde intenso. Una característica notable es que este hongo a menudo forma patrones de esporulación en anillos concéntricos o zonas discretas dentro de la placa de Petri a medida que madura. La textura puede variar de vellosa a polvorienta, y el reverso de la colonia suele ser incoloro o ligeramente pigmentado

2.8.4 Preparación del sustrato:

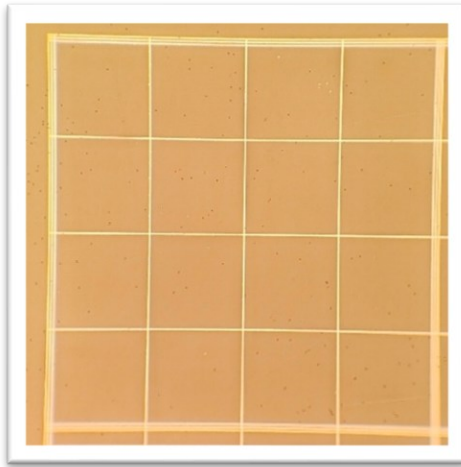
Lo granos fueron sometidos a un lavado inicial con agua potable para eliminar polvo superficial y residuos adheridos. Una vez limpios, se llevó a cabo un remojo previo durante 12 horas, con el fin de favorecer la hidratación homogénea del grano y asegurar una textura adecuada para el crecimiento micelial. Este paso se realizó teniendo en cuenta las características intrínsecas de cada sustrato: el arroz, de estructura más uniforme y porosa; la cebada, con mayor presencia de cáscara; y el maíz, de endospermo más compacto, lo cual influye en su capacidad de retención de humedad.

Posteriormente se pesaron 150g, se distribuyeron en frascos de vidrio y se esterilizaron mediante un autoclavado.

2.8.5 Obtención y determinación de la concentración de conidios por hemocitometría:

Una vez que la esporulación fue abundante, se cosecharon las esporas lavando suavemente la superficie del cultivo con 200 ml agua destilada estéril, recolectando la suspensión resultante con el propósito de realizar un conteo adecuado dentro de los límites de lectura de la cámara de Neubauer, se preparó una dilución 1:100. Esta dilución permitió disminuir la concentración inicial y facilitar la visualización y cuantificación de las esporas.

Se colocó con una pipeta una gota de la dilución sobre la cámara de Neubauer. La cámara se dejó reposar durante 2 minutos para permitir la distribución homogénea de las esporas en la cuadrícula.



Fotografía N° 4: Cuadrante superior izquierdo de la cámara Neubauer.

Fuente: Elaboración propia.

El conteo se realizó en los cuatro cuadrantes grandes de la cámara, siguiendo los criterios estándar de hemocitometría (solo se contabilizaron las esporas ubicadas dentro del cuadrado y aquellas que tocaban las líneas superiores y derechas no) cada cuadrante contaba con dieciséis cuadrados más pequeños. A partir del número promedio de esporas por cuadrante, se aplicó la fórmula correspondiente para determinar la concentración de esporas por mililitro en la dilución.

2.8.6 Inoculación:

La inoculación se realizó mediante transferencia aséptica aplicando 5 ml y 10 ml de suspensión esporal (1.4×10^8 conidios/ml) en cada frasco, distribuyendo la solución homogéneamente todo este procedimiento fue realizado dentro de una cámara de flujo laminar.



Fotografía N° 5: Inoculación en grano de maíz.

Fuente: Elaboración propia

2.8.7 Control del crecimiento y agitación

Se colocaron los frascos en un lugar cerrado a temperatura ambiente con oscuridad parcial.

El monitoreo del crecimiento micelial en los seis tratamientos T1 a T6 se realizó mediante el método de cuadrícula (Malla por Puntos) Chalkley (1943), un procedimiento indirecto y cuantitativo para estimar la colonización visual en el sustrato de grano. Para ello se determinó la superficie útil disponible para el crecimiento de *Trichoderma sp.*, se empleó una hoja flexible transparente cuadriculada por 1 cm² por cuadrícula, la cual se colocó alrededor del frasco siguiendo la curvatura del recipiente. La malla permitió delimitar con precisión la zona ocupada por los granos que estos alcanzaban en cada unidad experimental.

Se contabilizaron los cuadros completos contenidos dentro de dicha región y los cuadros no parcialmente cubiertos en totalidad como (0.25 o 0.75 cm²) se estimaron como el 50% del cuadro, según el porcentaje visual de ocupación. El área útil era de (148,5 cm²) se obtuvo mediante la suma de los cuadros completos e incompletos.

El control del crecimiento fueron los 12 días, pero a partir del día 4 se comenzó a observar el micelio visible. Y se evaluaron las fases más importantes que fueron en día 1-4 fase de crecimiento, día 6-7 fase de crecimiento exponencial y día 9-12 fase final de esporulación. Este método permitió cuantificar la dinámica de colonización en cada tratamiento, generando los datos de la media para el posterior Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba de Tukey.



Fotografía N° 6: Control del crecimiento del hongo mediante el método malla por puntos.

Fuente: Elaboración propia

Para homogenizar la distribución del inóculo y evitar la compactación del sustrato, los frascos fueron sometidos a agitación manual suave inmediatamente después de la inoculación también se agitaron el cuarto, quinto y sexto día. La agitación consistió en movimientos giratorios circulares controladas completando 50 vueltas cada repetición asegurando la dispersión uniforme de las esporas sobre la superficie de los granos. Este método se empleó debido a la ausencia de equipos de agitación mecánica y por su eficacia en cultivos sólidos de hongos filamentosos

Se observó un crecimiento con esporulación temprana y crecimiento micelial parcial siendo una transición rápida de fase vegetativa (micelio blanco) a fase reproductiva (conidiación verde).

2.8.8 Obtención del inóculo sólido

El material resultante consistió en granos completamente colonizados por *Trichoderma sp.*, los cuales se consideran un inóculo sólido granular debido a su capacidad de transferir el hongo viable a nuevos sustratos y actuar como agente de biocontrolador.

3 Variables de respuesta

- Superficie colonizada, en cm²/día del micelio.
- Tiempo de colonización total en los granos de arroz, cebada y maíz, evaluado en 12 días
- Concentración de conidios/gramo

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación del crecimiento micelial en diferentes especies de grano

El crecimiento micelial se midió mediante el método malla por puntos sobre los frascos de cada tratamiento, en unidades de (cm²). Las mediciones o lecturas se realizaron a partir del cuarto día, desde el día cuatro se realizaron las lecturas todos los días hasta el día 12, no se realizó lecturas en los primeros días por que no presentó un crecimiento visible, durante el periodo de evaluación fueron 5 días evaluados que presenta las etapas más importantes de la *Trihoderna sp.* haciendo un total de 5 lecturas. En la cual se realizó un ANOVA con su prueba para cada lectura, para determinar si existe o no una diferencia de crecimiento entre los tratamientos puestos a investigación y a la vez poder determinar que ensayo obtuvo el mayor crecimiento, siendo así el más óptimo para el desarrollo del hongo.

3.1.1 Crecimiento del micelio día 1

En el primer día evaluado, no se presentó crecimiento micelial visible en ninguno de los tratamientos establecidos para poder realizar mediciones y tabulaciones de los respectivos datos.

3.1.2 Crecimiento micelial a los 4 días

Cuadro N° 3: Evaluación del crecimiento del micelio a los 4 días

Dia 4						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	64	55	70	87,5	276,5	69,1
T2	107	98	100,5	102	407,5	101,8
T3	93	92,5	89	83	357,5	89,3
T4	105	93,5	91,5	93	383	95,7
T5	42	49	45,5	39	175,5	43,8
T6	24,5	43,5	46	42	156	39
Σ	435,5	431,5	442,5	446,5	1756	

Fuente: Elaboración propia

El tratamiento T2 presentó la respuesta más alta, con una media de (101,8 cm²). El tratamiento T4 alcanzó un valor intermedio superior (95,7 cm²), mientras que T3

mostró un resultado moderado (89,3 cm²) al igual que el T1 (69,1 cm²). Por otro lado, los tratamientos T5 (43,8 cm²) y T6 (39 cm²) mostraron los valores más bajos registrados durante este día de medición.

Michel (2001) reportó un crecimiento inicial de *Trichoderma* spp. en medios líquidos y sólidos, alcanzando radios de colonización de 2.5cm a 3.0 cm para el día, en los resultados iniciales se evidencia que el crecimiento es mayor en todos los tratamientos Y confirman la importancia del sustrato en la velocidad de arranque del micelio. El crecimiento superior en arroz (T2) concuerda con lo señalado por Arias y Poñeros (2008), quienes afirman que los nutrientes fácilmente asimilables, principalmente carbohidratos, son esenciales para el desarrollo microbiano rápido en medios sólidos

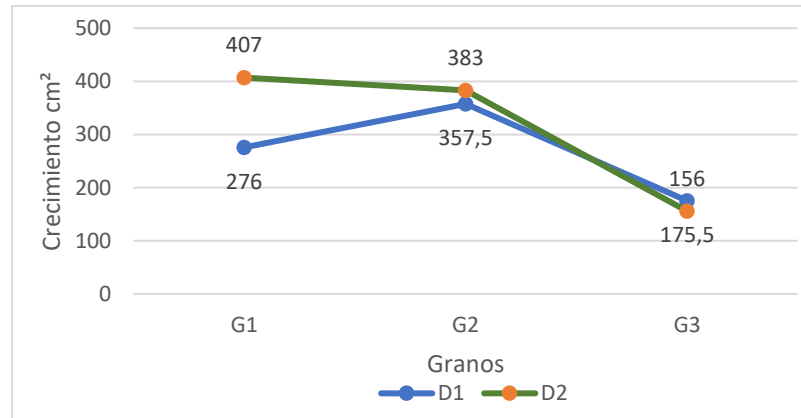
Cuadro N° 4: Doble entrada del micelio a los 4 días

DOSIS/ GRANOS	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	276,5	357,5	175,5	809,5	67,5
D2	407	383	156	946	78,8
SUMA	683,5	740,5	331,5	1756	
MEDIA	85,4	92,5	41,4		

Fuente: Elaboración propia

El análisis del cuadro de doble entrada mostró que la dosis D2 presentó una media superior (78,8 cm²) respecto a D1 (67,5 cm²), evidenciando un incremento del 16,7 % en el 4to día evaluado. En cuanto al tipo de grano, G2 registró el mayor valor promedio (92,5 cm²), seguido por G1 (85,4 cm²), mientras que G3 presentó los valores más bajos (41,4 cm²), lo que indica una marcada influencia del sustrato en el desempeño del tratamiento.

Grafica 1: Interacción de dos factores al crecimiento micelial día 4



Fuente: Elaboración propia

Los factores no son independientes y los granos dependen de la cantidad de dosis, en esta oportunidad se menciona que los efectos son interactivos. Los granos se comportan de modo diferente en dosificaciones distintas: G1 disminuye su crecimiento al tener una dosis baja al igual que el G2 Y G3, pero por tanto en G1, G2 Y G3 existe un incremento en su crecimiento al brindarles una dosificación mayor, siendo una interacción de especie por dosificación.

Cuadro N° 5: Análisis de varianza ANOVA para el crecimiento micelial del hongo

FV	GL	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	15686,3				
Tratamientos	5	14554,3	2910,8	46,2	2.77	4.25
Error	18	1132,0	62,8			
F. G	2	12194,9	6097,5	97,0	3,55	6,01
F. D	1	703,2	703,2	11,2	4,41	8,28
G/D	2	1656,2	828,1	13,2	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza ANOVA del día 4 reveló diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el crecimiento micelial, el cual señala que existe una

diferencia estadísticamente significativa donde se obtuvo la “F” calculada de los tratamientos mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, como consecuencia dice que los tratamientos son distintos entre sí, lo mismo sucede con el factor G que presenta diferencias altamente significativas, para poder determinar si hay diferencias entre la interacción y el factor D, se debe realizar una prueba de comparación de medias.

Cuadro N° 6: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa de crecimiento micelial

15,8	101,8	95,7	89,3	69,1	43,8	39
39	62,8**	56,7**	50,3**	30,1**	NS	0
43,8	58**	51,8**	45,5**	25,2 *	0	
69,1	32,7**	26,6*	20,2*	0		
89,3	NS	NS	0			
95,7	NS	0				
101,8	0					

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 7: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T2	101,8 a
T4	95,7 a
T3	89,3 a
T1	69,1 b
T5	43,8 c
T6	39 c

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey evidenció la formación de grupos estadísticamente distintos. El tratamiento T2 se ubicó en el grupo con mayor crecimiento, diferenciándose significativamente de T6 y T5, que formaron los grupos con los valores más bajos. Estos resultados confirman que el G1 y la D2 generan un crecimiento inicial superior, mientras que el G3 con D1 retrasa la expansión micelial. El cuadro de medias mostró que los tratamientos presentan comportamientos diferenciados en las primeras etapas de colonización.

Cuadro N° 8: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANO	MEDIAS	15,8	92,5	85,4	41,4
G2	92,5 a	41,4	51,12**	44**	0
G1	85,4 a	85,4	NS	0	
G3	41,4 b	92,5	0		

Fuente: Elaboración propia

El cuadro número 8, en la prueba de Tukey para el factor G, se observa que el grano G2 y G1, son estadísticamente iguales presentando las medias más altas y ambos granos son diferentes del G3 siendo este estadísticamente inferior y el menos efectivo que el G1 Y G2 para promover el crecimiento del hongo.

Cuadro N° 9: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor D

DOSIS	MEDIAS	15,8	78,8	67,5
D2	78,8 a	67,5	NS	0
D1	67,5 a	78,8	0	0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 9 se muestra la prueba de comparación de medias Tukey para el factor D, en el día 4 no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de dosis.

Cuadro N° 10: Prueba de TUKEY para la interacción D/G

INTERACCIÓN G/D	MEDIAS	15,8	92,5	85,4	78,8	67,5	41,4
G2	92,56 a	41,4	51,12**	44**	37,3**	26,06**	0
G1	85,44 a	67,5	25,06**	17,9*	NS	0	
D2	78,8 ab	78,8	NS	NS	0		
D1	67,5 b	85,4	NS	0			
G3	41,44 c	92,5	0				

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 10 de la prueba de Tukey para la interacción de factores, muestra que se encontró diferencias estadísticamente significativas entre el promedio del crecimiento del hongo donde G2, G1 con D2 estadísticamente no presenta diferencias

ya que se encuentra en el mismo rango, pero G2 y G1 si son diferentes a D1 dejando al G3 con diferencias significativas en el último esto indica que el efecto de un factor G, depende significativamente del nivel del otro factor.

3.1.3 Crecimiento micelial a los 6 días

Cuadro N° 11: Evaluación del crecimiento del micelio a los 6 días

Dia 6						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	135,5	134,5	132,5	133,5	536	134
T2	141,5	138	137	138	554,5	138,6
T3	127	123	127	122,5	499,5	124,8
T4	133	131	133	129,5	526,5	131,6
T5	55	60,5	62	50	227,5	56,8
T6	50	63	67	68	248	62
Σ	642	650	658,5	641,5	2592	

Fuente: Elaboración propia

El tratamiento T2 presentó la mayor respuesta en el Día 6, con una media de (138.625 cm²). Los tratamientos T1 (134 cm²), T4 (131,625 cm²) mostraron un rango similar al T2, el T3 (124.87 cm²) mostro respuesta intermedia. Por otro lado, los tratamientos T6 (62 cm²) y T5 (56,875 cm²) registraron las respuestas más bajas durante este día.

T1 (Arroz) supera a T4 y T3, la consolidación de los tratamientos con Arroz (T1, T2) y Cebada (T4) en los grupos superiores reafirma las bases teóricas de la elección del sustrato. Agámez et al. (2008) sostienen que el arroz es uno de los sustratos más eficientes para la producción de *Trichoderma* debido a su estructura y composición nutricional.

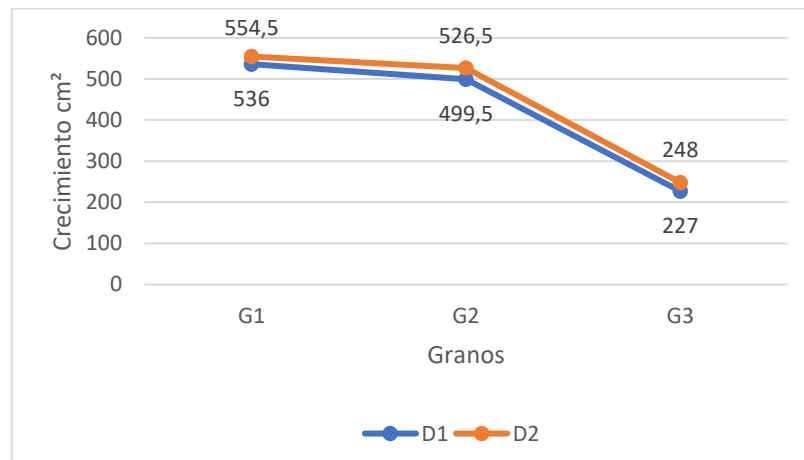
Cuadro N° 12: Cuadro doble entrada del micelio a los 6 días

DOSIS/ GRANOS	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	536	499,5	227	1262,5	105,2
D2	554,5	526,5	248	1329	110,8
SUMA	1090,5	1026	475	2592	
MEDIA	136,31	128,25	59,38		

Fuente: Elaboración propia

El análisis del cuadro de doble entrada del día 6 mostró que la dosis D2 presentó una media superior (110,8 cm²) respecto a D1 (105,2 cm²), evidenciando un incremento en su crecimiento en el 6to día evaluado. En cuanto al tipo de grano, G1 registró el mayor valor promedio (136,31 cm²), seguido por G2 (128,25 cm²), mientras que G3 presentó los valores más bajos (59,38cm²), lo que indica una marcada influencia del sustrato en el desempeño del tratamiento.

Grafica 2: Interacción con dos factores al crecimiento micelial al día 6



Fuente: Elaboración propia

En la gráfica 2 se puede apreciar las líneas de tendencia que los granos hay mayor crecimiento del hongo con un aumento de dosificación de inóculo, pero el G1 incrementa más que los demás granos, el estudio de variación indicará si la diferencia es significativa o no.

Cuadro N° 13: Análisis de varianza ANOVA para el crecimiento micelial del hongo

FV	GL	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	29086,0				
Tratamientos	5	28746,2	5749,2	304,60	2,77	4,25
Error	18	339,7	18,8			
F. G	2	28500,4	14250,2	755,0	3,55	6,01
F. D	1	76,3	76,3	4,0	4,41	8,28
Inter G/D	2	169,6	84,8	4,5	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza ANOVA del día 6 reveló diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el crecimiento micelial, al igual que el factor G el cual señala que existe una diferencia estadísticamente significativa donde se obtuvo la “F” calculada de los tratamientos mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, como consecuencia dice que los tratamientos y factor G son distintos entre sí, el factor D demostró que no presenta diferencias significativas en la “F” tabular al 5% y al 1%, la interacción de G/D demuestra que existe diferencia significativa en la “F” tabular al 5% pero no existe diferencia al 1%.

Cuadro N° 14: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa de crecimiento micelial

8,68	138,63	134	131,63	124,88	62	56,68
56,88	81,75**	77,12**	74,75**	68**	NS	0
62	76,63**	72**	69,63**	62,88**	0	
124,88	13,75*	9,12*	NS	0		
131,63	NS	NS	0			
134	NS	0				
138,63	0					

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 15: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T2	138,63 a
T1	134 a
T4	131,63 ab
T3	124,88 b
T5	62 c
T6	56 c

Fuente: Elaboración propia

El análisis de Tukey agrupó a los tratamientos en niveles de crecimiento diferentes. T2 permaneció como el tratamiento más sobresaliente, no tan separado del T1 y T4, que mostraron niveles casi cercanos y no presentaron diferencias significativas. La mayor separación entre grupos respecto al día 4 indica que el efecto de los factores se vuelve más evidente a medida que avanza el crecimiento como ser el T1 de estar por debajo del T4 y T3, en el día 6 los supero., mientras que T6 y T5 continúan con respuestas más bajas. Este comportamiento demuestra que los granos con mejores características nutricionales (cebada y arroz) sustentan un crecimiento más estable conforme avanza el tiempo.

Cuadro N° 16: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANOS	MEDIAS	8,68	136,31	128,25	59,38
G2	136,31 a	59,38	76,93**	68,87**	0
G1	128,25 a	128,25	NS	0	
G3	59,38 b	136,31	0		

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 16 se muestra la prueba de comparación de medias Tukey para el factor G, en el cual existen una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de granos, donde G2 y G1 no son estadísticamente diferentes entre ellos, pero el G3 presenta una diferencia significativa fue un factor con un efecto altamente significativo y diferenciador sobre el rendimiento.

Cuadro N° 17: Prueba de TUKEY para la interacción D/G

INTERACCIÓN G/D	MEDIAS	8,68	136,31	128,25	110,80	105,20	59,38
G1	136,31 a	59,38	76,93**	68,87**	51,42**	45,82**	0
G2	128,25 a	105,2	31,11**	23,05*	NS	0	
D2	110,8 b	110,8	25,51*	17,45*	0		
D1	105,2 b	128,25	NS	0			
G3	59,38 c	136,31	0				

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro numero 17 se muestra que G1, G2 no son diferentes significativamente, pero si son con los demás, D2 con D1 no mostraron diferencias entre ellos, pero sin muestran diferencia significativa con G3 dando a entender que si presentan una interacción dependiente.

3.1.4 Crecimiento micelial a los 7 días

Cuadro N° 18: Evaluación del crecimiento del micelio a los días

Día 7						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	148,5	148,5	143,5	145,5	586	146,5
T2	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T3	136,5	138,5	139	138,5	552,5	138,1
T4	144,5	144	145,5	145	579	144,7
T5	68	70,5	79,5	65	283	70,7
T6	71	77	83	83	314	78,5
Σ	717	727	739	725,5	2909	

Fuente: Elaboración propia

El tratamiento T2 demostró ser consistentemente el más eficaz, obteniendo la media más alta con 146 cm². Se observaron respuestas intermedias en T1, T4 y T3, que alcanzaron promedios de 146,5 cm², 144,75 cm² y 138,125 cm² respectivamente. En contraste, los tratamientos T6 (78,5 cm²) y T5 (70,5 cm²) exhibieron los niveles de respuesta más bajos del estudio en este día de medición.

Agámez et al. (2008) reportó que, en el arroz, el hongo *Trichoderma sp.* alcanza el 100 % de colonización en 10 días. La eficiencia del T2 (Arroz + Dosis Alta) se corrobora,

pues logró la colonización total en un tiempo o mejor (7-9 días), que el estándar reportado en la literatura (10 días) para el arroz.

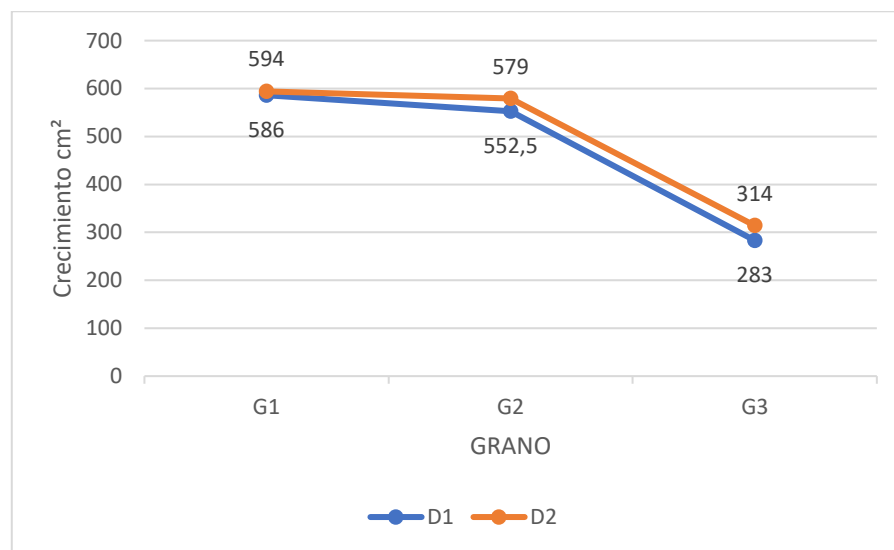
Cuadro N° 19: Cuadro doble entrada del micelio a los 7 días

DOSIS/ GRANOS	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	586	552,5	283	1421,5	118,5
D2	594	579	314	1487	123,9
SUMA	1180	1131,5	597	2909	
MEDIA	147,50	141,4	74,63		

Fuente: Elaboración propia

El análisis del cuadro de doble entrada del día 7 mostró que la dosis D2 presentó una media superior (123 cm²) respecto a D1 (118,5,2 cm²), evidenciando un incremento en su crecimiento en el día 7 evaluado. En cuanto al tipo de grano, G1 registró el mayor valor promedio (147,5 cm²), seguido por G2 (141,4cm²), mientras que G3 presentó los valores más bajos (74,63cm²), lo que indica una marcada influencia del sustrato en el desempeño del tratamiento.

Grafica 3: Interacción con dos factores al crecimiento micelial del día 7



Fuente: Elaboración propia

En la gráfica 3 del día 7 se puede apreciar las líneas de tendencia que los granos hay mayor crecimiento del hongo con un aumento de dosificación de inóculo, pero el G1

con D2 lograron el máximo de su crecimiento más que los demás granos y dosis, el estudio de variación indicará si la diferencia es significativa o no.

Cuadro N° 20: Análisis de varianza ANOVA para el crecimiento micelial del hongo

FV	GL	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	26618,91				
Tratamientos	5	26379,7	5275,9	397,04	2,77	4,25
Error	18	239,1	13,2			
F. G	2	26163,8	13081,9	984,5	3,55	6,01
F. D	1	178,8	178,8	13,5	4,41	8,28
Inter G/D	2	37,1	18,6	1,4	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza ANOVA del día 7 reveló diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el crecimiento micelial, el cual señala que existe una diferencia estadísticamente significativa donde se obtuvo la “F” calculada de los tratamientos mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, como consecuencia dice que los tratamientos son distintos entre sí, la interacción de G/D demuestra que no existe diferencia significativa en la “F” tabular al 5% y al 1%.

Cuadro N° 21: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa de crecimiento micelial

7,28	148,5	146,5	144,75	138,13	78,5	70,7
70,7	77,8 **	75,8**	74,05**	67,43**	7,8*	0
78,5	70**	68*	66,25**	59,63**	0	
138,13	10,37*	8,37*	NS	0		
144,75	NS	NS	0			
146,5	NS	0				
148,5	0					

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 22: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T2	148,5 a
T1	146,5 a
T4	144,75 ab
T3	138,13 b
T5	78,5 c
T6	70,7 d

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey reveló una separación aún más marcada entre los tratamientos. El T2 se ubicó nuevamente en el grupo de mayor crecimiento, al igual que el T1 y T4 quedaron en el grupo de rango “a”, pero el tratamiento T1 no difiere con el tratamiento T4 con un 144,75 cm² de crecimiento micelial, pero si difiere con el T3, mientras que el T5 y T6 se presentan en grupos más bajos con diferencias significativas.

Cuadro N° 23: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANOS	MEDIAS	7,28	147,5	141,4	74,6
G1	147,5 a	74,6	72,87**	66,81**	0
G2	141,4 a	141,4	NS	0	
G3	74,6 b	147,5	0		

Fuente: Elaboración propia

En la diferencia significativa de factor G, los G1 y G2 no presentaron diferencias significativas estadísticamente siendo así que pertenecen al mismo rango, pero G1 y G2 si son diferentes al G3 estadísticamente, ya que G3 registro el crecimiento más bajo.

Cuadro N° 24: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor D

DOSIS	MEDIAS	7,28	123,9	118,5
D2	123,9 a	118,5	NS	0
D1	118,5 a	123,9	0	0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 24 en factor D las dosificaciones D2 y D1 no presentaron diferencias significativas estadísticamente quedaron perteneciendo en el mismo rango, pero se puede apreciar que D2 es mayor que D1.

3.1.5 Crecimiento micelial a los 9 días

Cuadro N° 25: Evaluación del crecimiento del micelio a los 9 días

Dia 9						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T2	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T3	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T4	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T5	115,5	114,5	114,5	108	452,5	113,125
T6	116,5	121	123,5	122,5	483,5	120,875
Σ	826	829,5	832	824,5	3312	

Fuente: Elaboración propia

El tratamiento T2, T1, T4, T3 mostraron el rendimiento más sobresaliente y consistente, con alcanzar el crecimiento total de 148,5 cm², a comparación de los tratamientos T6 (120,85 cm²) y T5 (113,123 cm²), en menor medida, exhibieron las tasas de crecimiento más lentas o menos eficientes.

Para el día 9 se observa que varios tratamientos alcanzan la saturación máxima (148,5 cm²), especialmente T1, T2, T3 y T4, mientras que T5 y T6 aún no llegan al máximo. Esto coincide con lo que mencionan Agosín, E. and Aguilera, J.M. (1998), que indica que el tiempo hasta la “saturación” del sustrato puede variar entre 8 y 15 días según el sustrato y condiciones de incubación.

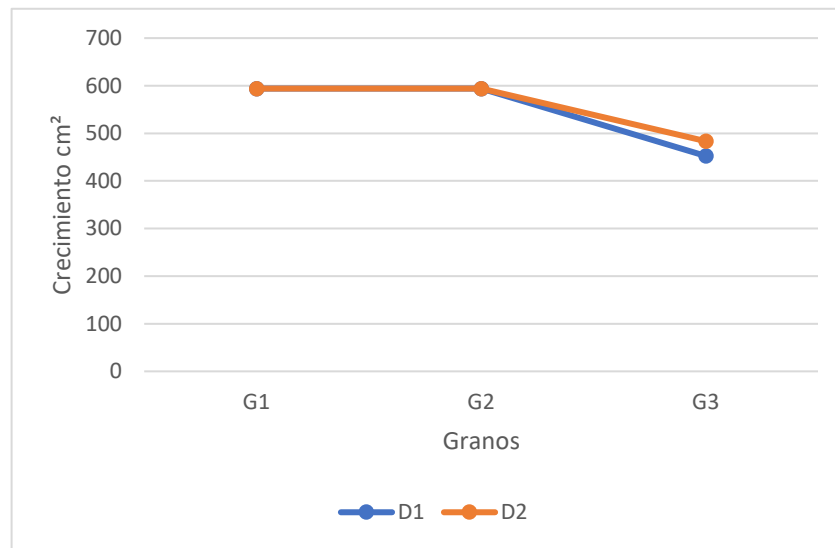
Cuadro N° 26: Cuadro doble entrada del micelio a los 9 días

DOSIS/GRANO	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	594	594	452,5	1640,5	136,7
D2	594	594	483,5	1671,5	139,3
SUMA	1188	1188	936	3312	
MEDIA	148,50	148,50	117,00		

Fuente: Elaboración propia

El análisis del cuadro de doble entrada del día 6 mostró que la dosis D2 presentó una media superior ($138,3 \text{ cm}^2$) respecto a D1 ($136,7 \text{ cm}^2$), evidenciando un incremento en su crecimiento en el 9no día evaluado. En cuanto al tipo de grano, G1 y G2 registraron el mayor valor promedio de ($148,5 \text{ cm}^2$), mientras que G3 presentó los valores más bajos (117 cm^2), lo que indica una marcada influencia del sustrato en el desempeño del tratamiento.

Grafica 4: Interacción de dos factores al crecimiento micelial a los 9 días



Fuente: Elaboración propia

En la gráfica 4 del día 9 se puede apreciar las líneas de tendencia que los granos hay mayor crecimiento del hongo con un aumento de dosificación de inóculo, donde G1 y G2 mantienen lugares similares ya que alcanzaron su crecimiento máximo, mientras que el G3 aun no concluye con su crecimiento final, el estudio de variación indicará si la diferencia es significativa o no.

Cuadro N° 27: Análisis de varianza ANOVA para el crecimiento micelial del hongo

FV	GL	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	5476,50				
Tratamientos	5	5412,13	1082,43	302,66	2,77	4,25
Error	18	64,38	3,58			
F. G	2	5292,0	2646,0	739,9	3,55	6,01
F. D	1	40,0	40,0	11,2	4,41	8,28
Inter G/D	2	80,1	40,0	11,2	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza ANOVA del día 9 reveló diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el crecimiento micelial, el cual señala que existe una diferencia estadísticamente significativa donde se obtuvo la “F” calculada de los tratamientos mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, como consecuencia dice que los tratamientos son distintos entre sí. La “F” calculada de los de los factores tanto como el de la interacción es mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, presentan diferencias significativas.

Cuadro N° 28: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa de crecimiento micelial

3,8	148,5	148,5	148,5	148,5	120,88	113,13
113,13	35,3**	35,3**	35,3**	35,3**	7,7*	0
120,88	27,6**	27,6**	27,6**	27,6**	0	
148,5	0	0	0	0		
148,5	0	0	0	0		
148,5	0	0	0	0		
148,5	0	0	0	0		

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 29: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T2	148,5 a
T4	148,5 a
T1	148,5 a
T3	148,5 a
T5	120,88 b
T6	113,13 b

Fuente: Elaboración propia

En los tratamientos T2, T1, T4 Y T3, no existe diferencia entre sí, siendo equivalentes y logrando la colonización máxima a comparación del T6 y T5 existe una diferencia amplia, llegando a ser equivalentes en su baja eficacia.

Cuadro N° 30: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANO	MEDIAS	3,8	148,5	148,50	117,00
G1	148,5 a	117	31,5**	31,5**	0
G2	148,5 a	148,5	0	0	
G3	117 b	148,5	0		

Fuente: Elaboración propia

El cuadro número 30 de las diferencias del factor G demuestra que los G1 y G2 no presentan diferencias significativas siendo así del mismo rango, pero si llegan a ser diferentes al G3 que pertenece a al rango más inferior demostrando una menor eficiencia.

Cuadro N° 31: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor D

DOSIS	MEDIAS	3,8	139,3	136,7
D2	139,3 a	136,7	NS	0
D1	136,7 a	139,3	0	0

Fuente: Elaboración propia

El cuadro número 31 de la prueba de TUKEY para las diferencias del factor D demuestra que los D1 y D2 no presentan diferencias significativas siendo así del mismo rango,

Cuadro N° 32: Prueba de TUKEY para la interacción G/D

INTERACCIÓN	MEDIAS	3,8	148,5	148,5	147	146,3	143,0
G1	148,5 a	143,0	5,4*	5,4*	3,9*	NS	0
G2	148,5 a	146,3	NS	NS	NS	0	
D2	147a	147	NS	NS	0		
D1	146,3 a	148,5	0	0			
G3	143,06 d	148,5	0				

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 32 se muestra la prueba de comparación de medias Tukey para la interacción G/D en el cual muestra que los granos G1, G2 y en las dosis D1 y D2 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus medias, el G3 presento diferencias estadísticamente significativas entre las demás medias superiores siendo significativamente menor, tuvieron un crecimiento significativamente inferior.

3.1.6 Crecimiento micelial a los 12 días

Cuadro N° 33: Evaluación del crecimiento del micelio a los 12 días

Día 12						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T2	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T3	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T4	148,5	148,5	148,5	148,5	594	148,5
T5	142	141,5	142,5	142	568	142
T6	143	144	145	144,5	576,5	144,125
Σ	879	879,5	881,5	880,5	3520,5	

Fuente: Elaboración propia

Los Tratamientos T2, T1, T4 Y T3 lograron la eficiencia biológica máxima a los 12 días alcanzaron el crecimiento total habiendo cubierto el sustrato completamente con la superficie de 148,5 cm², Los tratamientos T6 (144,125 cm²) y T5 (142 cm²) son catalogados como los más lentos, ya que su crecimiento sigue en curso y no llegaron a completar su crecimiento antes del día 12.

En la etapa final día 12 la jerarquía de tratamientos y la consolidación de grupos (T2 > T4/T1 > T3 > T6/T5) son coherentes con el comportamiento fisiológico de

Trichoderma: tras la fase vegetativa, la estabilidad de humedad y la estructura del sustrato condicionan la esporulación y la cobertura final, como mencionaron Adams et al.; Papavizas (1985-1998).

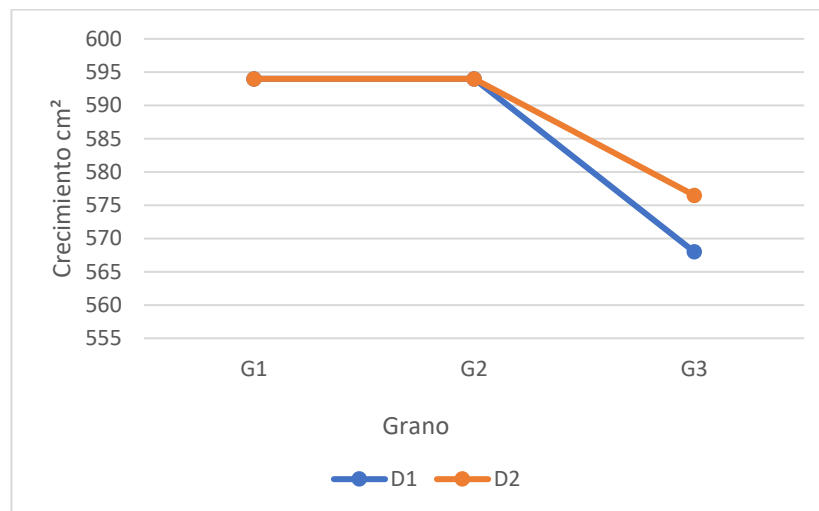
Cuadro N° 34: Análisis de varianza ANOVA para el crecimiento micelial del hongo

DOSIS/GRANO	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	594	594	568	1756	146,3
D2	594	594	576,5	1764,5	147,0
SUMA	1188	1188	1144,5	3521	
MEDIA	148,50	148,50	143,06		

Fuente: Elaboración propia

El análisis del cuadro de doble entrada del último día evaluado demostró que la dosis D2 presentó una media superior (147 cm²) respecto a D1 (146 cm²). En cuanto al tipo de grano, G1 y G2 registraron el mayor valor promedio de su crecimiento (148,5 cm²) mientras que G3 presentó los valores más bajos (143,06 cm²), lo que indica una baja influencia del sustrato en el desempeño del tratamiento.

Grafica 5: Interacción de dos factores al crecimiento micelial a los 12 días



Fuente: Elaboración propia

En la gráfica número 5 muestra que los factores no son independientes y los granos dependen de la cantidad de dosis, se menciona que los efectos son interactivos. Los granos se comportan de modo diferente en dosificaciones distintas: G1, G2 Y G3 existe

un incremento en su crecimiento al brindarles una dosificación mayor, siendo una interacción de especie por dosificación.

Cuadro N° 35: Análisis de varianza ANOVA para el crecimiento micelial del hongo

FV	GL	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	169,4				
Tratamientos	5	166,7	33,3	223,3	2,77	4,25
Error	18	2,6	0,15			
F. G	2	157,7	78,8	528,1	3,55	6,01
F. D	1	3,0	3,0	20,2	4,41	8,28
Inter G/D	2	6,0	3,0	20,2	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza ANOVA del día 12 demostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el crecimiento micelial, el cual señala que existe una diferencia estadísticamente significativa donde se obtuvo la “F” calculada de los tratamientos mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, como consecuencia dice que los tratamientos son distintos entre sí y la “F” calculada de los de los factores G y D tanto como el de la interacción es mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, presentan diferencias altamente significativas.

Cuadro N° 36: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa de crecimiento micelial

0,76	148,5	148,5	148,5	148,5	144,1	142
142	6,5 *	6,5*	6,5*	6,5*	2,1	0
144,1	4,3 *	4,3*	4,3*	4,3*	0	
148,5	0	0	0	0		
148,5	0	0	0	0		
148,5	0	0	0	0		
148,5	0	0	0	0		

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 37: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T2	148,5 a
T4	148,5 a
T1	148,5 a
T3	148,5 a
T5	144,13 b
T6	142 b

Fuente: Elaboración propia

En los tratamientos T2, T1, T4 Y T3, no existe diferencia entre sí, siendo equivalentes y logrando la colonización máxima a comparación del T6 y T5 existe una diferencia amplia, llegando a ser equivalentes en su baja eficacia. Los tratamientos T2, T1, T4 Y T3 se clasifican como los más eficaces al ser equivalentes y lograr la colonización máxima del sustrato disponible, el T6 y el T5 se ubican en los rangos intermedios, respectivamente, demostrando una eficacia moderada y no tan distinta entre sí.

Cuadro N° 38: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANO	MEDIAS	0,76	148,5	148,5	143
G1	148,5 a	143	5,5**	5,5**	0
G2	148,5 a	148,5	0	0	
G3	143 b	148,5	0		

Fuente: Elaboración propia

El cuadro número 38 de la prueba de TUKEY para las diferencias del factor G demuestra que los G1 y G2 no presentan diferencias significativas siendo así del mismo rango, pero si llegan a ser diferentes al G3 que pertenece a al rango más inferior demostrando una menor eficiencia.

Cuadro N° 39: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor D

DOSIS	MEDIAS	0,76	147	146,3
D1	147 a	146,3	NS	0
D2	146,3 a	147	0	0

Fuente: Elaboración propia

El cuadro número 39 de la prueba de TUKEY para las diferencias del factor Dosis en D2 y D1 no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro N° 40: Prueba de TUKEY para la interacción G/D

INTERACCIÓN	MEDIAS	0,76	148,5	148,5	147,0	146,3	143
G1	148,5 a	143	5,44**	5,44**	3,94 *	3,24*	0
G2	148,5 a	146,3	2,2*	2,2*	NS	0	
D2	147b	147	1,5*	1,50*	0		
D1	146,3 b	148,5	0	0			
G3	143,06 c	148,5	0				

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 40 se muestra la prueba de comparación de medias Tukey para la interacción G/D en el cual muestra que los granos G1, G2 no presentan diferencias estadísticamente significativas pero si existe diferencias con las dosis D1 y D2 pero entre las dosis no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus medias, el G3 presento diferencias estadísticamente significativas entre las demás medias superiores siendo significativamente menor, tuvieron un crecimiento significativamente inferior.

3.2 Tiempo de colonización de *Trichoderma sp.* en los granos de arroz, cebada y maíz, evaluado en 12 días

Cuadro N° 41: Evaluación del tiempo de colonización total en los granos de arroz, cebada y maíz

Tiempo de colonización						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	7	7	8	8	30	7,5
T2	7	7	7	7	28	7
T3	9	9	9	9	36	9
T4	8	8	8	8	32	8
T5	15	14	14	14	57	14,25
T6	14	13	13	13	53	13,25
Σ	60	58	59	59	236	

Fuente: Elaboración propia

En la evaluación de del tiempo de colonización mostró diferencias claras entre los tratamientos evaluados. Los tratamientos T2 (7 días), T1 (7,5 días) y T4 (8 días) registraron los menores tiempos promedio, ubicándose muy por debajo del límite máximo aceptable de 12 días, lo que los clasifica como los tratamientos de colonización más rápida. Cuantitativamente, T2 colonizó un 44% más rápido que T6 (7 vs. 13,25 días) y un 50,8% más rápido que T5 (7 vs. 14,25 días). De igual manera, T1 superó a T3 en un 16,7% (7,5 vs. 9 días) y a T5 en un 47,4% (7,5 vs. 14,25 días). T4, con 8 días de colonización, fue un 11% más lento que T2, pero aun así se mantuvo un 40% más rápido que T6.

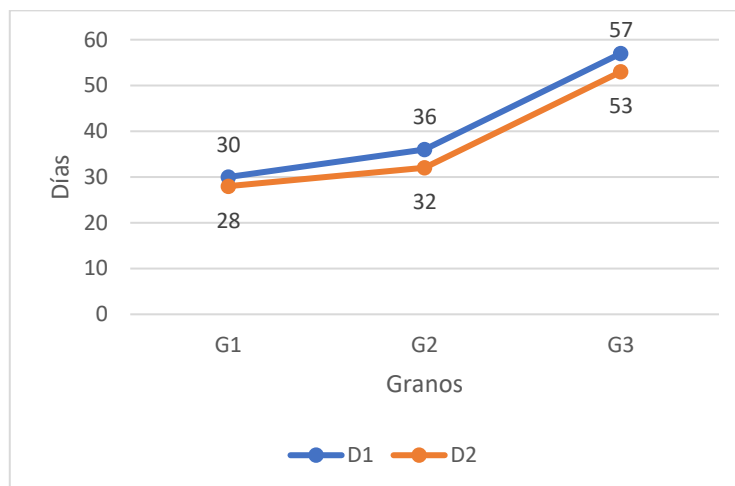
Cuadro N° 42: Cuadro doble entrada para el tiempo de colonización del hongo

DOSIS/GRANO	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	30	36	57	123	10,3
D2	28	32	53	113	9,4
SUMA	58	68	110	236,0	
MEDIA	7,3	8,5	13,8		

Fuente: Elaboración propia

El análisis del cuadro de doble entrada para el tiempo de colonización demostró que la dosis D2 presentó una media superior (9,4 días) respecto a D1 (10,3 días). En cuanto al tipo de grano, G1 registro (7.3 días) siendo el grano más eficaz en velocidad seguido del G2 registrando (8.5 días) mientras que G3 presentó los valores más bajos (13.8 días), lo que indica una baja influencia del sustrato en el desempeño del tratamiento.

Grafica 6: Interacción de dos factores en el tiempo de colonización a los 12 días



Fuente: Elaboración propia

En la interacción del tiempo de colonización representa que si existe una dependencia factor G y factor D que el crecimiento del hongo se comporta diferente en cada grano con dosificaciones distintas.

Cuadro N° 43: Análisis de varianza ANOVA para el tiempo de colonización

FV	GL	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	197,33				
Tratamientos	5	194,83	38,97	280,56	2,77	4,25
Error	18	2,50	0,14			
F.G	2	190,3	95,2	685,2	3,55	6,01
F. D	1	4,2	4,2	30,0	4,41	8,28
Inter G/D	2	0,3	0,2	1,2	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza ANOVA para el tiempo de colonización reveló diferencias altamente significativas entre los tratamientos para el crecimiento micelial, el cual

señala que existe una diferencia estadísticamente significativa donde se obtuvo la “F” calculada de los tratamientos mayor que “F” tabular al 5 % y al 1 %, como consecuencia dice que los tratamientos son distintos entre sí, la interacción de G/D demuestra que no existe diferencia significativa en la “F” tabular al 5% y al 1%.

Cuadro N° 44: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa en concentración de esporas

0,75	14,25	13,25	9	8	7,5	7
7	7,25**	6,25**	2*	1*	NS	0
7,5	6,75**	5,75*	1,5*	NS	0	
8	6,25**	5,25*	1*	0		
9	5,25*	4,25*	0			
13,25	1*	0				
14,25	0					

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 45: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T2	7 a
T1	7,50 ab
T4	8,00 b
T3	9,00 c
T6	13,25 d
T5	14,25 e

Fuente: Elaboración propia

En la prueba de TUKEY para la diferencia de medias de los tratamientos se tomará en cuenta el orden de los tratamientos será de menor a mayor ya que el hongo colonizo rápidamente en menos días, dando así el T2 y T1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas, T4 es diferente tanto al T2, pero no al T1, T3 es diferente a todos los tratamientos, T6 y T5 son diferentes.

Cuadro N° 46: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANOS	MEDIAS	0,75	13,8	8,50	7,3
G1	7,3 a	7,3	6,5**	1,2*	0
G2	8,5b	8,5	5,3*	0	
G3	13,8 c	13,8	0		

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 46 se observa la prueba de comparación de medias Tukey para el factor G, se concluye que existen diferencias significativas en el grano G1, G2, G3. El G1 presenta velocidad en el crecimiento logrando colonizar en 7,3 días.

Cuadro N° 47: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor D

DOSIS	MEDIAS	0,75	10,3	9,4
D2	9,4 a	9,4	0,9*	0
D1	10,3 b	10,3	0	0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 47 se observa la prueba de comparación de medias Tukey para el factor D, se concluye que existen diferencias significativas en las dosis. La D2 mejor que la D1 para interactuar con factor G.

3.3 Concentración de conidios/gramo

Cuadro N° 48: Evaluación de la concentración de esporas del hongo en cada grano al final del ensayo

CONIDIOS/ML						
Tratamientos	Replicas					
	I	II	III	IV	Σ	X
T1	90000000	107000000	93250000	111500000	401750000	100437500
T2	128000000	113500000	132500000	129750000	503750000	125937500
T3	119250000	128250000	122500000	127250000	497250000	124312500
T4	144000000	137750000	141250000	143500000	566500000	141625000
T5	322500000	357500000	302500000	305000000	1287500000	321875000
T6	617500000	730000000	630000000	587500000	2565000000	641250000
Σ	5752500000	5952500000	5827500000	6012500000	23545000000	

El conteo final de conidios mostró diferencias claras entre tratamientos. Los mayores rendimientos esporulados se observaron en los tratamientos con cebada ($T4 > T3$), seguidos por los tratamientos con arroz ($T2 > T1$). Al final de la distribución se ubicaron los tratamientos con maíz ($T6 > T5$), que presentaron las concentraciones más bajas.

Jiménez, E., & Pantoja, E., (2012) mencionan, para que un producto de *Trichoderma* sea viable y tenga un efecto antagonista consistente en campo, su concentración debe estar en el orden de 1×10^7 o 1×10^8 conidios/gramo. Todos los tratamientos indican una concentración mayor al 1×10^7 conidios/g, donde resalta T4 (cebada x dosis alta) con una concentración de $1,41 \times 10^8$.

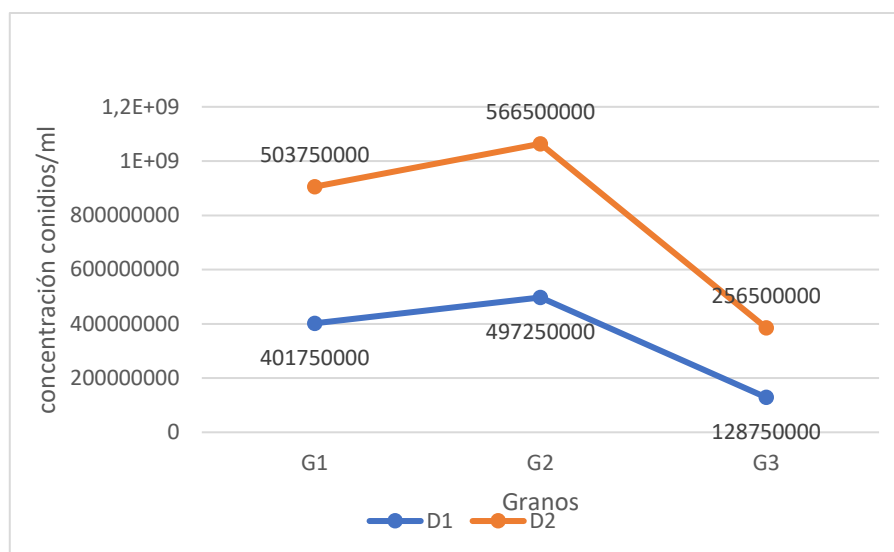
Cuadro N° 49: Cuadro doble entrada para la concentración de conidios/ ml

D / G	G1	G2	G3	SUMA	MEDIA
D1	401750000	497250000	128750000	1027750000	85645833,3
D2	503750000	566500000	256500000	1326750000	110562500,0
SUMA	905500000	1063750000	385250000	2354500000,0	
MEDIA	113187500,0	132968750,0	48156250,0		

Fuente: Elaboración propia

En este cuadro doble entrada para la concentración de conidios/ ml el G2 con D2 obtuvo la mayor concentración de conidios/ ml de G2 132968750,0 y D2 110562500,0 conidios/ ml. Siguiéndole el G1 con D1 y al final está el G3 siendo el menos eficaz con D1.

Grafica 7: Interacción de dos factores en concentración de conidios/ml



Fuente: Elaboración propia

Este patrón indica que, en las condiciones del experimento, el G2 con D2 favoreció la producción de conidios por encima del G1, lo que sugiere una interacción favorable entre las propiedades de la cebada y la fisiología de *Trichoderma sp.* para la esporulación. En cambio, el G3 mostró características menos propicias para la formación masiva de conidios.

Cuadro N° 50: Análisis de varianza ANOVA para la concentración de esporas del hongo

FV	G L	SC	CM	Fc	F T	
					5%	1%
Total	23	36196489583333300,0				
Tratamientos	5	35442677083333300,0	7088535416666670,0	169,2	2,77	4,25
Error	18	75381250000000,0	4187847222222,2			
F. G	2	31502723958333300,0	15751361979166700,0	376,1	3,55	6,01
F. D	1	3725041666666690,0	3725041666666690,0	88,9	4,41	8,28
Inter G/D	2	214911458333312,0	107455729166656,0	2,6	3,55	6,01

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza aplicado a la concentración de conidios mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados. La F calculada superó ampliamente a la F tabulada, lo cual confirma que existe un efecto real de los factores experimentales sobre la esporulación y que la variabilidad observada no se debe al azar. Este resultado demuestra que tanto el tipo de grano como la dosis de inóculo influyen de manera determinante en la concentración final de conidios maduros.

Cuadro N° 51: Prueba de medias TUKEY para diferencia significativa en concentración de esporas

12942715,7	141625000	125937500	124312500	100437500	64125000	32187500
	0	0	0	0	0	0
32187500	109437500				77500000	
	0	93750000	92125000	68250000	0	0
64125000	77500000	61812500	60187500	36312500	0	
100437500	41187500	25500000	23875000	0		
124312500	17312500	NF	0			
125937500	15687500	0				
125937500	0					

Fuente: Elaboración propia

Cuadro N° 52: Diferencia de medias de los tratamientos

TRATAMIENTOS	MEDIAS
T4	141625000 a
T2	125937500 b
T3	124312500 b
T1	100437500 c
T6	64125000 d
T5	32187500 e

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey permitió identificar diferencias significativas entre la mayoría de tratamientos. El tratamiento T4 conformó el grupo superior debido a su mayor producción de conidios. Los tratamientos T2 y T3 integraron un segundo grupo homogéneo, ya que no presentaron diferencias significativas entre sí. T1 se ubicó como tratamiento intermedio. Finalmente, T6 y T5 formaron los grupos inferiores, con T5 registrando la menor concentración de conidios.

Cuadro N° 53: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor G

GRANOS	MEDIAS	12942715,6 7	13296875 0	113187500, 00	48.156.250,0
G2	132968750 a	48156250	84812500	65031250	0
G1	113187500 b	113187500	19781250	0	
G3	48156250 c	132968750	0		

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro número 53 la prueba de Tukey permitió identificar diferencias significativas de factor G permitió categorizar a los granos con diferencias significativas cada uno diferente al otro G2 permaneciendo como mejor grano, segundo se encuentra el grano de G1 y por último el G3 menos eficiente.

Cuadro N° 54: Prueba de TUKEY para diferencia significativa de factor D

DOSIS	MEDIAS	12942715,67	110562500	85645833,33
D2	110562500 a	85645833,33	24916666,7	0
D1	85645833,3 b	110562500	0	0

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey permitió identificar diferencias significativas de factor D en dosificación la D2 presenta diferencias estadísticamente significativas a comparación de D1 siendo así que demuestra que D2 es la mejor dosis para hacer uso

3.4 Desarrollo del protocolo:

Los pasos más eficientes se sistematizaron para elaborar un protocolo final estandarizado los que son:

1. Preparación inicial del hongo
2. Preparación y esterilización del sustrato
3. Obtención y determinación de la concentración de conidios/gramo por hemocitometría.
4. Inoculación.
5. Control del crecimiento y agitación
6. Obtención del inóculo sólido

3.5 Discusión

En los estudios realizados por Allori-Stazzonelli et al. (2017), reportaron que *Trichoderma* en arroz logró colonización completa (100 %) en 10 días, equivalente a 140 cm² de superficie en su sistema de frascos. Que coincide cuantitativamente con los resultados obtenidos en T2 (arroz 10 ml), que alcanzó 145 cm² al día 9, siendo incluso un 10–12 % más rápido.

El análisis de la Concentración Final de Conidios reveló la inversión de la jerarquía de eficacia observada en la velocidad de crecimiento, siendo este el hallazgo más relevante. La Prueba de Tukey ubicó a T4 (Cebada + Dosis Alta) en el grupo de máxima eficiencia, con 1.42×10^8 , siendo 12.4% superior al T2 (Arroz), que registró 1.25×10^8 conidios/g. Este resultado es notable porque, aunque el arroz fue superior en velocidad de colonización, la Cebada demostró tener la composición nutricional más adecuada para la conversión de biomasa micelial en estructuras reproductivas. Este resultado sugiere que la Cebada provee la relación Carbono/Nitrógeno más favorable para la inducción de la esporulación en la cepa utilizada. La superioridad de la Cebada está respaldada por el hecho de que el T3 (Cebada + Dosis Baja) 1.24×10^8 también superó al T1 (Arroz + Dosis Baja), consolidando a la Cebada como el sustrato más eficaz para la esporulación.

Estudios realizados por Flores, A., Martínez, M., & García, C. (2018), demuestra que la concentración de $0.9\text{--}2.0 \times 10^8$ conidios/g, es válida como una concentración eficiente, donde la concentración más alta de la investigación realizada fue el T4(cebada x dosis alta).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Se logro realizar una selección y preparación de arroz, cebada y maíz permitió evaluar adecuadamente su desempeño como sustratos sólidos para la multiplicación de *Trichoderma sp.* Todos los granos soportaron el crecimiento del hongo, aunque mostraron comportamientos diferenciados. El arroz y la cebada presentaron una estructura física y composición nutricional más favorable para el establecimiento inicial del micelio, el maíz, pese a ser viable, mostró menor capacidad de colonización, debido a su endospermo compacto y menor accesibilidad nutritiva.
- La producción final de conidios observado en el crecimiento micelial. El tratamiento T4 (cebada + 10 ml) obtuvo la mayor concentración de conidios maduros (*Trichoderma sp.*), seguido por T2 (arroz + 10 ml). Pero en tiempo de colonización el T2 (arroz x 10 ml) fue el más rápido en colonizar todo el grano. La correlación entre concentración elevada y tiempo de colonización indica que los sustratos con mayor capacidad de retención de humedad y disponibilidad de nutrientes permiten un desempeño superior del hongo en ambas etapas. Así, la jerarquía final de eficiencia fue: T4 > T2 > T3 > T1 > T6 > T5.
- Se concluyó exitosamente con el desarrollo de un protocolo para la multiplicación de *Trichoderma sp.* utilizando grano de cebada, debido a que este sustrato presentó la mayor concentración de conidios, a pesar de requerir un mayor tiempo para completar la colonización del sustrato, estos resultados indican que, si bien el arroz favoreció una colonización más rápida, la cebada resultó más eficiente para la producción de inóculo, en este sentido, los resultados obtenidos contribuyen a la estandarización del protocolo de multiplicación de *Trichoderma sp.* y respaldan su replicabilidad bajo condiciones controladas de laboratorio.

4.2. RECOMENDACIONES

- Mantener controles estrictos de esterilización y manipulación, ya que la pureza del cultivo es determinante para la validez de los resultados. Se recomienda seguir prácticas de laboratorio que minimicen la contaminación, especialmente durante la inoculación.
- Estandarizar el método de conteo de conidios por hemocitometría, manteniendo las mismas diluciones y condiciones de observación, con el fin de obtener mediciones comparables entre lotes y entre futuros experimentos.
- Recomendar la adopción del Protocolo ya desarrollado como el método estándar de multiplicación en el laboratorio.
- Por último, se recomienda seguir realizando investigaciones sobre microorganismos benéficos que se utilizan en la agricultura.

