

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO
ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA TROPICAL**



**ETIOLOGÍA Y CONTROL DE LA MARCHITEZ EN PINO (*Pinus tecunumanii*),
MEDIANTE EL USO DE HONGOS BENÉFICOS DEL GÉNERO
Trichoderma spp. A NIVEL DE VIVERO LA CONVENCION – CUSCO**

Tesis presentada por el Bachiller:
GABRIEL CHÁVEZ CHIRINOS,
para optar al título profesional de
INGENIERO AGRÓNOMO
TROPICAL

Asesor:
M.Sc. Luis Justino Lizarraga
Valencia.

Cusco - Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo cada segundo de mi vida.

A mis padres Damián Muñoz Monje y Josefina Chirinos Ochoa por su gran apoyo en la culminación de mi carrera.

A Leticia Burquez Viteri, mi esposa, amiga y compañera, por su gran amor.

AGRADECIMIENTO

- A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, en especial a la Escuela Profesional de Agronomía Tropical y a todos los docentes por compartir sus conocimientos y contribuir en mi formación profesional.
- Al M.Sc. Luis Justino Lizarraga Valencia, por su asesoramiento de la presente investigación.
- A la Dra. Fanny Márquez Romero, por sus sugerencias de la presente investigación.
- A la Clínica de Diagnóstico de la UNALM, por facilitarme las cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma lignorum*.
- A mis compañeros y amigos de la carrera, por su apoyo en las labores del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	2
1.1. Identificación del problema	2
1.2. Formulación del problema	3
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
2.3. Justificación	4
III. HIPÓTESIS	6
3.1. Hipótesis general	6
3.2. Hipótesis específicos	6
IV. MARCO TEÓRICO	7
4.1. Antecedentes	7
4.2. Características del pino	8
4.2.1. Taxonomía botánica	8
4.2.2. Características botánicas	9
4.2.3. Distribución geográfica	10
4.2.4. Ecología	10
4.2.5. Experiencias de plantaciones de <i>Pinus tecunumanii</i>	11
4.3. <i>Fusarium</i> sp.	12
4.3.1. Antecedentes e importancia de la enfermedad	12
4.3.2. Características morfológicas	13
4.3.3. Ciclo de la enfermedad	14

4.3.4. Ecología	16
4.3.5. Diseminación	17
4.4. <i>Trichoderma</i> spp en el control biológico de fitopatógenos	17
4.4.1. Morfología y taxonomía	18
4.4.2. Ecología	19
4.4.3. Modo de acción de <i>Trichoderma</i> spp.	20
4.4.4. <i>Trichoderma harzianum</i>	21
4.4.5. <i>Trichoderma viride</i>	21
V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	22
5.1. Tipo de investigación	22
5.2. Ámbito de investigación	22
5.2.1. Ubicación espacial	22
5.2.2. Ubicación política	22
5.2.3. Ubicación geográfica	22
5.2.4. Ubicación hidrográfica	22
5.2.5. Ubicación temporal	23
5.2.6. Ubicación ecológica	23
5.3. Materiales	23
5.3.1. Material biológico	23
5.3.2. Materiales de campo	23
5.3.3. Materiales de laboratorio	24
5.4. Métodos	25
5.4.1. Identificación del agente causal de la marchitez en pino (<i>Pinus tecunumanii</i>), a nivel de género	25
5.4.2. Determinación del desarrollo micelial de los hongos benéficos (<i>Trichoderma</i> spp.) y del patógeno a nivel “ <i>in vitro</i> ”.	26
5.4.3. Determinación del porcentaje de antagonismo de los hongos benéficos (<i>Trichoderma</i> spp.) frente al patógeno en la prueba de enfrentamiento a nivel “ <i>in vitro</i> ”.	27
5.4.4. Determinación del porcentaje de control de los hongos benéficos (<i>Trichoderma</i> spp.) sobre el patógeno en condiciones de vivero.	29

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Identificación del agente causal de la marchitez en pino (<i>Pinus tecunumanii</i>), a nivel de género	32
6.2. Determinación del desarrollo micelial de los hongos benéficos (<i>Trichoderma</i> spp.) y del patógeno a nivel “ <i>in vitro</i> ”.	35
6.3. Determinación del porcentaje de antagonismo de los hongos benéficos (<i>Trichoderma</i> spp.) frente al patógeno en la prueba de enfrentamiento a nivel “ <i>in vitro</i> ”.	39
6.4. Determinación del porcentaje de control de los hongos benéficos (<i>Trichoderma</i> spp.) sobre el patógeno en condiciones de vivero.	45
VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	51
7.1. Conclusiones	51
7.2. Sugerencias	52
VIII. BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	58

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en La Provincia de la Convención, el Distrito de Maranura – Sector Mandor durante los meses de Enero a Junio del 2019, con el objetivo de identificar el agente causal y evaluar el efecto de control de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), mediante el uso de hongos benéficos del género *Trichoderma* spp. a nivel de vivero. El diseño experimental empleado fue el DCA. Se realizó el análisis de varianza y la prueba de comparaciones de medias Tukey, con niveles de significación 0.05 y 0.01 con el programa de análisis estadístico SAS (versión 8). Al realizar la identificación del agente causal a través del microscopio se determinó que el patógeno presentaba macroconidias, microconidias y colonia de color purpura, el cual fue ubicado en el género *Fusarium* sp. Se evaluó el desarrollo micelial (mm) de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) y del patógeno (*Fusarium* sp.) a nivel “in vitro” encontrándose diferencias significativas entre tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre promedios de tratamientos con un coeficiente de variabilidad de 6.38%, para el porcentaje de antagonismo de los *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp. a nivel “in vitro”. Al evaluar el porcentaje de control de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp. a nivel de “vivero”, se puede observar el máximo número de plantas sanas (100%) al finalizar. Por lo tanto, se concluye: 1. Se determinó e identifico que el agente causal corresponde al género *Fusarium* sp. 2. A nivel “in vitro” *Trichoderma viride* presento mayor desarrollo micelial y cubrimiento total de la placa petri a las 58 horas después de la siembra que el patógeno de *Fusarium* sp. 3. “in vitro” *Trichoderma viride* demostró un alto nivel de antagonismo hacia *Fusarium* sp., inhibiendo su crecimiento e invadiendo con su micelio en la totalidad de la placa petri. 4. En “vivero” *Trichoderma viride* demostró ser un mejor biocontrolador para *Fusarium* sp., obteniendo así un mayor número de plantas de pino sanas.

Palabras clave: Antagonismo, *Trichoderma*, inoculo, marchitez.

INTRODUCCIÓN

En la Provincia de la Convención, se incrementa anualmente la cantidad de proyectos de reforestación y con esto se aumenta la probabilidad de ocurrencia de enfermedades; actualmente las plantaciones forestales son vulnerables al ataque de enfermedades, esto podría ser la causa en el futuro, de graves pérdidas económicas a los productores forestales, debido a los altos costos que significa el control, lo extenso de las áreas de aplicación y prolongado tiempo que lleva obtener productos maderables. Las enfermedades pueden causar diversos daños a las plántulas (pérdidas,) las cuales aún no han sido identificadas en la producción de especies forestales bajo condiciones de vivero; considerándose necesario poseer conocimiento de la diversidad de agentes patógenos que pudieran afectar a las especies forestales, para poder diseñar programas o estrategias de control; teniéndose en cuenta que el manejo debe ser sostenido, de tal manera que se fomenten más plantaciones.

Por lo expuesto, se consideró necesario realizar el presente trabajo de investigación a fin de identificar al patógeno involucrado en el desarrollo de la enfermedad; así como, desarrollar metodologías eficientes para solucionar el problema.

I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

1.1. Identificación del problema

El mayor problema fitosanitario en los viveros, es una enfermedad conocida como el complejo *damping-off* (mal del semillero, marchitez de la planta, mal del talluelo, ahogamiento, chupadera y pudrición de raíces). Ocasionado por un complejo de hongos del suelo, y destacan: *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Fusarium* spp. La enfermedad de la marchitez en pino en los viveros de la provincia de la Convención es causada principalmente por especies de *Fusarium*, ocasionando alta incidencia a nivel de viveros forestales. Se presenta en pre y post-emergencia, donde el hongo daña al embrión antes de germinar y hay necrosis de hipocótilo y cotiledones, o en post-emergencia, cuando el hongo causa estrangulamiento del tallo, a nivel del suelo, y muerte de la planta. El daño tardío se manifiesta durante el desarrollo de la planta, principalmente cuando el tallo aún no está lignificado, causando pudrición de raíz y doblamiento de la plántula, se manifiesta como un color rojizo en las acículas y la raíz presenta un color café.

El patosistema de la marchitez del pino, es un subsistema agrícola de interrelación. Es decir; está constituido por un hospedante susceptible (*Pinus tecunumanii*), un patógeno virulento (*Fusarium* spp.) y un ambiente favorable (Provincia de La Convención), para la manifestación de la enfermedad en el tiempo y espacio (Agrios, 1996).

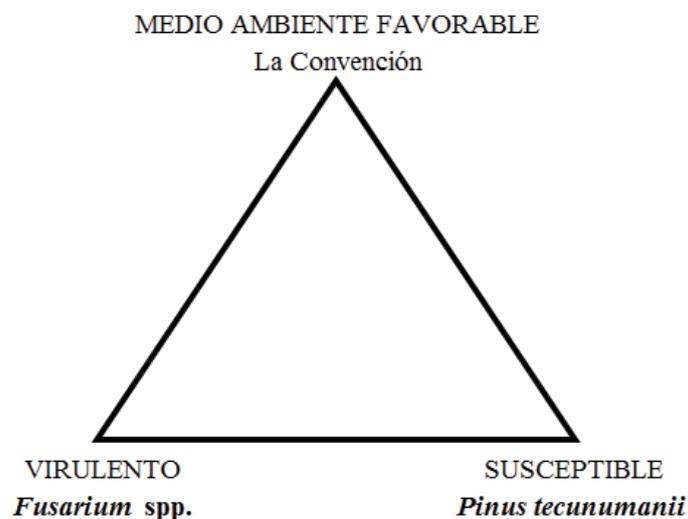


Figura 1: Patosistema de la Marchitez en Pino.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Como es la etiología y control de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), mediante el uso de hongos benéficos del género *Trichoderma* spp.; a nivel de vivero, La Convención – Cusco?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál será la identificación del agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), a nivel de género?
- ¿Cómo se determinará el desarrollo micelial de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) y del patógeno a nivel “in vitro”?
- ¿Cómo se determinará el porcentaje de antagonismo de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) frente al patógeno en la prueba de enfrentamiento en condiciones “in vitro”?
- ¿Cómo se determinará el porcentaje de control de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) sobre el patógeno en condiciones de vivero?

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Objetivo general

Identificar el agente causal y evaluar el efecto de control de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), mediante el uso de hongos benéficos del género *Trichoderma* spp.; a nivel de vivero.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar el agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), a nivel de género.
- Determinar el desarrollo micelial de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) y del patógeno a nivel “in vitro”.
- Determinar el porcentaje de antagonismo de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) frente al patógeno en la prueba de enfrentamiento a nivel “in vitro”.
- Determinar el porcentaje de control de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) sobre el patógeno en condiciones de vivero.

2.3. Justificación

El control biológico se presenta como una alternativa eficaz, esperanzadora y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso de los productos químicos biocidas, para el control del patógeno en estudio. Así mismo, el control biológico por definición, consiste en la aplicación de técnicas compatibles con la conservación del medio ambiente mediante el uso de los enemigos naturales, que actuando de un modo natural, controlan el nivel poblacional de las distintas enfermedades y plagas sin ocasionar problemas de contaminación ni de residuos químicos. El método de control biológico impide la incidencia de enfermedades en las plantaciones agrícolas y por consiguiente la pérdida de altos niveles de producción;

así mismo, se presenta como una buena alternativa económica pues su costo es menor frente a un producto químico, además de ello; se puede mencionar que un aumento en la frecuencia de aplicación de estos productos no ocasiona cuerpos de resistencia, debido a que está dirigido a blancos específicos siendo de esta manera su espectro de acción estrecha, y no dañino a los insectos benéficos.

III. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis general

El control de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), está en función al efecto del uso de hongos benéficos del género *Trichoderma* spp.; a nivel de vivero.

3.2. Hipótesis específicos

- ¿El agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*) es causado por *Fusarium* sp.?
- ¿*Trichoderma* spp. logra mayor desarrollo micelial frente al agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*)?
- ¿*Trichoderma* spp. presenta mayor porcentaje de antagonismo frente a agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), a nivel “in vitro”?
- ¿*Trichoderma* spp. logra un mayor porcentaje de control en condiciones de vivero?

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Antecedentes

Delgado (2009), menciona en su trabajo de investigación “Identificación de agentes causantes de enfermedades en plántulas forestales, en Fondebosque – Juan Guerra-San Martín”, realizado en el periodo 2008 – 2009; llegando a las siguientes conclusiones:

- Los síntomas que caracterizaron a las enfermedades fungosas diagnosticadas fueron: manchas amarillentas, necróticas, secamiento, lesiones y clorosis en hojas, ahogamiento, chupadera, muerte descendente en plántulas.
- Según los síntomas observados, aislamientos de los patógenos, características de las estructuras, se identificaron los siguientes patógenos en plántulas de especies forestales: *Armillaria* sp., *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocladium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Phyllosticta* sp., *Rhizoctonia* sp.
- Según la prueba de patogenicidad el hongo identificado que se comportó como patógeno con un mayor número de hospedantes fue *Phyllosticta*, resultando positivo en las siguientes especies: Capirona (*Calycophyllum spruceanum*), Cedro Rosado (*Acrocarpus fraxinifolius*), Bolaina (*Guazuma crinita*), Paliperro (*Vitex seudolia*), Shaina (*Columbrina Glandulosa*) y Teca (*Tectona grandis*).
- En el análisis de sustrato se encontró: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Verticillium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp.

Bazán (1965), menciona en su trabajo de investigación “La Chupadera fungosa de los pinos en almácigos peruanos”, llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones Forestales, Lima - Perú; llegó a las siguientes conclusiones:

- La chupadera fungosa del *Pinus radiata* en los viveros de los alrededores de Lima, es producida por la acción simultánea de los hongos *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium* sp y *Pythium* sp.
- El hongo *Rhizoctonia solani* es el más patógeno de los tres, ya que aisladamente impide la germinación de la semilla y produce la muerte inmediata de las pocas plantas que llegan a emerger del suelo.
- Los hongos *Fusarium* sp. y *Pythium* sp., ocasionan especialmente la muerte de las plantas en la fase de post-emergencia. El *Pythium* sp. limita también en cierto grado la germinación de la semilla.

Gordon *et al.* (2015), Mencionan en su trabajo de investigación “Efecto de *fusarium circinatum* en la germinación y crecimiento de plántulas de *pinus greggii* en tres sustratos”, llevado en el periodo de 16 de noviembre al 31 de diciembre 2015, en el Vivero Forestal Militar de Atlangatepec, Tlaxcala-México; concluyendo que *Fusarium circinatum* se identificó mediante morfología, evaluación molecular y pruebas de patogenicidad en semilla, como el agente causal de la secadera y pudrición de raíz en *Pinus greggii*. La presencia de este patógeno reduce significativamente la germinación de las semillas. El sustrato a base de aserrín retarda la incidencia de la enfermedad por *Fusarium circinatum* en *Pinus greggii*.

4.2. Características del *Pinus tecunumanii*

4.2.1. Taxonomía botánica

Melo (2010), menciona que según el sistema de clasificación filogenética de las plantas, propuestas por A. Cronquist en 1979, el pino pertenece a:

Nombre Científico : *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf. Ex Eguiluz& J.P. Perry

Nombre común : Pinabete (Honduras), pino ocote (Guatemala), pino rojo (Nicaragua)

Familia : Pinaceae Lindl.

Sinónimos : *Pinus patula*, *Pinus oocarpa* var. *Ochoterenae* Martínez.

4.2.2. Características botánicas

Cerda (2007), indica que el pino en sus partes morfológicas presentan las siguientes características:

Hojas: Aciculadas, normalmente agrupadas en fascículos de 3 ó 4 agujas, raramente presentan 2 ó 5, persistentes en el árbol por 2 a 4 años, de 20 cm por lo general, aunque alcanzan longitudes entre 15 y 30 cm, son flexibles y péndulas de color verde - azulado, brillantes, con los bordes finamente aserrados y dos haces fibrovasculares. Las vainas de las acículas son de color ceniza, persistentes y de 1,5 cm de largo. Las yemas terminales son largas, erguidas y amarillentas.

Flores: Estróbilos unisexuales sobre el mismo árbol. Las inflorescencias femeninas son de color púrpura, principalmente laterales, pedunculadas, solitarias o en pequeños racimos de hasta ocho escamas, con pequeñas espinas deciduas. Las inflorescencias masculinas son amentos, ubicados en la parte terminal de las ramas, de color verde cuando jóvenes y amarillos al madurar, de hasta 1,0 cm de diámetro, agrupadas alrededor del nuevo brote y aparecen con las nuevas hojas.

Frutos: Conos en forma ovoide a cónico, duros, puntiagudos, asimétricos, curvados en el extremo, persistentes en el árbol, de 4,0 a 12,0 cm de largo por 2,5 a 5,0 cm de diámetro, dispuestos en pedúnculos cortos hasta de 1,5 cm y, frecuentemente agrupados de tres a siete; los conos son solitarios si se presentan en las ramas gruesas o sobre el tronco. Las escamas que recubren los frutos son redondeadas, con espinas deciduas, gruesas, de 2,0 cm de largo por 1,0 cm de ancho y se abren periódicamente.

Semillas: Pequeñas, casi triangulares, de color marrón a negruzcas, de 3,0 a 5,0 mm de longitud, el ala que las recubre tiene 2,0 cm de largo y 1,0 cm de ancho, con líneas negruzcas engrosadas al final.

La madera: Posee una densidad anhidra mediana de 0,48 g/cm³ y una densidad básica de 0,43 g/cm³. La madera es blanda, recién cortada presenta olor agradable a resina, de color ligeramente amarillento, de durabilidad natural baja; debido a la susceptibilidad al ataque insectos xilófagos y de hongos que descomponen la madera. Se seca relativamente bien, tanto al aire libre como en el secado artificial, lo que permite que sea ampliamente utilizada como madera de aserrío; cuando se seca al aire tiende a presentar ligeras torceduras. Es de fácil preservación por los métodos de inmersión, baño caliente-frío y vacío presión, lo cual permite utilizarla en construcción, como tablilla para pisos, postes de transmisión de energía y telefónicos.

4.2.3. Distribución geográfica

FAO (2005), refiere que la distribución del *Pinus tecunumanii* parece estar determinada por la geología y la precipitación. La distribución natural del *Pinus tecunumanii*, es principalmente en las montañas centrales de Guatemala. También se les encuentra en los estados de Oaxaca y Chiapas, al sur de México, norte de El Salvador, Sudeste de Honduras y Noreste de Nicaragua.

4.2.4. Ecología

FAO (2005), indica que *Pinus tecunumanii* se le encuentra entre los 440 hasta 2800 m.s.n.m. Frecuentemente se le encuentra en valles fértiles o cañones de los ríos, formando pequeños rodales puros o asociada a las especies de: *Pinus ayacahute* Ehreb, *Pinus oocarpa* Schiede, *Pinus pseudostrobus* Lindl., *Cupressus sp.*, *Liquidambar styraciflua* L. y raramente con *Abies sp.* y *Quercus spp.* En tierras altas tiende a fusionarse con *Pinus maximinoi* Moore y bosques de latifoliadas, en sitios más bajos con *Pinus caribaea*. Las condiciones del hábitat son un poco restringidos a las montañas

subtropicales con precipitaciones anuales de 1, 800 a 2, 400 mm. Con temperatura media anual de 14 °C y humedad relativa de +- 80 %. A pesar de que también se ha encontrado en sitios con precipitación de 790 a 2200 mm y temperaturas de 14 a 25 °C., puede crecer tanto en áreas donde llueve todo el año así como en sitios con estaciones secas de hasta seis meses.

CATIE (1997), menciona que habita en una gran variedad de suelos, desde los rojos arcillosos hasta los suelos profundos de origen volcánico, los cuales son ligeramente ácidos, con un pH de 4.5 a 5.5. Los mejores rodales fueron encontrados en los suelos más fértiles y bien drenados. Sin embargo, algunos fenotipos de calidad crecen en suelos arcillosos y pobres en materia orgánica.

4.2.5. Experiencias de plantaciones de *pinus tecunumanii*

FAO (2005), indica que *Pinus. tecunumanii* ha sido plantado en muchos países de los trópicos y subtropicos, originalmente en ensayos de adaptación y evaluación de procedencias y progenies y luego se han establecido grandes plantaciones. Los países con los mayores programas de evaluación son Australia, Brasil, Colombia, Malawi, Swazilandia, Venezuela y Zimbabwe.

Palomino *et al.* (1991), mencionan que en el Perú durante los años 1980- 1982 con el apoyo de la GTZ (Gobierno Alemán), se hicieron ensayos experimentales con diferentes pinos, eucalyptus, cupresus, obteniendo buenos resultados con el *Pinus tecunumanii*, es por ello que FONDEBOSQUE está promocionando la reforestación con esta especie originaria de Nicaragua. No hay estudios de la zona sobre problemas fitopatológicos del pino.

Quispe (2017), indica que en la actualidad, en el valle de La Convención con su capital Quillabamba, la provincia más grande de la Región Cusco integrada por distritos como Maranura, Santa Ana, Echaratí, Quellouno, Huayopata, Ocobamba, Vilcabamba, Quimbiri y Pichari, ubicado a una altitud promedio de 1050 msnm, con condiciones

edafoclimáticas similares a la de Selva Central, es la zona donde se viene estableciendo grandes plantaciones de *Pinus tecunumanii* con singular éxito.

4.3. *Fusarium* sp.

Garcés *et al.* (2001), mencionan que *Fusarium* sp. es uno de los hongos más comunes del suelo, siendo altamente variable en su patogenicidad y muy activo bajo un amplio rango de condiciones ambientales. También denominado hongo cosmopolita ya que se presenta principalmente como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado, denominado forma especial (f. sp.), según la planta hospedante u hospedantes relacionados que afecte; existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas. El taxón forma especial (f. sp) corresponde a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedante específico. Se observa una muy alta especialización en las plantas hospedantes que puede atacar. Esta selectividad patogénica de las formas especiales de *Fusarium* sp. se debe a que solamente las plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo y, por lo tanto, éste solamente puede crecer y desarrollarse en ese tipo de plantas.

4.3.1. Antecedentes e importancia de la enfermedad

Espino (2002), menciona que debido a su condición de especie perenne, los microorganismos patógenos tienen mayores posibilidades de establecerse e interactuar con la planta, formando complejos de enfermedades que resultan difíciles de controlar.

Pizarro (2002), indica que la marchitez en condiciones de vivero es la enfermedad más ampliamente distribuida en el mundo. Diversas especies del genero *Fusarium* sp. han sido mencionados como posibles causantes de la marchitez. Las más comunes son *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium moniliforme* Sheldon y *Fusarium culmorum* . La

amplia distribución de la mayoría de las poblaciones de *Fusarium* sp probablemente puede ser atribuida a factores como la habilidad de colonizar un amplio rango de sustratos y su eficiente mecanismo para dispersarse en el tiempo y/o en el espacio. Estos dos factores también contribuyen a su habilidad de adaptarse fácilmente a nuevos nichos ecológicos creados por el hombre. De esta manera los integrantes patogénicos de estas especies son particularmente difíciles de eliminar de suelos infestados, porque persisten en diferentes condiciones en el suelo, desarrollando estructuras de conservación y colonizando otras plantas no susceptibles.

4.3.2. Características morfológicas

Arbelaez (2000), refiere que se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa- dextrosa agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias. Además, de tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Las microconidias son esporas unicelulares o bicelulares, sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman en fialidas cortas no ramificadas, nunca en cadena, pero agrupadas en falsos capítulos, son las conidias que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Por otro lado, es el tipo de conidias que el hongo forma con más frecuencia en el interior de los vasos de las plantas hospedantes.

Agrios (1996), menciona que las macroconidias, son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula basal atenuada; se forman al principio en fialidas individuales, luego en esporodoquios. Son las conidias típicas de *Fusarium* sp, aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido

destruidas por el patógeno. Finalmente, las clamidosporas son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes. Las clamidosporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y son las principales responsables de la sobrevivencia del hongo en tejidos muertos de plantas hospedantes o en el suelo.

4.3.3. Ciclo de la enfermedad

Agrios (1996), menciona que las marchiteces debidas a *Fusarium* sp son enfermedades típicas del suelo, y en él la principal fuente de inóculo. *Fusarium oxysporum* es un saprofito abundante y activo del suelo y la materia orgánica. Su capacidad saprofítica le permite sobrevivir en el suelo entre los cultivos; en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo, en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de conidias, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, sobre todo en las regiones templadas y frías. Las clamidosporas en el suelo están bajo la influencia de la fungistásis, y, por esto, pueden persistir de forma inactiva por largos periodos, la fungistásis puede revertirse si hay en el suelo disponibilidad de nutrientes como los provistos por los exudados radiculares de plantas hospederas y no hospederas, así como por la proximidad de tejidos frescos no colonizados por ejemplo en la proximidad de partes jóvenes de raíces. La clamidospora germinada da lugar a inóculo al formar hifas, conidias y nuevas clamidosporas; en este aspecto las cepas del patógeno se comportan igual que otras especies de *Fusarium* sp. entre ellas las cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum*. En la rizósfera hay una competencia intensa con otros microorganismos y en particular con otros *Fusarium* sp., aunque muchas cepas de *Fusarium oxysporum* son capaces de penetrar en los tejidos corticales de la raíz las cepas específicas de huésped son las únicas capaces de penetrar hasta el tejido vascular y causar marchitez. Cuando las plantas sanas se desarrollan en suelo contaminado la penetración por los tubos germinativos de las esporas o el micelio directamente tiene lugar principalmente en la zona de elongación de la raíz y puede facilitarse por heridas o ataques de nemátodos

(especialmente por especies de *Meloidogyne* sp); *Fusarium oxysporum* se mantiene exclusivamente en los vasos, ingresando a través de las punteaduras, y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, cuando se encuentra en los vasos el micelio se propaga intercelularmente ramificándose y produciendo microconidias que son desprendidas y llevadas hacia la parte superior de la planta, en el torrente de agua. Las microconidias germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidias en el siguiente vaso. En estadios posteriores sigue extendiéndose al tejido adyacente causando necrosis visibles exteriormente

Pizarro (2002), indica que la patogénesis está relacionada con el bloqueo de los vasos por el micelio, conidias, gomas, geles y tilosas, así como por la proliferación de células parenquimatosas adyacentes que alteran el transporte de agua en la planta. También se atribuye la marchitez a toxinas, enzimas hidrolíticas y desbalances en la producción de reguladores de crecimiento de raíces.

Agrios (1996), menciona que una combinación de los procesos tratados anteriormente (la obstrucción de los vasos por el micelio, conidias, geles, gomas y tilosas, así como la presión que ejerce la proliferación de las células parenquimatosas adyacentes) se debe a la alteración en la economía del agua de las plantas infectadas, cuando el volumen de agua disponible para las hojas es inferior al mínimo requerido para su funcionamiento, los estomas se cierran, las hojas se marchitan y mueren y, como consecuencia, muere el resto de la planta. El hongo invade entonces gran escala de tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y allí esporula profusamente. Las conidias son diseminadas hacia nuevas plantas o áreas por medio del viento, el agua y otros factores. En ocasiones el hongo llega a los frutos de las plantas infectadas y penetra o contamina las semillas. Esto sucede principalmente cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, condiciones que permiten a las plantas producir buenas cosechas aunque sean infectadas por el hongo. Sin embargo, es frecuente que los frutos infectados son tan ligeros que se eliminan durante los métodos de extracción y

limpieza de las semillas, lo cual hace que casi no tengan importancia alguna en la propagación del hongo.

4.3.4. Ecología

Arbelaez (2000), indica que *Fusarium* sp. está ampliamente distribuido en el suelo, en las partes aéreas y subterráneas de las plantas, desperdicios de plantas, y otros substratos orgánicos y está ampliamente diseminado en regiones tropicales y templadas. Los *Fusarium* sp. causantes de marchitez pueden también invadir y colonizar plantas que no son huéspedes, en las que causan síntomas leves; estos portadores asintomáticos que contribuyen al transporte y multiplicación del inóculo. También es encontrado en los desiertos, cordilleras y las áreas del ártico, donde prevalecen condiciones de clima desagradables. Este hongo se va favoreciendo por altas temperaturas, dentro de un rango de 25 a 30°C. Este hongo puede permanecer hasta 7 u 8 años o indefinidamente en el suelo, saprofiticamente o como clamidospora.

Marquina y Plasencia (1990), indican que los tejidos de la raíces del pino producen sustancias de actividad alelopática, las cuales afectan su propio crecimiento. Dichas sustancias, pueden predisponer a la planta a la infección de *Fusarium* sp. por efectos fisiológicos o bioquímicos. Esto puede deberse a que más sitios en las raíces del pino son colonizadas por *Fusarium* sp. en presencia de las toxinas, o bien, que el hongo se puede dispersar con mayor rapidez luego que la penetración ha tenido a lugar y las raíces son expuestas a las toxinas. Los suelos arenosos son favorables al hongo al igual que los niveles extremos de humedad en el suelo. Algunas condiciones como el estrés en la planta incrementan la incidencia y la severidad de la infección causada por *Fusarium* sp. El estrés puede ser causado por sequía, daño de insecto a raíces y follaje, exceso de humedad en el suelo. Las condiciones climáticas, más importantes para el desarrollo de las especies de *Fusarium* sp. son: altas temperaturas en el rango de los 20-25° C, alta intensidad lumínica, elevada humedad relativa del ambiente (75-95%) y alta densidad de plantas. En el manejo del cultivo, las altas dosis de fertilización nitrogenada, predisponen a las plantas a un ataque de *Fusarium* spp. Esto último, condiciona que las plantas estén

más turgentes y sus barreras naturales no están muy lignificadas, lo que las hace más susceptibles al ataque de las plagas.

4.3.5. Diseminación

Pizarro (2002), refiere que al morir la planta, el hongo queda en los restos de los tejidos vegetales invernando como espora, micelio o clamidospora y la diseminación de patógeno puede ser por semilla infectada, por el agua de riego o por el escurrimiento superficial producido por el riego o las lluvias. Además, se puede transportar durante algunas labores del cultivo al movilizar suelo de un lugar a otro, por medio de algunos insectos del suelo.

4.4. *Trichoderma* spp. en el control biológico de fitopatógenos

Biocontrol (2003), menciona que *Trichoderma* spp. es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenece a la subdivisión Deuteromicete (grupo que se caracteriza por presentar o no un estado sexual determinado). Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos especialmente en aquellos que son afectados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* spp la posibilidad de ser utilizado en la industria de la biotecnología.

4.4.1. Morfología y taxonomía

Villegas (2005), indica que *Trichoderma* spp. es un tipo de hongo anaerobio facultativo, que pertenece a:

Reino	: Fungi
División	: Mycota
Subdivisión	: Eumycota
Clase	: Deuteromicetes
Orden	: Moniliales
Familia	: Moniliaceae
Género	: <i>Trichoderma</i>

Trichoderma spp. se caracterizan por no poseer o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas.

Pérez (2002), menciona que microscópicamente muchas especies del género crecen rápidamente en cultivos artificiales y produce un largo número de pequeñas conidias verdes o blancas de células conidiogénicas situadas al final de conidióforos extensamente ramificados. Esta característica permite una relativa fácil identificación de *Trichoderma* spp. como género, pero el concepto de especies es difícil de interpretar. El género *Trichoderma* spp. en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de rápido desarrollo en medios sintéticos. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas. El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10 μm de ancho.

Humeres (2004), menciona que la mayoría de las especies de *Trichoderma* spp presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo. Las clamidosporas recién formadas presentan más de 75 % de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (>75 %) y temperatura (28-30 °C). Debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* spp produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios.

4.4.2. Ecología

Rodríguez (1990), refiere que las especies de *Trichoderma* spp. se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confieren a *Trichoderma* spp. la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos.

Pérez (2002), menciona que varios estudios han evaluado el efecto de la temperatura en la germinación de las esporas y el crecimiento del tubo germinal, crecimiento del micelio, habilidades competitivas y producción de metabolitos volátiles y no volátiles en las especies de *Trichoderma* spp. estableciendo que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre las diferentes especies; sin embargo al igual que la gran mayoría de los hongos, estos se desarrollan en rangos de temperatura mesofílicos entre 10 °C y 40 °C, pero en la mayoría de los casos, la temperatura óptima se encuentra entre 15 y 30 °C.

Rojo *et al.* (2006), indican en cuanto a la disponibilidad de agua, 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 del sustrato empleado, sin embargo, el contenido de agua en el sustrato por lo general oscila entre el 30 y el 75 %.

Stefanova *et al.* (1999), refieren que el pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 2 a 6 con un 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.

Tronsmo y Gordon (1998), mencionan que su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control. De igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos.

4.4.3. Modo de acción de *Trichoderma* spp.

Biocontrol (2003), indica que el entendimiento de la diversidad genética de cada cepa dentro de las especies de *Trichoderma* spp. y sus mecanismos de biocontrol ha permitido mejorar la aplicación de las diferentes cepas. Estos mecanismos son diversos, complejos y pueden actuar sinérgicamente para lograr el control de enfermedades. En la acción biocontroladora de *Trichoderma* spp. se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno. Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* spp. para colonizar la rizósfera de las plantas. *Trichoderma* spp. presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que elicitán o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia), con la

detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad, además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés.

4.4.4. *Trichoderma harzianum*

Galeano *et al.* (2002), indican que los mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum* se basan en el principal papel como promotor de crecimiento vegetal. *Trichoderma harzianum* se asocia a las raíces de la planta proporcionándole un mayor vigor y crecimiento. Este hongo crece a medida que lo hace el sistema radicular del vegetal con el que se encuentra asociado, alimentándose de los productos de desecho y de exudados que excreta la planta. Esta a su vez se beneficia al poder colonizar mayor cantidad de suelo gracias al sistema de hifas del hongo, aumentando considerablemente de esta manera el crecimiento de la planta. Por ello, se produce un aumento de la captación de nutrientes y de agua en las raíces, ya que explora mayor volumen de suelo, y a su vez, incrementa la solubilización de nutrientes orgánicos como el fósforo. Este mayor vigor a su vez le proporciona a la planta una mayor tolerancia frente a diferentes tipos de estrés tanto abióticos (fertilización, salinidad, riegos y condiciones climáticas no-óptimas como sequía, temperaturas altas, etc) como bióticos (patógenos).

4.4.5. *Trichoderma viride*

Camargo y Ávila (2013), manifiestan que es un organismo antagonista de hongos presentes en el suelo y es altamente efectiva para el control de las semillas y el suelo de enfermedades transmitidas por mayoría de los cultivos de importancia económica, especialmente legumbres y semillas oleaginosas. Este hongo cuando se aplica junto con las semillas, coloniza las mismas, se multiplica; y no sólo mata a los patógenos presentes en la superficie de la semilla, sino que también brinda protección al suelo de agentes patógenos.

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

5.1. Tipo de investigación: Experimental

5.2. Ámbito de investigación

5.2.1. Ubicación espacial

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en dos fases: La fase “in vitro” se realizó en el laboratorio de producción de hongos antagonistas y entomopatógenos, ubicada en la ciudad de Quillabamba. La fase de vivero se realizó en el sector de Mandor – Maranura.

5.2.2. Ubicación política

Región : Cusco
Provincia : La Convención
Distrito : Maranura
Localidad : Mandor

5.2.3. Ubicación geográfica

Coordenadas UTM : X: 743543
Y: 8572951
Latitud Sur : 12°53'30''
Longitud Oeste : 72°44'00''
Altitud : 990 m

5.2.4. Ubicación hidrográfica

Cuenca : Vilcanota

5.2.5. Ubicación temporal

Inicio : Febrero 2019

Finalización : Junio 2019

5.2.6. Ubicación Ecológica.

Piso ecológico : Bs – St

Humedad relativa : 65.2 %

Precipitación anual : 1200 mm

Temperatura media : 25° C.

5.3. Materiales

5.3.1. Material biológico

- *Trichoderma viride*.
- *Trichoderma lignorum*
- *Trichoderma* sp.
- Inóculo de *Fusarium* sp.
- Semillas de *Pinus tecunumanii*

5.3.2. Materiales de campo

- Bandejas con tubetes BP96
- Suelo estéril
- Banner
- Pico
- Pala

5.3.3. Materiales de laboratorio

a. Insumos

- Dextrosa (20g)
- Agar - agar (18g)
- Papa (250g)
- Oxatetraciclina
- Agua destilada
- Alcohol 96°
- Trigo

b. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Microscopio (Leica)
- Estereoscopio (Leica)
- Horno microondas
- Microvoid
- Estufa

c. Otros

- Placas petri descartables
- Sacabocado
- Probeta graduada de 100 ml
- Espátulas
- Tubos de ensayo
- Bolsas de polipropileno
- Parafilm
- Algodón
- Pinzas
- Ligas
- Plumones indelebles
- Regla, lapicero y cuaderno de apuntes.

5.4. Métodos

5.4.1. Identificación del agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), a nivel de género.

Para que se tenga la certeza de que el patógeno es la causa de la enfermedad, se consideró los cuatro principios del postulado de Koch:

Primer postulado: Se obtuvo muestras de plantines de pino con presencia de síntomas de marchites provenientes del vivero forestal de la Municipalidad Distrital de Maranura, ubicada en el sector de Mandor.

Segundo postulado: Se preparó medio PDAO (Papa – Dextrosa – Agar Oxitetraclina) estéril, luego del plaqueado y solidificado se colocó trozos de tejido enfermo. Las placas sembradas se mantuvieron en incubación a 28 °C durante 5 – 10 días, luego según las características de las colonias se procedieron a repicar, purificar y entubar, para finalmente conservarlo en refrigeración.

Tercer postulado: Las diferentes colonias obtenidas en el aislamiento se inocularon por el método de suspensión de conidias, luego de tres semanas se observó síntomas de marchites en los plantines de pino inoculados.

Cuarto postulado: A los plantines de pino que presentaron los mismos síntomas de marchites se le realizó el aislamiento por segunda vez de la nueva planta enferma y se comparó sus caracteres con aquel que fue aislado anteriormente por primera vez (Primer postulado), luego según las características de la colonia se procedió a repicar, purificar y entubar, para finalmente conservarlo en refrigeración.

Para la identificación del patógeno a nivel de género, se tomó un pedazo de cinta scotch y, con el lado que tiene el pegamento tocar “ligeramente” la esporulación del patógeno que se encuentra en la caja petri, luego la cinta scotch se coloca en un portaobjetos

limpio, sobre una gota de solución de cotton blue, seguidamente este montaje se lleva al microscopio y se utilizó las llaves de identificación de Barnett y Hunter (1986).

5.4.2. Determinación del desarrollo micelial de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) y del patógeno a nivel “in vitro”.

Esta prueba se ejecutó para determinar el crecimiento y desarrollo micelial por competencia de los agentes de control biológico y el fitopatógeno por espacio y nutrientes en la rizosfera.

Se prepararon cuatro erlenmeyers conteniendo 200 ml de medio PDAO (papadextrosa-agar-oxitetraciclina) estéril y se procedió a verter en las placas petri, una vez solidificados se colocó al centro de cada placa un disco de 0.5 cm de diámetro conteniendo PDAO y micelio del hongo, las placas sembradas se incubaron a temperatura de 28 °C, diariamente, se midió el crecimiento radial del micelio, con la ayuda de una regla. La evaluación culminó cuando primero uno de los tratamientos llegase a cubrir en su totalidad el medio; con la información del crecimiento del hongo se encontró el modelo asociado a su crecimiento a través del tiempo.

Los resultados se analizaron con el diseño estadístico lineal, completamente al azar (D.C.A.) y con la prueba de comparación de medias Tukey, con un grado de significancia del 5% y 1%. El modelo aditivo lineal ajustado a estos datos será:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

Donde:

i = 1,2,3,....., Efecto de los *Trichodermas* y *Fusarium*

j = 1,2 y 3 Efecto del crecimiento micelial

u = Promedio de las medias de las variables

T_i = Efecto del tratamiento

E_{ij} = Error experimental

5.4.3. Determinación del porcentaje de antagonismo de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) frente al patógeno en la prueba de enfrentamiento a nivel “in vitro”.

A fin de evaluar la actividad antagónica de cepas biocontroladoras, mediante la técnica de enfrentamiento en cajas de petri con medio PDAO. Se preparó el medio PDAO y se plaqueó con antibiótico. Se tomaron placas petri con el aislamiento del hongo patógeno y biocontroladores, los cuales se colocaron dentro de un Microvoid, así como las placas preparadas para la siembra. Se tomaron con un sacabocado (previamente flameado en alcohol) rodajas de 0.5 cm de diámetro, y con ayuda de estiletes y pinzas también desinfectados y flameados se realizó la siembra de manera equidistante y en forma opuesta (Figura 2), de patógeno-patógeno y patógeno-biocontrolador. Se sellaron las placas con parafilm y se incubaron a 28 °C para su crecimiento.

Esta prueba fue dispuesta bajo el diseño completamente al azar, con siete tratamientos donde cada tratamiento constó de 7 repeticiones y el antagonismo observado fue medido en milímetros y comparado con el crecimiento del testigo.

Con los resultados obtenidos, se determinó el porcentaje de antagonismo de crecimiento radial (ACR), mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971):

$$\text{ACR (\%)} = ((R1-R2) 100/R1)$$

Donde:

R1: Distancia más lejana recorrida por el *Trichoderma* (*Trichoderma* x patógeno).

R2: Distancia recorrida por el testigo de *Trichoderma* (*Trichoderma* x *Trichoderma*).

Seguidamente se determinó la capacidad antagónica sobre el hongo patógeno teniendo como referencias para las evaluaciones la escala propuesta por Elías y Arcos (1984) que es la siguiente:

Cuadro 1: Escala de Capacidad antagónica de *Trichoderma* spp.

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella.

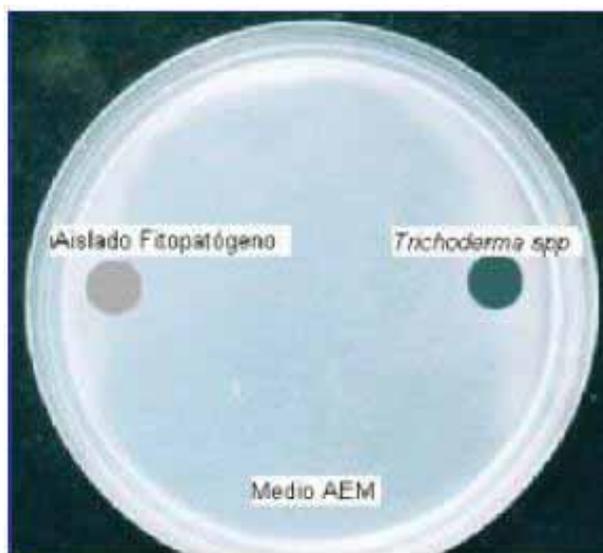


Figura 2: Cultivo dual “*in vitro*” de los hongos *Trichoderma* spp. y aislados de hongos fitopatógenos.

Del mismo modo, los datos de antagonismo, fueron sometidos a un análisis de varianza y en caso de existir diferencias significativas, las medias fueron diferenciadas con el test de Tuckey ($p \leq 0.05$).

5.4.4. Determinación del porcentaje de control de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) sobre el patógeno en condiciones de vivero.

5.4.4.1. Instalación del experimento

a. Ubicación

Región : Cusco
Provincia : La Convención
Distrito : Maranura
Sector : Mandor

b. Diseño de los tratamientos

Unidad experimental : Bandeja portatubetes BP96
Unidad de muestreo : 48 tubetes de la bandeja
Nº de bandejas : 32

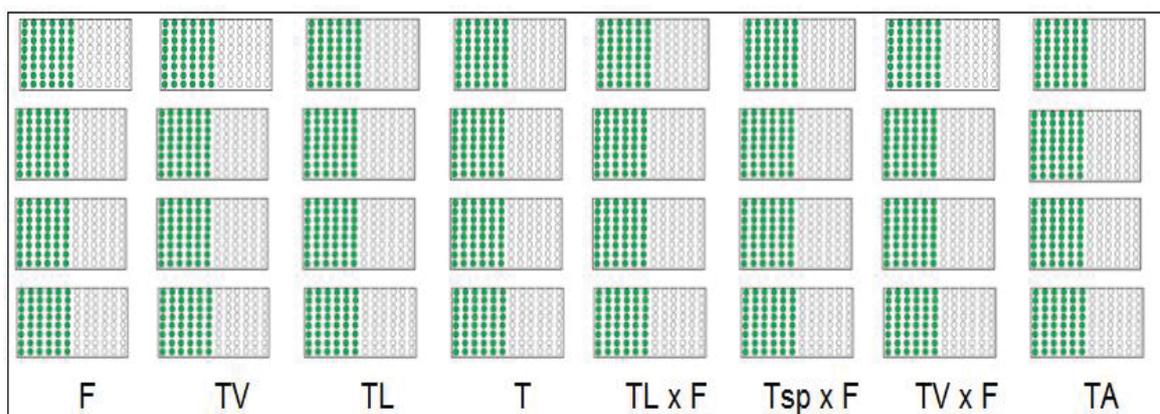


Figura 3: Distribución de los tratamientos

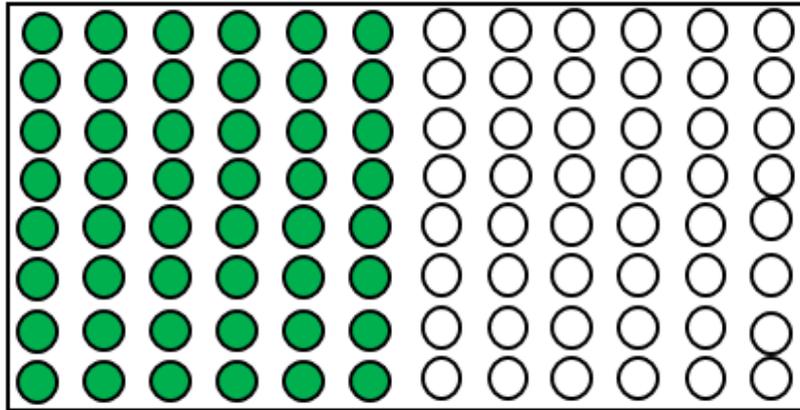


Figura 4: Unidad experimental (tubetes sombreados)

c. Preparación y llenado de sustrato en bandejas

Se mezcló, tierra agrícola (60 %) con compost (25 %) y limo (15 %), se homogeneizó el sustrato.

Se esterilizó el sustrato por el método “calor húmedo sin presión”, donde se utilizó un cilindro, cuyo calor fue generado a base de leña (fogón).

d. Inoculación de *Trichoderma* spp., y *Fusarium* sp.

Raspar los cultivos del hongo en las cajas y mezclar este raspado con un volumen conocido de agua destilada (100 ml). Una vez homogeneizada, la suspensión se filtra a través de una malla o gasa para eliminar el agar o restos de micelio que podrían obstruir el paso de la suspensión a través de la pipeta durante la inoculación. Se inóculo 1 ml de suspensión por tubete.

e. Sembrío de semillas de pino

Las semillas de pino se sembraron a los 7 días después de la inoculación de *Trichoderma* spp, y *Fusarium* sp.

f. Diseño estadístico

Diseño completamente al azar, con 4 repeticiones, cada repetición estuvo constituida por 48 plantines. La comparación de medias será Tukey al 0.05 y 0.01

g. Tratamientos

Trichoderma viride (TV), *Trichoderma lignorum* (TL), *Trichoderma* sp. (Tsp), *Trichoderma viride* x *Fusarium* sp. (TV x F), *Trichoderma lignorum* x *Fusarium* sp. (TL x F), *Trichoderma* sp. x *Fusarium* sp. (Tsp x F), *Fusarium* sp. (F), Testigo absoluto (TA).

h. Evaluación

A los 31 días después de la siembra se evaluó el número de plantines sanos, los datos obtenidos serán transformados por la fórmula \sqrt{x} para su análisis estadístico.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

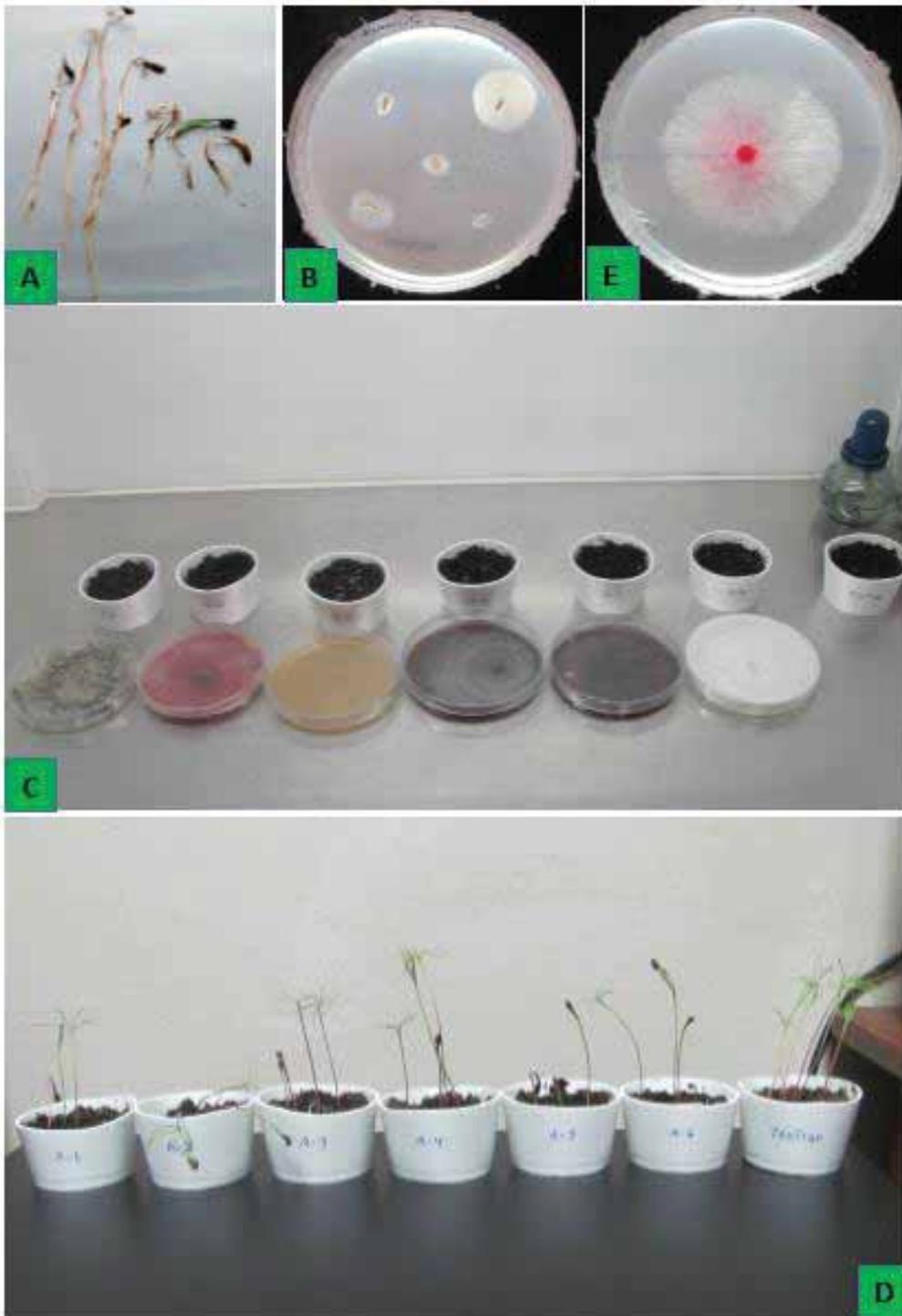
6.1. Identificación del agente causal de la marchitez en pino (*Pinus tecunumanii*), a nivel de género

Observando a través de un microscopio compuesto se determinó que la colonia del patógeno presenta:

Macroconidias	:	Célula apical aguda Célula basal tiene pie 3 – 7 septas Hialina
Microconidia	:	A veces en grupo A veces presenta septa Hialina
Clamidospora	:	Simple, pares, células de las macroconidias
Colonia	:	Color rojo purpura

Fuente: Barnet y Hunter B. (1972).

En base a estas características y mediante las claves de Barnet y Hunter B. (1972), el hongo fue ubicado en el género *Fusarium* sp.



Fotografía 1: Postulados de Koch. Primer postulado (A), Segundo postulado (B), Tercer postulado (C), Cuarto postulado (D).

Las características morfológicas del hongo aislado, como la macroconidia, microconidia, clamidospora y color de colonia, etc., coincidiendo con los reportes de Gordon *et al.* (2015), la muestra evaluada presentó micelio algodonoso, blanco y coloración con pigmentación violeta intensa en PDA, microconidios ovales sin septos, microconidios agregados en falsas cabezas, que surgen de monofiálides y polifiálides. *Fusarium circinatum* puede diferenciarse de *Fusarium. pseudocircinatum* por la formación de los microconidios en cadenas cortas y no en falsas cabezas. Pfenning *et al.* (2014), reportan esporodoquios de color anaranjado pálido formados en agua agar con hoja de clavel, los macroconidios, generalmente de tres septos, las células apicales son curvadas y las basales poco desarrolladas.

En la descripción de las características morfológicas, la colonia fue de color rojo purpura, con micelio aéreo blanquecino, microscópicamente presenta conidióforos, conidias y clamidosporas, los conidióforos se presentan en fiálides donde se forman las conidias una por cada fiálide no ramificadas y ramificadas. Las conidias son de dos tipos, microconidias y macroconidias. Las microconidias son abundantes, generalmente de una célula, de forma oval ariñonada y las macroconidias también abundantes, de 3 a 7 células, en forma de hoz con una célula apical atenuada y una célula basal en forma de pie. Las clamidosporas se presentan solitarias o en pares, que caracterizan a *Fusarium* sp. coincidiendo con lo descrito por Agrios (1996), donde indica que *Fusarium* sp., presenta el micelio incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa pálido o algo púrpura, produce tres tipos de esporas asexuales que son: Microconidios, macroconidios, clamidosporas.

Esta enfermedad causado por *Fusarium* sp., se encontró afectando plántulas de Cedro nativo (*Cedrela* sp), Pino (*Pinus* sp.), Cedro Rosado (*Acrocarpus fraxinifolius*), Paliperro (*Vitex seodolia*) y Teca (*Tectona grandis*), coincidiendo a lo descrito por Smith *et al.*, (1992); donde indica que *Fusarium* sp., presenta muchos hospedantes, incluyendo especies forestales.

Esta enfermedad presenta como síntoma primario la obstrucción y empardecimiento de los vasos xilemáticos (necrosis) de raíz y tallo, y como síntoma secundario presenta marchitez (debilitamiento, amarillamiento, caída y muerte de las hojas); coincidiendo a lo descrito por Smith *et al.*, (1992) donde mencionan que *Fusarium* sp., se ha caracterizado como causante de los síntomas siguientes: marchitamiento vascular, amarillamientos, podredumbre de raíz y chupadera.

6.2. Determinación del desarrollo micelial de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) y del patógeno a nivel “in vitro”.

Los resultados de la Tabla 1, indican que el tratamiento TV (*Trichoderma viride*), tuvo un rápido desarrollo micelial, a las 58 horas después de la siembra el micelio había cubierto toda la superficie de la placa a diferencia del resto de tratamientos que les tomo más tiempo para cubrir la superficie de la placa. Asimismo, se observa en la (Fotografía 2) a las 24 horas después de la siembra como el micelio del tratamiento TV, crece más rápido que los otros.

Los resultados del análisis de variancia (Tabla 2) indican que existe diferencias significativas a nivel 0.05 y 0.01 entre los promedios de los tratamientos, el coeficiente de variación es de 1.73%.

Según la prueba de Tukey (Tabla 3) existe diferencias significativas en el desarrollo micelial entre los promedios de estos tratamientos a un nivel 0.05 y 0.01.

Por tanto se recomienda utilizar el hongo antagonista *Trichoderma viride*, porque tiene un crecimiento y desarrollo micelial más rápido que el fitopatógeno (*Fusarium* sp.).

Las placas de los diferentes tratamientos se mantuvieron por dos semanas más, y se observó en el tratamiento F (*Fusarium* sp.) una coloración rojo purpura intenso del medio de cultivo.

Trichoderma viride es diferente estadísticamente frente a las demás especies con un nivel de confiabilidad del 5%; lo que determina que *Trichoderma viride* tuvo un mayor desarrollo micelial en comparación a *Fusarium* sp., comprobando su función de biocontrolador.

El desarrollo micelial de *Trichoderma viride* fue de 58 horas para el cubrimiento total de la superficie del medio (90 mm de diámetro), siendo superior al patógeno (*Fusarium* sp. 23.71 mm) por tanto a nivel de la rizosfera, *Trichoderma viride* copara más rápidamente el rizoplano con respecto al patógeno (*Fusarium* sp.).

Tabla 1: Promedio de diámetro desarrollo micelial (mm) del patógeno (*Fusarium* sp.) y biocontroladores (*Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma* sp.), a 25 °C en la prueba “in vitro”.

CLAVE	TRATAMIENTO	DESARROLLO MICELIAL (mm)		
		HORAS		
		24	48	58
TV	<i>Trichoderma viride</i>	36.00	64.14	90.00
TL	<i>Trichoderma lignorum</i>	23.86	45.00	85.14
T sp	<i>Trichoderma</i> sp	16.00	43.71	81.14
F	<i>Fusarium</i> sp	4.29	10.57	23.71



Figura 5: Promedio de diámetro desarrollo micelial (mm) del patógeno (*Fusarium* sp.) y biocontroladores (*Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma* sp), a 25 °C en la prueba “in vitro”.

Tabla 2: Análisis de variancia en D.C.A. para datos de 58 horas después de la siembra de desarrollo micelial (mm) del patógeno (*Fusarium* sp.) y biocontroladores (*Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma* sp.), a 25 °C en la prueba “in vitro”.

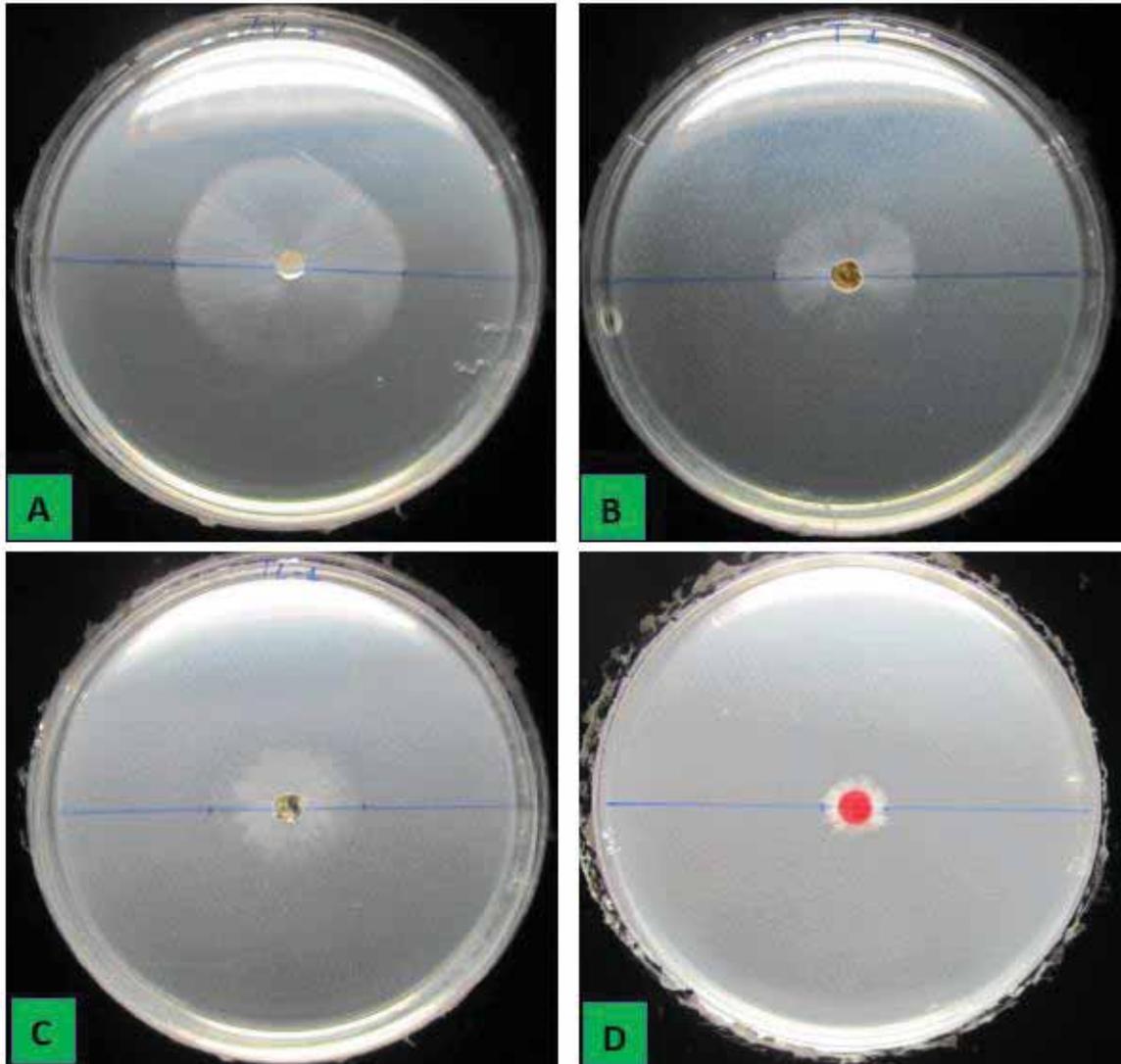
Fuentes de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calculado	F teórico		Sig
					0.05	0.01	
Tratamientos	3	2027.8571	6756.9523	4614.50	3.01	4.72	* *
Error experimental	24	35.1428	1.4642				
Total	27	20306	C.V.= 1.73 %				

Tabla 3: Prueba de Tukey para desarrollo micelial del patógeno (*Fusarium* sp.) y biocontroladores (*Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma* sp.), a 25 °C en la prueba “in Vitro”.

CLAVE	TRATAMIENTO	PROMEDIO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA	
			Tukey= 0.05	Tukey= 0.01
TV	<i>Trichoderma viride</i>	90.0000	a	a
TL	<i>Trichoderma lignorum</i>	85.1429	b	b
Tsp	<i>Trichoderma</i> sp.	81.1429	c	c
F	<i>Fusarium</i> sp.	23.7143	d	d

El crecimiento radial de *Trichoderma viride* en PDAO fue de 18 mm día⁻¹, de tal forma que transcurrieron 58 horas aproximadamente para el cubrimiento total de la superficie del medio, el cual es característico cuando se dispone de una base alimenticia abundante y suficiente en carbohidratos. El crecimiento radial de *Trichoderma viride* fue superior al de otros hongos estudiados como: *Trichoderma* sp. (8 mm día⁻¹), *Trichoderma lignorum* (11 mm día⁻¹) y *Fusarium* sp. (2 mm día⁻¹), este resultado podríamos relacionarlo con lo manifestado por otros reportes (Biocontrol, 2003 y Humeres, 2004), quienes manifiestan que el género *Trichoderma* spp., a pesar de tener una actividad antagónica de parasitismo y antibiosis, la actividad antagónica por competencia viene siendo la más importante, porque el género *Trichoderma* spp. compite en la rizosfera por nutrientes y

espacio para lo cual debe tener un desarrollo micelial superior al de los fitopatógenos y cuando a copado por completo el rizoplano pueda defenderse contra los fitopatógenos invasores mediante la actividad antagónica por micoparasitismo y por liberación de antibióticos que inhiben el desarrollo del fitopatógeno.



Fotografía 2: Crecimiento radial (24 horas dds). *Trichoderma viride* (A), *Trichoderma* sp. (B), *Trichoderma lignorum* (C), *Fusarium* sp. (D).

Los micelios de *Trichoderma viride* frente a *Fusarium* sp., lograron tener contacto a los 3 días después de la siembra (dds), llegando a colonizar *Trichoderma viride* 68.42 mm., de diámetro de la placa petri (90 mm de diámetro) y *Fusarium* sp., colonizo solamente 21.57 mm., de diámetro. Estos resultados difieren a los reportados por Benhamou y Chet (1993), quienes reportan contacto desde el quinto día después de la siembra entre *Trichoderma harzianum* y *Rhizoctonia solani*, lo que indica baja agresividad del antagonista y resistencia del fitopatógeno.

6.3. Determinación del porcentaje de antagonismo de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) frente al patógeno en la prueba de enfrentamiento a nivel “in vitro”.

En la Tabla 4, se aprecia el análisis de variancia para el parámetro porcentaje de antagonismo. Se observa diferencias significativas entre tratamientos; asimismo, el coeficiente de variabilidad de 6.38%, indica que hubo homogeneidad entre las variables experimentales.

Tabla 4: Análisis de variancia en D.C.A. para el antagonismo de *Trichoderma* spp., en cultivos duales incubados *in vitro* 28 °C.

Fuentes de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calculado	F teórico		Sig	
					0.05	0.01		
Tratamientos	2	153.3048	76.6524	19.23	3.55	6.01	* *	
Error experimental	18	71.7326	3.9851					
Total	20	225.03752	C.V.= 6.38 %					

La prueba de comparación de medias por Tukey (Tabla 5) con un nivel de significación de 0.05 y 0.01 confirma que hubo diferencia entre tratamientos.

Tabla 5: Prueba de Tukey, antagonismo de *Trichoderma* spp., en cultivos duales incubados *in vitro* 28 °C.

CLAVE	TRATAMIENTO	PROMEDIO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA	
			Tukey= 0.05	Tukey= 0.01
TV	<i>Trichoderma viride</i>	34.27	a	a
TL	<i>Trichoderma lignorum</i>	31.77	a	a
Tsp	<i>Trichoderma</i> sp	27.71	b	b

Al comparar el porcentaje de antagonismo (Tabla 6) de los tratamientos, mediante la prueba de significación Tukey se encontró diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos TV (*Trichoderma viride*, 34.27%), TL (*Trichoderma lignorum*, 31.77%), *Trichoderma* sp., 27.71%).

Tabla 6: Resultados del porcentaje de antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp., incubados *in vitro* a 28 °C.

REP	$\frac{((TV-tv)/TV)*100}{}$	$\frac{((TL-tl)/TL)*100}{}$	$\frac{((Tsp-tsp)/Tsp)*100}{}$
1	36.62	33.82	29.69
2	30.77	28.57	29.69
3	35.71	30.77	28.57
4	36.62	31.82	25.00
5	31.82	30.77	27.42
6	33.82	32.84	26.23
7	34.56	33.82	27.42
Promedio	34.27	31.77	27.72

En la Figura 6, se observa claramente que el tratamiento TV (*Trichoderma viride*, 34.27%) produjo mayor antagonismo que el tratamiento TL (*Trichoderma lignorum*, 31.77%) sobre el fitopatógeno *Fusarium* sp., a través de sus mecanismos de micoparasitismo y competencia

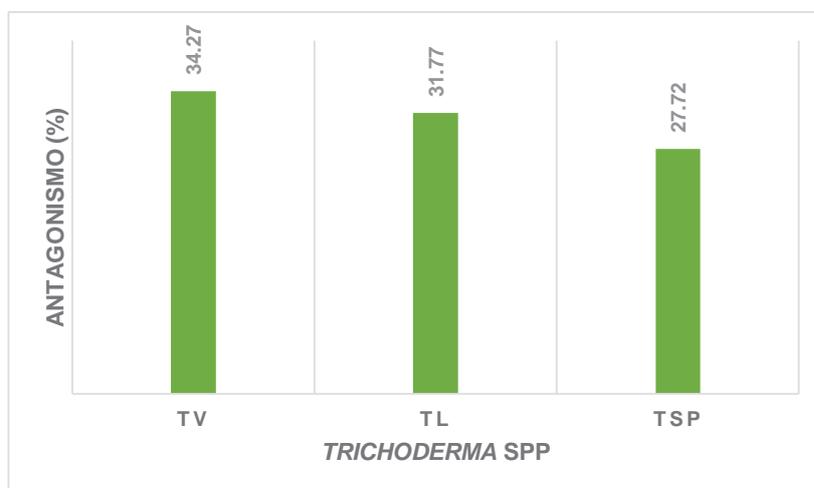


Figura 6: Antagonismo de *Trichoderma* spp., en cultivos duales incubados *in vitro* a 28 °C.

En las pruebas de antagonismo *in vitro*, *Trichoderma viride* inhibió el crecimiento de *Fusarium* sp., deteniendo su crecimiento a los 3 días; a los 11 días presentó una invasión total del micelio del patógeno.

Se encontró que las hifas de todas las cepas de *Trichoderma* spp., aunque a diferentes tiempos hicieron contacto con las hifas de *Fusarium* sp., entre menor fueron los días al contacto, más agresividad existió por parte del hongo antagónico o menor resistencia al fitopatógeno. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp., presentaron zona de intersección visible con las hifas de *Fusarium* sp., entre mayor es el área de contacto, mayor es la agresividad por parte del hongo antagónico. De este modo, se encontraron efectos altamente significativos con respecto a la zona de intersección.

En relación con el hongo fitopatógeno, en la mayoría de las interacciones del cultivo apareado, *Fusarium* sp., detuvo su crecimiento al contacto con *Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma* sp.; Según la escala de capacidad antagónica, *Trichoderma viride* se ubica en la clase 3, *Trichoderma lignorum* se ubica en la clase 2,

en cambio *Trichoderma* sp., se ubica en la clase 0, porque no se observa sobrecimiento en la superficie de la colonia de *Fusarium* sp.

Según la prueba de micoparasitismo, *Trichoderma viride* presento mayor porcentaje de antagonismo frente al fitopatógeno *Fusarium* sp., por tanto se recomienda utilizar la cepas de *Trichoderma viride* como un biofungicida.

Tabla 7: Resultados de crecimiento radial de *Trichoderma* spp, *Fusarium* sp. en cultivos duales, incubados *in vitro* a 28 °C.

REP	Testigo, crecimiento radial (mm.)								Confrontamiento dual (mm.)					
	TV	TV	TL	TL	Tsp	Tsp	F	F	TV	F	TL	F	Tsp	F
1	46	44	45	45	44	46	45	45	71	19	68	22	64	26
2	45	45	46	44	45	45	45	45	65	25	63	27	64	26
3	44	46	44	46	45	45	45	45	70	20	65	25	63	27
4	45	45	45	45	46	44	46	44	71	19	66	24	60	30
5	44	46	44	46	43	47	45	45	66	24	65	25	62	28
6	43	47	45	45	45	45	44	46	68	22	67	23	61	29
7	44	45	46	44	45	45	45	45	68	22	68	22	62	28

Tabla 8: Resultados de crecimiento radial promedio (tv, tl, tsp, f) y crecimiento del confrontamiento en cultivos duales, incubados *in vitro* a 28 °C.

REP	Testigo, Promedio crecimiento radial (mm.)				Confrontamiento dual (mm.)					
	tv	tl	tsp	f	TV	F	TL	F	Tsp	F
1	45	45	45	45	71	19	68	22	64	26
2	45	45	45	45	65	25	63	27	64	26
3	45	45	45	45	70	20	65	25	63	27
4	45	45	45	45	71	19	66	24	60	30
5	45	45	45	45	66	24	65	25	62	28
6	45	45	45	45	68	22	67	23	61	29
7	44.5	45	45	45	68	22	68	22	62	28

En esta prueba también se pudo apreciar que, *Trichoderma viride*, tienen un buen efecto directo para el fitopatógeno *Fusarium* sp., esto también fue observado por García (2001), cuando el aislado de *Trichoderma viride* inhibió de mejor forma a los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en pruebas *in vitro*. Lo anterior estaría dado entre otras características por su mayor o menor capacidad de producir enzimas específicas que degradarían la pared celular de *Phytophthora nicotianae*, Madrid, A. (2002).

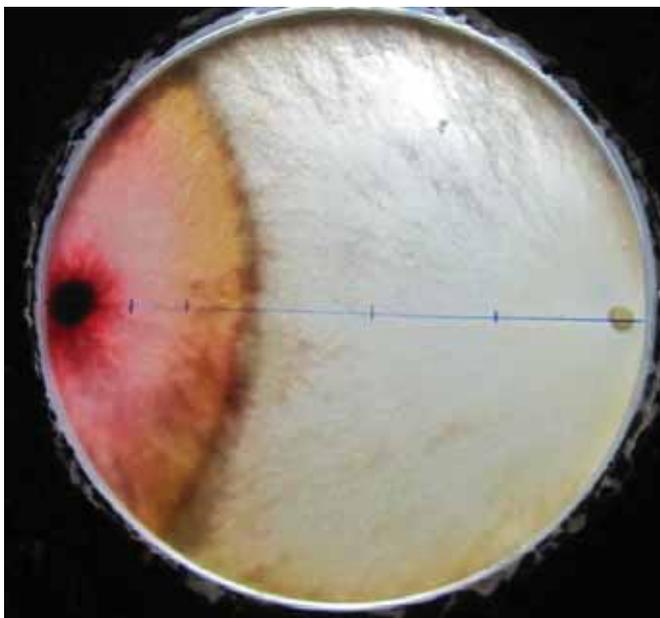
Las cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma lignorum* presentaron zona de intersección visible con las hifas de *Fusarium* sp., y entre mayor es el área de contacto y/o sobrecrecimiento, mayor es la agresividad por parte del hongo antagónico. La cepa de *Trichoderma viride* presentó la mayor zona de micoparasitismo, con 34.27 % de antagonismo y *Trichoderma lignorum* con 31.77 % de antagonismo. Resultados similares fueron reportados por Benhamou y Chet (1993), donde la cepa de *Trichoderma harzianum* inhibió el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en un 40.27 %, bajo condiciones “*in vitro*” a 18 °C.

Trichoderma viride y *Trichoderma lignorum* lograron esporular en toda la superficie de la caja, aun sobre el crecimiento de *Fusarium* sp., lo que pone de manifiesto la agresividad del hongo antagónico. En este sentido, Benhamou y Chet (1993), reporta que *Trichoderma harzianum* esporula sobre *Rhizoctonia solani*, debido a la alta capacidad de esporulación y rápida maduración de la conidias.

El micoparasitismo es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes; ésta es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio según Dennis y Webster (1971c). De acuerdo a las clases de antagonismo, según Elías y Arcos (1984), *Trichoderma viride* presenta mayor sobrecrecimiento o zona de intersección con *Fusarium* sp, se ubica en clase 3; *Trichoderma lignorum* se ubica en la clase 2 y *Trichoderma* sp., se ubica en la clase 0. Estos resultados son similares a los reportados por Silva-Hanlin y Menezes (1997), quienes entre varias especies de *Trichoderma* spp presentan antagonismo entre 1 y 3, donde las cepas 1, se clasifican como un antagonista muy eficiente; las 2 son

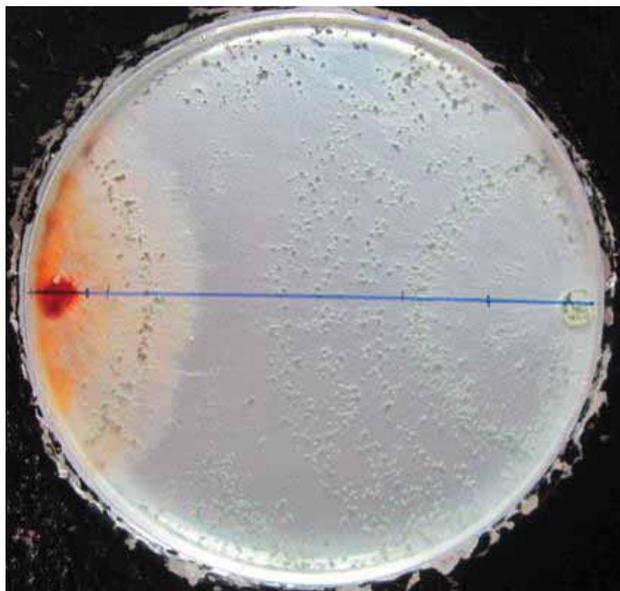
eficientes y las 3 medio eficiente y contrarios a los indicados por Calistrus *et al.*, (1997) quienes al evaluar cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* en cultivos apareados con *Fusarium moniliforme*, encontraron diferentes respuestas en la interacción, inclusive cepas no agresivas, donde el fitopatógeno sobrecreció al antagonista, inhibiendo su crecimiento.

Como se observa en la Fotografía 3, la inhibición del crecimiento vegetativo de *Fusarium* sp. (F) en presencia de *Trichoderma viride* (TV) en el medio PDAO, TV realiza hiperparasitismo, invade totalmente la superficie de la colonia de *Fusarium* sp y esporula sobre la misma.



Fotografía 3: Confrontación de *Fusarium* sp. (F) y *Trichoderma viride* (Tv)

En la Fotografía 4 se observa, la inhibición del crecimiento vegetativo de *Fusarium* sp. (F) en presencia de *Trichoderma lignorum* (TL) en el medio PDAO. Donde TL realiza hiperparasitismo, invade totalmente la superficie de la colonia de *Fusarium* sp y esporula sobre la misma.



Fotografía 4: Confrontación de *Fusarium* sp (F) y *Trichoderma lignorum* (TL)

6.4. Determinación del porcentaje de control de los hongos benéficos (*Trichoderma* spp.) sobre el patógeno en condiciones de vivero.

En la Tabla 9, se observa los resultados de los plantines de pino germinados y libres de signos y síntomas del patógeno, debido al efecto antagónico de *Trichoderma* spp.

En la Tabla 11, se aprecia el análisis de variancia para el número de plantas sanas. Se observa diferencias significativas entre tratamientos; así mismo, el coeficiente de variabilidad de 5.23% indica que hubo homogeneidad entre las variables experimentales.

Existe diferencias significativas a nivel 0.05 y 0.01 entre los promedios de los tratamientos; el coeficiente de variación es 5.23 %.

La prueba de comparación Tukey con un nivel de significación de 0.05 y 0.01 (Tabla 12), confirma que hubo diferencias entre tratamientos, por tanto se recomienda utilizar la cepa de *Trichoderma viride*, porque brindan mejor protección de la rizosfera frente a *Fusarium* sp.

En la Figura 7, se puede visualizar rápidamente los resultados. El tratamiento TA corresponde al testigo absoluto, aquí se puede observar el máximo número de plantas sanas (100 %) al finalizar el periodo de prueba.

Los tratamientos Tv, Tl y Tsp., muestran el comportamiento de los biocontroladores en ausencia de *Fusarium* sp., aquí se puede notar que *Trichoderma* spp. no afecta en absoluto al plantin de pino porque se tuvo 100% de plantas sanas.

En la Tabla 10, el tratamiento F (semillas de pino más inóculo de *Fusarium* sp.) presento el menor número de plantas sanas, aquí se observaron los síntomas característicos que produce *Fusarium* sp. en plantines de pino. El hongo fitopatógeno causo daño a nivel de pre y post emergencia, no permitiendo la emergencia del plantin a la superficie, también ocasionando declinamiento y/o marchitez del plantin, tanto las semillas y el hipocotilo mostraron síntomas de necrosis y micelio.

Los tratamientos Tv*F y Tl*F correspondientes al control biológico de *Fusarium* sp., tuvo un número de plantas sanas de 95.32% y 84.90%, comparado con el tratamiento testigo de la enfermedad F con 3.13%.

Tabla 9: Número de plantines de pino germinadas y sanas en condiciones de vivero.

Rep	F	TV	TL	Tsp	TL x F	TV x F	Tsp x F	TA
1	1	48	48	48	40	45	13	48
2	3	48	48	48	40	44	15	48
3	0	48	48	48	41	46	20	48
4	2	48	48	48	42	48	15	48

Tabla 10: Datos transformados \sqrt{x} , del número de plantines de pino germinadas y sanas en condiciones de vivero.

Rep.	F	TV	TL	Tsp	TL x F	TV x F	Tsp x F	TA
1	1.00	6.93	6.93	6.93	6.32	6.71	3.61	6.93
2	1.73	6.93	6.93	6.93	6.32	6.63	3.87	6.93
3	0.00	6.93	6.93	6.93	6.40	6.78	4.47	6.93
4	1.41	6.93	6.93	6.93	6.48	6.93	3.87	6.93

Tabla 11: Análisis de variancia en D.C.A. para número de plantas sanas por bandeja y transformados por la fórmula \sqrt{x} .

Fuentes de variación	G. L.	S. C.	C. M.	F calculado	F teórico		Sig	
					0.05	0.01		
Tratamientos	7	129.7687	18.5383	205.88	2.51	3.67	* *	
Error experimental	24	2.161	0.09					
Total	31	131.9298	C.V.= 5.23 %					

Tabla 12: Prueba de Tukey para el número de plantas sanas por bandeja.

CLAVE	TRATAMIENTO	PROMEDIO	NIVEL DE SIGNIFICANCIA	
			Tukey= 0.05	Tukey= 0.01
TA	Testigo absoluto	6.9300	a	a
TV	<i>T. viride</i>	6.9300	a	a
TL	<i>T. lignorum</i>	6.9300	a	a
Tsp	<i>T.sp</i>	6.9300	a	a
TV x F	<i>T. viride x Fusarium sp</i>	6.7600	a	a
TL x F	<i>T. lignorum x Fusarium sp</i>	6.3800	a	a
Tsp x F	<i>T. sp x Fusarium sp</i>	3.9500	b	b
F	<i>Fusarium sp</i>	1.0300	c	c

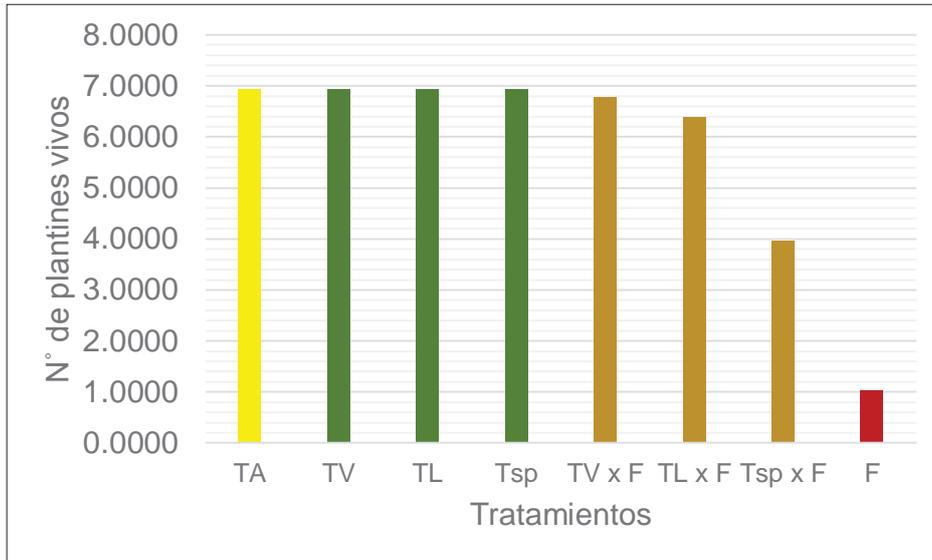


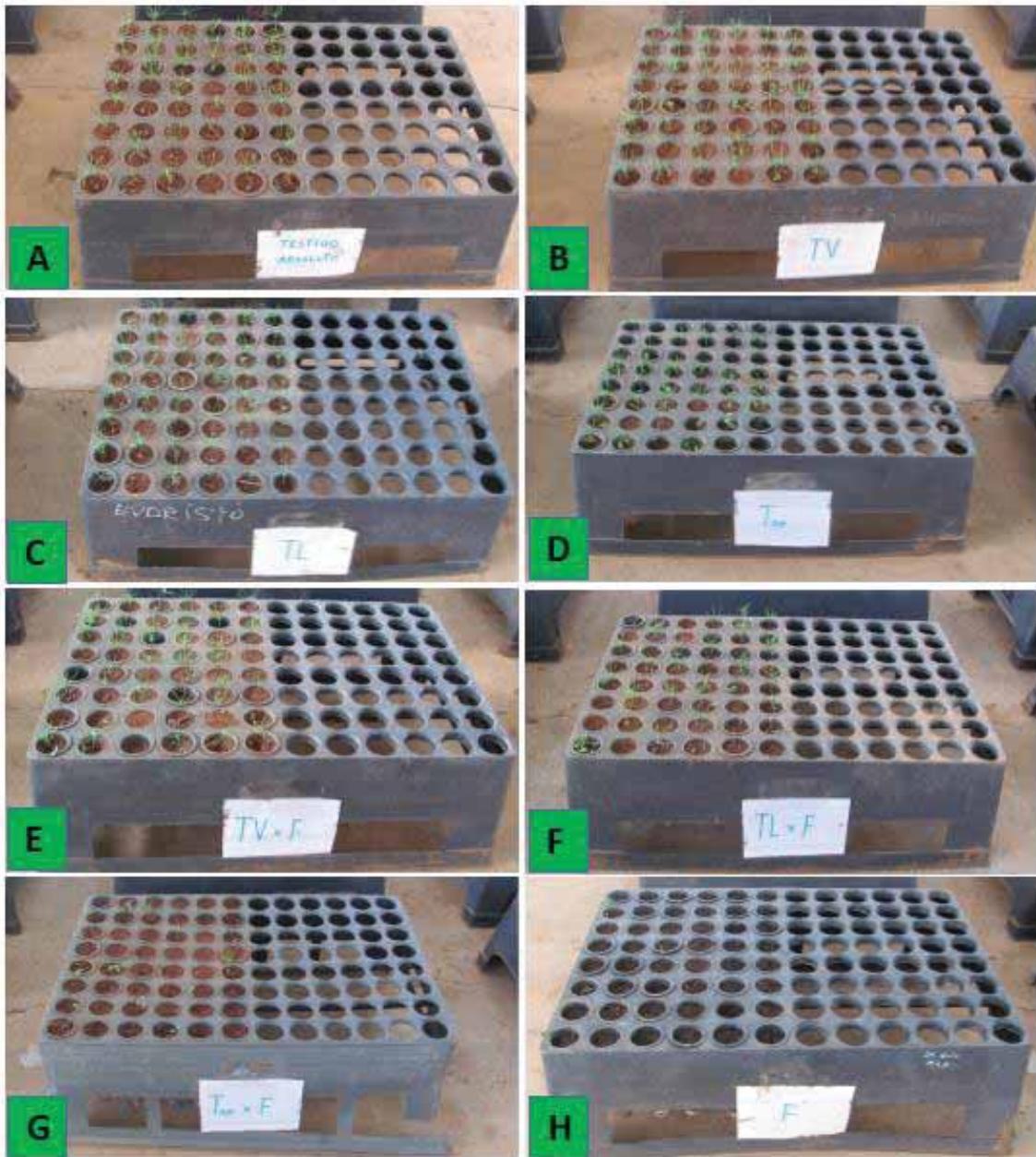
Figura 7: Número de plantas sanas aplicando *Trichoderma* spp. y *Fusarium* sp. al suelo.

En cuanto al coeficiente de variabilidad 5.23%, indica que no existe mayor dispersión en cuanto al número de plantas vivas de cada tratamiento. Al respecto, Calzada (1982) señala que el valor de coeficiente de variabilidad (C.V) en experimentos agronómicos a nivel de vivero (condiciones controladas) no debe ser mayor al 20%; de ser mayor afectará la confiabilidad a los resultados estadísticos. Por lo tanto, el valor C.V. =5.23% determinó que las unidades experimentales del presente estudio se encontraban dentro del parámetro de homogeneidad y confiabilidad estadística.

Al analizar la variable correspondiente al número de plantas vivas, se determinó que el tratamiento que presentó el mayor número de plantas vivas fue el tratamiento inoculado con *Trichoderma viride* (TV*F), alcanzando un porcentaje de plantines vivos de 95.31%, seguido del tratamiento inoculado con *Trichoderma lignorum* (TL*F), con 84.90% de plantines vivos. Estos tratamientos superan al testigo (F). Rojo, et al., (2006), ha demostrado que la adición de aislamientos específicos de *Trichoderma* en la rizósfera pueden resultar eficientes en reducción de incidencia de la enfermedad en plantas.

Trichoderma viride (TV x F) y *Trichoderma lignorum* (TL x F), frente al patógeno *Fusarium* sp., lograron reducir la colonización de *Fusarium* sp., en la rizosfera de *Pinus tecunumaii*, a través de sus mecanismos de micoparasitismo y competencia, coincide con los resultados obtenidos por Mejía (2018), bajo condiciones *in vitro* como para condiciones de invernadero mostraron resultados similares siendo *Trichoderma harzianum* (LM 01), el aislamiento que presentó un mejor control en comparación con *Trichoderma viride* (LM 02) frente al fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi* en el cultivo de arándano (*vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi.

Bajo las condiciones de la Provincia de la Convención, *Trichoderma viride* resulto ser el mejor hongo antagonista para problemas fitopatológicos del suelo, tanto a nivel “*in vitro*”, invernadero, vivero y campo, estos resultados podríamos relacionarlo con lo manifestado por Colonia (1994), quien manifiesta que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* brindaron protección efectiva a las semillas y plantas de frijol inoculadas con *Sclerotium rolfsii*, en condiciones de invernadero.



Fotografía 5: Incidencia a los 20 días después de la siembra: A: testigo absoluto; B: *Trichoderma viride*; C: *Trichoderma lignorum*; D: *Trichoderma* sp.; E: *Trichoderma viride* * *Fusarium* sp.; F: *Trichoderma lignorum* * *Fusarium* sp.; G: *Trichoderma* sp. * *Fusarium* sp.; H: *Fusarium* sp.

VII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

7.1. Conclusiones

1. Al aislar el fitopatógeno de la marchitez en pino; se determinó e identificó que el agente causal corresponde al género *Fusarium* sp. Asimismo, al realizarse los postulados de Koch se reconfirmó que el agente causal es el mismo.
2. A nivel “in vitro” *Trichoderma viride* presentó mayor desarrollo micelial y cubrimiento total de la placa petri a las 58 horas después de la siembra que el patógeno de *Fusarium* sp. Por lo tanto, a nivel de la rizosfera *Trichoderma viride* llenará rápidamente el rizoplano con respecto a *Fusarium* sp.
3. A nivel “in vitro” *Trichoderma viride* demostró un alto nivel de antagonismo hacia *Fusarium* sp., inhibiendo su crecimiento e invadiendo con su micelio en la totalidad de la placa Petri.
4. A nivel de “vivero” *Trichoderma viride* demostró ser un mejor biocontrolador para *Fusarium* sp., obteniendo así un mayor número de plantas de pino sanas.

7.2. Sugerencias

- Continuar con el estudio del control biológico principalmente a nivel de hongos radiculares.
- Determinar una manera más eficiente en la forma de aplicación de los productos, ya que la utilizada en el presente trabajo es más apropiada para pequeñas extensiones de área.
- Analizar costos en este tipo de control y el beneficio económico que representa para el agricultor.
- Realizar estudios en la aplicación de *Trichoderma* spp., para problemas fitopatológicos a nivel de la filosfera.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agrios, G. 1996.** Fitopatología. Ed. Limusa. México. pp 756.
2. **Arbelaez, G. 2000.** Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana. 17: 11-22. Colombia.
3. **Biocontrol. 2003.** Monografía *Trichoderma* spp. Palmira, Colombia. 15 p.
4. **Benhamou, N., Chet, L. 1993.** Hyphal interactions Between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and Gold Cytochemistry of The Mycoparasitic Process. Phytopathology, 83,1062 – 1071.
5. **Barron, G. 1986.** The Genera of Hyphomycetes from Soil. pp 364
6. **Barnet, H. I., Hunter B. 1972.** Illustrated genera of imperfect fungi. pp 241
7. **Bazán de segura, C. 1965.** Chupadera fungosa en viveros forestales. Lima, Estación Experimental Agrícola de La Molina, 21p.
8. **Camargo, F., Ávila, E. 2013.** Efectos del *Trichoderma* spp sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.) Cien. Y Agric. Vol. 11. N° 1.
9. **Cerda, D. A., 2007,** Evaluación de la Diversidad Genética de poblaciones naturales de *Pinus tecunumanii* de Nicaragua, mediante el uso de marcadores RAPDs, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN – León, Nicaragua.
10. **CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR) 1997.** Nota Técnica sobre Manejo de Semillas Forestales N° 12. "*Pinus tecunumanii*" Turrialba, CR.

- 11. Colonia, J., 1994.** Control biológico y químico de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en frijol (*Phaseolus vulgaris* L). tesis Ing Agron . Universidad Nacional Agraria La Molina. 117 p
- 12. Calzada, J. 1982.** Métodos estadísticos para la investigación. Lima. Perú.
- 13. Delgado, E., 2009,** Identificación de agentes causantes de enfermedades en plántulas forestales, en Fondebosque – Juan Guerra- San Martín. Tesis presentada para optar el grado de Ingeniero Agrónomo, Tarapoto.
- 14. Dennis, C., y Webster, J. (1971c).** Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* spp. III. Hyphal interactions. Transactions of the british Mycological Society, 57, 363-369.
- 15. Espino, L.A. 2002.** Reacción de quince cultivares de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill, a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood y a *Fusarium oxysporum* Schelechtend: Fr. f. sp. lycopersici (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans en invernadero. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía. Lima (Perú). 117 pp.
- 16. Eguiluz P., T.; Perry, J. P.Jr. 1983.** "*Pinus tecunumanii*". Una especie nueva de Guatemala". Ciencia Forestal (MX). 5(41):2-22
- 17. FAO. 2005.** (En línea) Consultado el 10 dic. del 2005. Disponible en: www.fao-sict.un.hn. *Pinus tecunumanii*
- 18. Gordon, T. R., C. L. Sweet, and M. J. Wingfield 2015.** Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. Crop Prot. 73: 28-39.

- 19. Galeano, M., F. Mendez y A. Urbaeja. 2002.** Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai (Cepa T-22) sobre cultivos hortícolas. Departamento I+D. Koppert Biological Systems. Finca Labradorcico del Medio. Aguilas (Murcia).
- 20. Garcés E., Orozco M., Bautista G., Valencia H. 2001.** *Fusarium oxysporum* - El hongo que nos falta conocer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Acta Biológica Colombiana, Vol. 6 No. 1, 25 pp
- 21. García, S. R. (2001).** Caracterización y uso in vitro de *Trichoderma harzianum* en la inhibición de *Phytophthora nicotianae* y su efecto en el control de pudrición al cuello en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo invernadero. Taller de Licenciatura, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía.
- 22. Humeres, C. 2004.** Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma spp*. Sobre aislados de hongos. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. Talca.
- 23. Mejia, K. 2018.** Control de *Phytophthora cinnamomi* en el cultivo de arándano (*vaccinium corymbosum* L.) cv. biloxi con diferentes aislamientos de *Trichoderma*. Tesis Ing. Agron. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 85 p.
- 24. Melo, J. 2010.** Dendrocronología de la especie *Pinus radiata* D. Don de plantaciones de la granja Porcón Cajamarca. Tesis Mag. Sc. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 83 p.
- 25. Madrid, A. (2002).** Control biológico de *Rhizoctonia solani* Kûhn en tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante el uso de *Trichoderma spp*. Memoria de Título Ing. Agr. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

- 26. Marquina J.C; Plasencia A. 1990.** *Fusarium oxysporum* en los cultivo intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitarias (Fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. Boletín de Sanidad Vegetal. Fuera de serie nº19. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Madrid. España.
- 27. Pfenning, L. H., C. S. Da Silva, M. M. De Pereira, H. Costa, V. J. Aires, A. C. García, and S. A. Dos Figueredo. 2014.** First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. Trop. Plant Pathol. 39: 210-216.
- 28. Pizarro, B., 2002.** Control químico de *Fusarium oxysporum* f. sp. asparagi y reacción de 3 cultivares de espárrago (*Asparagus officinalis* L.). Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Agronomía. Lima (Perú). 100 pp.
- 29. Palomino, J.; Barra. M.; Bohorquez. M.; Sosa. G. 1991.** Ensayos Silviculturales con especies de pinus, eucalyptus y cupresus en Selva Central del Perú. Documento N° 71. INIAA, GTZ, San Ramón.
- 30. Perez, N., 2002.** Control biológico de *Alternaria porri* (Ellis) Cif. En cebolla con *Trichoderma* spp. Resultados del 1° concurso latinoamericano en innovación de tecnologías ecológicas para el agro. Centro de estudios de agricultura sostenible de la universidad agraria de La Habana, Cuba. p. 89.
- 31. Quispe, A. 2017.** Semillas de *Pinus tecunumanii* "Pino rojo". Boletín Arborizaciones.
- 32. Rojo, F. Reyoso, M. Ferez, M. Chulze, S. Torres, A. 2006.** Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut Brown root rot under field conditions.26: 548-554.

- 33. Rodriguez, I. 1990.** Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma de opción al título de ingeniero agrónomo universidad agraria de la Habana.
- 34. Ribamar de S. R. J., y N. T. de Oliveira. (1998).** *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp., against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of anthracnose in the passion fruit (*Passiflora*). Boletín Micológico, 13, 103-110.
- 35. Stefanova M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado M., 1999.** Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 16: 509-516.
- 36. Smith, M; Dunez, J; Phillips, D; Lelliott, R; Archer, S. 1992.** Manual de Enfermedades de las Plantas. Edic. Mundi-Prensa. Madrid – España. Pág. 238; 587 – 590
- 37. Tronsmo, A. & Gordon, L. 1998.** Biological control with *Trichoderma* spp 111-126.
- 38. Villegas M., 2005.** *Trichoderma* spp. Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius biotecnología. Colombia. (consultado: 28 oct 2008).

ANEXOS

Anexo 1: Resultados *in vitro* de la prueba diámetro desarrollo micelial (mm) del patógeno (*Fusarium* sp.) y biocontroladores (*Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* y *Trichoderma* sp), a 25 °C.

CLAVE	TRATAMIENTO	HORA	DESARROLLO MICELIAL (mm)							PROMEDIO
			Repeticiones							
			1	2	3	4	5	6	7	
TV	<i>Trichoderma viride</i>	24	38	36	37	38	38	32	33	36.00
		48	66	63	65	70	66	58	61	64.14
		58	90	90	90	90	90	90	90	90.00
TL	<i>Trichoderma lignorum</i>	24	22	22	24	24	27	24	24	23.86
		48	42	42	46	46	45	48	46	45.00
		58	86	84	86	85	84	86	85	85.14
T sp	<i>Trichoderma</i> sp	24	19	14	18	16	16	15	14	16.00
		48	46	40	47	44	44	43	42	43.71
		58	80	79	82	80	81	84	82	81.14
F	<i>Fusarium</i> sp	24	4	4	4	4	4	4	6	4.29
		48	10	10	10	12	10	10	12	10.57
		58	25	23	26	22	24	24	22	23.71

Anexo 2: Porcentaje de plantines sanos a los 31 dds.

Rep	F	TV	TL	Tsp	TL x F	TV x F	Tsp x F	TA
1	2.08	100.00	100.00	100.00	83.33	93.75	27.08	100.00
2	6.25	100.00	100.00	100.00	83.33	91.67	31.25	100.00
3	0.00	100.00	100.00	100.00	85.42	95.83	41.67	100.00
4	4.17	100.00	100.00	100.00	87.50	100.00	31.25	100.00
	3.13	100.00	100.00	100.00	84.90	95.31	32.81	100.00

Leyenda:

- F** : *Fusarium* sp.
TV : *Trichoderma viride*
TL : *Trichoderma lignorum*
Tsp : *Trichoderma* sp.
TL x F : *Trichoderma lignorum* x *Fusarium* sp.
TV x F : *Trichoderma viride* x *Fusarium* sp.
Tsp x F : *Trichoderma* sp. x *Fusarium* sp.
TA : Testigo absoluto

Anexo 3: Clave de identificación de *Fusarium* sp. Según (Barnett & Hunter, 1990)

Moniliales

Dematiaceae

1a Conidia more or less coiled or spirally curved, hyaline or dark (parts of Moniliaceae, Dematiaceae and Tuberculariaceae).....2

1b Conidia not coiled.....12

12a Both conidia and conidiophores (if present) hyaline or brightly colored; conidiophores single or in loose cluster (Moniliacea).....13

12b Either conidia or conidiophores (or both) with distinct dark pigment; conidiophores or in loose cluster (Dematiaceae).....106

12c Conidiophores compacted into sporodochia or synnemata.....204

13a Conidia typically 1-celled, globose to cylindrical.....14

13b Conidia typically 2-celled, mostly ovoid to cylindrical.....67

13c Conidia typically 3-to several-celled, shape variable.....75

75a Conidia long-cylindrical, often bent or curved, aquatic76

75b Conidia shorter or not cylindrical, aquatic or not.....77

77a Conidia mostly phragmosporous, not branched.....78

77b Conidia branched (stauroporous).....92

78a Causing dermatomycoses of man or animals.....79

78b Saprophytic or parasitic on plants..... 80

80a Macroconidia not typically canoe-shaped

80b Macroconidia typically canoe-shaped, small conidia often also present

.....*Fusarium*