

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control biológico de patógenos fúngicos de la semilla de *Phaseolus vulgaris* L. “frijol común”, en invernadero.

Trabajo de Graduación Presentado por:
Walter Alexis Madrid López

Para optar al grado de
Licenciado en Biología

San Salvador, Ciudad Universitaria, diciembre de 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control biológico de patógenos fúngicos de la semilla de *Phaseolus vulgaris* L. “frijol común”, en invernadero.

Trabajo de Graduación Presentado por:

Walter Alexis Madrid López

Para optar al grado de

Licenciado en Biología

Docente Asesora de Investigación

M. Sc. Rhina Esmeralda Esquivel Vásquez

San Salvador, Ciudad Universitaria, diciembre de 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control biológico de patógenos fúngicos de la semilla de *Phaseolus vulgaris* L. "frijol común", en invernadero.

Trabajo de Graduación Presentado por:

Walter Alexis Madrid López

Para optar al grado de

Licenciado en Biología

Tribunal Calificador

Licda. Blanca Estela Castillo Aguilar

Licda. Jenny Elizabeth Menjívar Cruz

San Salvador, Ciudad Universitaria, diciembre de 2017

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS

VICERRECTOR ACADÉMICO

DR. MANUEL DE JESÚS JOYA

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FISCAL GENERAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA

VICE DECANO

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

SECRETARIA

LICDA. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN

San Salvador, Ciudad Universitaria, diciembre de 2017

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1. Antecedentes	5
4.2. Origen y distribución del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	13
4.3. Descripción botánica del frijol	13
4.3.1. Raíz	13
4.3.2. Tallo.....	14
4.3.3. Hojas	14
4.3.4. Flor	14
4.3.5. Fruto y semilla	14
4.4. Descripción taxonómica del frijol.....	15
4.5. Cultivo de frijol	16
4.6. Requerimientos para el cultivo de frijol	16
4.7. Etapas de desarrollo de la planta de frijol	16
4.8. Agentes causales de enfermedades de la semilla del frijol.....	17
4.8.1. <i>Aspergillus</i> sp.	17
4.8.2. <i>Fusarium</i> sp.....	18
4.8.3. <i>Penicillium</i> sp.....	18
4.8.4. <i>Rhizopus</i> sp.....	18
4.8.5. <i>Sclerotium bataticola</i>	18
4.9. Control biológico.....	19
4.10. <i>Trichoderma</i> sp.....	19
4.10.1. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> sp.....	19
4.10.2. Aspectos generales de <i>Trichoderma</i> sp.	20
4.10.3 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> sp.....	21
4.10.3.1 Micoparasitismo.....	21
4.10.3.2 Antibiosis.....	21

4.10.3.3 Competencia.....	22
5. HIPÓTESIS	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Descripción del área de estudio y tiempo de desarrollo:.....	24
6.2. Fase 1: Fase de laboratorio	25
6.2.1. Selección de semillas	27
6.2.2. Preparación de tratamientos.....	27
6.3. Fase 2: fase de invernadero	28
6.3.1. Aplicación de tratamientos.....	28
6.3.2 Siembra de las semillas.....	29
6.4. Toma de datos.....	30
6.4.1. Porcentaje de germinación de semillas.....	30
6.4.2. Análisis de presencia de patógenos fúngicos.....	30
6.4.3. Comparación del crecimiento de las plantas de frijol	31
6.4.4. Análisis estadístico.....	31
7. RESULTADOS.....	34
7.1. Resultados de la Fase 1: Fase de Laboratorio.....	34
7.1.1. Selección de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	34
7.1.2. Control de calidad de las dos cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	34
7.1.3. Preparación de tratamientos.....	35
7.2. Resultados de la Fase 2: fase de invernadero	36
7.2.1. Germinación de semillas a los 5 días después de la siembra.....	36
7.2.1.1. Germinación a los 9 días después de la siembra.....	38
7.2.1.2. Total de semillas germinadas del 5° al 9° día después de su siembra.....	40
7.2.2. Análisis de presencia de patógenos fúngicos.....	42
7.2.2.1. Presencia de patógenos fúngicos a los 10 días.....	42
7.2.2.2. Presencia de patógenos fúngicos a los 20 días.....	44
7.2.3. Comparación del crecimiento de las plantas de frijol.....	46
7.2.3.1. Longitud de tallo al final del ciclo del cultivo.....	46

7.2.3.2. Longitud de la raíz al final del ciclo del cultivo.....	49
7.2.3.3. Longitud total de las plantas al final del ciclo del cultivo.....	52
7.3. Temperatura registrada durante el ciclo de cultivo.....	54
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
8.1. Germinación de semillas de frijol.....	55
8.2. Presencia de patógenos fúngicos.....	56
8.2.1. Presencia de patógenos fúngicos a los 10 días de crecimiento.....	56
8.2.2. Presencia de patógenos fúngicos a los 20 días de crecimiento.....	58
8.3. Comparación del crecimiento de las plantas de frijol.....	60
8.4. Temperatura registradas durante el ciclo de cultivo.....	61
9. CONCLUSIONES.....	63
10. RECOMENDACIONES	65
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
12. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración que se esperaba para cada cepa de <i>Trichoderma</i> spp., así como la formulación para cada tratamiento.....	28
Cuadro 2. Control de calidad para la Cepa 1 y Cepa 2 de <i>Trichoderma</i> spp.	35
Cuadro 3. Concentración y formulación para cada tratamiento.....	35
Cuadro 4. Germinación de semillas de frijol, a los 5 días después de la siembra.....	36
Cuadro 5. Tratamientos en los cuales se obtuvieron diferencias estadísticas.....	38
Cuadro 6. Germinación de semillas de frijol, a los 9 días después de la siembra.....	38
Cuadro 7. Total de semillas germinadas del 5° al 9° día después de su siembra.....	40
Cuadro 8. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.....	42
Cuadro 9. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.....	44
Cuadro 10. Longitud total en centímetros de los tallos de plantas en cada tratamiento.....	47
Cuadro 11. Promedio de Longitud de tallo al final del ciclo de cultivo.....	48

Cuadro 12. Longitud total en centímetros de las raíces de plantas por cada tratamiento.....	50
Cuadro 13. Promedio de la Longitud de raíz de las plantas al final del ciclo de cultivo.....	51
Cuadro 14. Longitud total en centímetros de las plantas en cada tratamiento.....	52
Cuadro15. Promedio de la Longitud total de las plantas al final del ciclo de cultivo.....	53
Cuadro 16. Promedios de temperatura obtenidas durante dos meses.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fase vegetativa y reproductiva del desarrollo de la planta de frijol y las etapas correspondientes a cada fase. Adaptado de: (Arias et al. 2007).....	17
Figura 2. Ubicación geográfica del sitio de estudio; A: Mapa de El Salvador B: Ubicación de CENTA, Ciudad Arce, Depto. La Libertad.....	24
Figura 3. Ubicación geográfica del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA). A: Laboratorio de Parasitología Vegetal; B: San Andrés 1 (Invernadero).	25
Figura 4. Fase Vegetativa de las Plantas de Frijol. A) Etapa V0: Germinación, B) Etapa V1: Emergencia.....	36
Figura 5. Porcentaje (%) de germinación de semillas tratadas con la Cepa 1 y Cepa 2, Fungicida y el Testigo a los 5 días después de su siembra.....	37
Figura 6. Fase Vegetativa de las Plantas de Frijol. Etapa V2: Hojas primarias.....	39
Figura 7. Porcentaje (%) de germinación de semillas tratadas con la Cepa 1 y 2, Fungicida y el Testigo a los 9 días después de su siembra.....	39
Figura 8. Diferentes etapas de crecimiento en las plántulas de frijol en una misma maceta.....	41
Figura 9. Germinación de semillas del 5° al 9° día.....	41
Figura 10. Presencia e identificación de los hongos; A) <i>Aspergillus</i> sp., 1a. Conidióforos de vistos al estereoscopio, 2a. Conidióforos y esporas vistas al microscopio (10X); B) <i>Fusarium</i> sp., 1b. Micelio en corte trasversal de raíz, 2b.	

Macroconidias vistas al microscopio (40X); C) <i>Penicillium</i> sp., 1c. Conidióforos y micelio vistos con el estereoscopio, 2c. Conidióforos y conidios vistas con microscopio (40X); D) <i>Sclerotium bataticola</i> , 1d. Micelio en corte de raíz visto con el estereoscopio, 2d. Esclerocios observados con el microscopio (40X).	43
Figura 11. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.....	44
Figura 12. Presencia e identificación de los hongos; A) <i>Aspergillus</i> sp., 1a. Conidióforos en corte de raíz, 2a. Conidióforos y esporas vistas al microscopio (40X); B) <i>Fusarium</i> sp., 1b. Micelio en corte trasversal de tallo, 2b. Micelio y macroconidias vistas al microscopio (40X); C) <i>Sclerotium bataticola</i> , 1c. Micelio en corte de raíz visto con el estereoscopio, 2d. esclerocios observados con el microscopio (40X).	45
Figura 13. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.....	46
Figura 14. Plantas de frijol durante la medición de tallo, antes de la extracción completa.....	47
Figura 15. Promedio de la Longitud de tallo de las plantas al final del ciclo de cultivo.....	48
Figura 16. Raíces tipo obtenidas por cada tratamiento; A) Cepa 1, B) Cepa 2, C) Fungicida y D) Testigo.....	49
Figura 17. Promedio de la Longitud de raíz de las plantas al final del ciclo de cultivo.....	51

Figura 18. Promedio de la Longitud total de las plantas al final del ciclo de cultivo.....	53
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Evaluación o pruebas de control de calidad para las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. (Pureza, concentración y vialidad).	72
Anexo 2. Proceso de extracción de esporas de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	72
Anexo 3. Resultado del análisis patológico de las semillas de frijol CENTA-pipil.....	73
Anexo 4. Resultado del análisis patológico de las semillas de frijol CENTA-pipil.....	73
Anexo 5. Presencia de hongos y bacterias en suelo, anterior a la solarización.....	74
Anexo 6. Presencia de hongos y bacterias en suelo, posterior a la solarización.....	74
Anexo 7. Ubicación de los tratamientos en el macrotúnel.....	74

1. RESUMEN

Con la finalidad de proponer biopreparados sustitutos de fungicidas químicos, se observó el efecto del hongo *Trichoderma* spp. en plantas de frijol de la variedad CENTA-pipil durante su ciclo de cultivo. Los efectos del hongo que se evaluaron fueron: germinación, control de patógenos fúngicos en plántulas y crecimiento de las plantas al final del ciclo de cultivo.

Este trabajo se desarrolló en las instalaciones del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), en dos fases: laboratorio e invernadero, en el primero; se reprodujeron masivamente dos cepas de *Trichoderma* spp. en sustrato sorgo-aserrín de madera, para la obtención de esporas que fueron utilizadas como control biológico aplicándolas sobre las semillas de frijol antes de la siembra. Además, se utilizó un fungicida comercial (Control Positivo) y agua (Testigo).

Las semillas utilizadas presentaron una incidencia de hongos patógenos mayores al 10% (límite permisible), estos fueron: *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Sclerotium bataticola*. Para la fase de invernadero de este bioensayo, se realizó la siembra de semillas en macetas con capacidad de 10 L, con cinco semillas cada una, las cuales se colocaron en invernadero siguiendo un Diseño completamente al azar con los cuatro tratamientos y cinco repeticiones.

Como resultado de la investigación se demostró que no todos los tratamientos tuvieron el mismo efecto en el control de patógenos fúngicos de la semilla de frijol, pero que el hongo *Trichoderma* spp. favorece al proceso de germinación, crecimiento y protección radicular y control sobre los hongos patógenos que atacan a la semilla de frijol; lo cual se demostró en cada etapa del ensayo.

Durante la germinación se obtuvo diferencia significativa para la Cepa 2 respecto al tratamiento utilizado como Testigo. Además, se demostró que, tanto la Cepa 1 como la Cepa 2 de *Trichoderma* spp., controlan el crecimiento de *Fusarium* sp. y

Sclerotium bataticola. Lo cual, se comprobó al realizar cortes de las plántulas con 10 y 20 días de crecimiento y aislados en medio de cultivo PDA.

Al final del ciclo de cultivo, las plantas tratadas con la Cepa 1 y Cepa 2 demostraron raíces más sanas y de mayor longitud comparadas con los controles, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

2. INTRODUCCIÓN

En El Salvador, la presencia y aumento de patógenos fúngicos en los cultivos, sobre todo en semillas, demanda nuevos métodos de control para los agricultores; los patógenos fúngicos son los principales agentes causantes de muchas enfermedades en plantas, estos generan reducción en la producción y almacenamiento de granos (Membreño et al. 2001; Groenewold et al. 2003; Martínez et al. 2014).

El frijol es uno de los cultivos mayormente afectado ya que estos microorganismos causan reducción y fallas en la germinación, así como, el apareamiento de manchas foliares y pudriciones en la raíz y tallo de las plantas.

El aumento de enfermedades y la demanda en la producción de frijol también exigen nuevos métodos de control para estos hongos. Los métodos actuales están basados sobre todo en la utilización de fungicidas, que degradan el suelo y contaminan los ríos (Sivila y Alvarez 2013).

El control biológico surge como una necesidad en la sustitución de los fungicidas por productos basados en agentes biológicos como los hongos (Tovar 2008), ejemplo de ello, el hongo antagonista *Trichoderma*, ha sido objeto de estudios *in vitro* y a nivel de invernadero, en donde se han obtenido efectos diferentes aun utilizando la misma cepa en ambos campos. Debido a esto, Hoyos-Carvajal et al. (2008) explica que no se puede extrapolar la actividad antagónica de aislamientos de *Trichoderma* basándose únicamente en experimentos *in vitro*.

Por lo que, este estudio se desarrolló con el objetivo de evaluar a nivel de invernadero a dos cepas del hongo *Trichoderma* spp., utilizándolo como controlador biológico de hongos patógenos causantes de enfermedades en la semilla de frijol, y de esta forma proponer un nuevo tratamiento, para aumentar el porcentaje de germinación, el vigor de las plantas y fitosanidad del cultivo.

3. OBJETIVOS

GENERAL:

- Evaluar la efectividad de *Trichoderma* spp. como controlador biológico de patógenos fúngicos de la semilla de *Phaseolus vulgaris* L. “frijol común”, en invernadero.

ESPECIFICOS:

- Determinar el porcentaje de germinación de semillas de frijol inoculadas con dos cepas de *Trichoderma* spp.
- Comparar el porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos fúngicos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. y *Sclerotium bataticola* por las dos cepas de *Trichoderma* spp.
- Identificar la cepa del hongo *Trichoderma* spp. que ejerce mejor control sobre los hongos patógenos de la planta de frijol.
- Comparar el desarrollo de las plantas de frijol tratadas con las dos cepas de *Trichoderma* spp.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Antecedentes

En la búsqueda de controladores biológicos contra distintas enfermedades se han realizado diferentes estudios con el hongo *Trichoderma* sp. Ejemplo de ello es el trabajo de López-Herrera et al. (1999) donde se abordó el control biológico de los hongos *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*; obtenidos de plantaciones aguacateras al sur de España. En sus resultados *in vitro* realizados con cultivos duales, obtuvieron un claro efecto antagonista contra *P. cinnamomi* y *R. necatrix*. Por otro lado, los resultados de control de estos patógenos con el antagonista en plantas inoculadas en invernadero no fueron satisfactorios, aunque se observó un aumento de vigor en las plantas inoculadas sólo con *Trichoderma* sp., lo cual fue reflejado en el peso seco de las raíces aguacate (*Persea americana*).

Durante la investigación realizada por Cupull et al. (2003), en el vivero de la Estación de Investigaciones de Café Jibacoa, provincia de Villa Clara, con el objetivo de determinar el efecto de *Trichoderma viride* sobre la germinación, el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. variedad Caturra Rojo. A los 50 días obtuvieron una germinación entre el 34,2 y 39,2 % en los tratamientos con *Trichoderma*; la incidencia de *Rhizoctonia solani* osciló entre 1,7 y 7,0 % en los tratamientos 2, 3 y 4, el testigo presentó hasta un 53,6 % de afectación y los tratamientos 3 y 4 mostraron diferencia significativa en todos los índices morfológicos evaluados en relación con los dos testigos. Determinaron que, con la aplicación de *Trichoderma* se acelera la germinación, no se necesita aplicar Zineb y se obtienen posturas más vigorosas.

En otra investigación realizada en las provincias de Pinar del Río, Villa Clara, Sancti Spiritus y la provincia de Granma en Cuba, con el fin de controlar hongos fitopatógenos en semilleros de tabaco utilizando *Trichoderma harzianum*, Stefanova et al. (2004) consideraron a *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* como las

principales especies causantes de pérdidas en producción de plántulas. Además, describieron que el producto biológico para aplicación de control contra estos patógenos se obtuvo por métodos bifásicos establecidos en los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) de la cepa A-34 de *T. harzianum*, la cual se aisló de la rizosfera de plantas de frijol y fue utilizado en semilleros de cuatro provincias. La primera dosis fue aplicada en la siembra y otra aproximadamente a los quince días. De forma general con sus resultados concluyeron que el producto biológico a partir de *T. harzianum* aplicado en los semilleros de tabaco, protege al cultivo de los hongos *P. nicotianae*, *R. solani* en suelos con niveles bajos de infección. También se refirieron a la poca eficacia del bioproducto en algunos semilleros, donde explican que probablemente se debió a una aplicación deficiente.

Así mismo, Guigón-López y González-González (2004) realizaron estudios con el objetivo de coleccionar cepas nativas de *Trichoderma* spp. para evaluar su actividad antagonista contra el hongo *Phytophthora capsici* Leonian y como promotoras de crecimiento en cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). Es sus resultados sobresalen las cepas TC74, TyB y TS01 que redujeron en un 51%, 47% y 45% el crecimiento de *P. capsici* en cultivos *in vitro*. Con las pruebas de antagonismo en invernadero observaron distintos comportamientos respecto al marchitamiento producido por *P. capsici*, explicando que mientras la población del patógeno en el suelo no sea elevada, es más probable que el biocontrol sea más significativo. Al evaluar el crecimiento de las plantas, todos los tratamientos que incluían las cepas nativas de *Trichoderma* spp. superaron en crecimiento al testigo, aunque no todos los tratamientos fueron estadísticamente significativos. Es importante también mencionar que, a los 20 días pudieron aislar con mayor presencia la cepa TC74 a nivel de raíz y TS01 con mayor presencia en el suelo de la rizósfera.

En otro estudio se analizó el uso de *Trichoderma harzianum* como agente biocontrolador del hongo *Phytophthora capsici* agente causal de podredumbre en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.), para ello en el trabajo realizado por

Ezziyyani et al. (2004) se analizaron los mecanismos de biocontrol y optimizaron el medio de producción de su biomasa, incrementando los niveles de enzimas hidrolíticas producidos por *T. harzianum* para obtener biopreparados más eficaces. Como resultado de esta investigación *T. harzianum* mostró gran eficiencia antagonista contra *P. capsici* en los cultivos duales *in vitro*. A su vez el peso seco de las plántulas crecidas a partir de semillas de pimiento tratadas con *T. harzianum* se incrementó significativamente. Concluyendo que la selección de *Trichoderma* mediante cultivos duales es útil pero no garantiza un buen comportamiento de las cepas en invernadero, ya que el efecto antagonista se vio reducido desde, un 100% *in vitro* y entre 56 y 22% *in vivo*.

Otra investigación realizada en México, para evaluar la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de manchas foliares del Plátano (*Musa* sp.), en condiciones *in vitro* e invernadero. Arzate-Vega et al. (2006) colectaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. de suelo en 15 huertas de plátano infectadas con *M. fijiensis* con grados de incidencia del 100%, ubicadas en la localidad de Tenexpa. Se eligieron los aislamientos de *Trichoderma* spp. con mayor habilidad para inhibir el crecimiento del micelio de *M. fijiensis*. Para la evaluación del control en plantas de plátano en invernadero se reprodujo masivamente el hongo antagonista, utilizando como sustrato olote de maíz (*Zea mays* L.) triturado. En sus resultados obtuvieron 25 cepas nativas de *Trichoderma* spp.; de estas, ocho presentaron inhibición del crecimiento de *M. fijiensis*. Las cepas J20, J25, J24, J7, J12 y J11 tuvieron el antagonismo más agresivo, inhibiendo el desarrollo y el crecimiento del fitopatógeno. En invernadero, las cepas de *Trichoderma* spp. J7 y J11 presentaron los menores porcentajes de infección con 0.70% y 0.88% respectivamente, sobre el desarrollo de *M. fijiensis*, por lo que poseen potencial para ser biocontroladores y sugirieron evaluarlas en campo.

Arias y Duarte (2006) realizaron su trabajo de investigación, con el fin de determinar las dosis efectivas del biopreparado *Trichoderma* (*koningii* y *harzianum*) sobre

Sclerotium rolfsii causante del mal de talluelo en chile dulce (*Capsicum annum*). El estudio se realizó en laboratorio y en campo. Las dosis utilizadas fueron (T0: Testigo; T1:0.75 gr; T2: 0.37gr; T3:0.56gr; T4:0.93gr; T5:1.12gr) utilizando para cada dosis un total de 193 semillas de chile dulce variedad Yolo Wonder, empleando macetas con un volumen de 145.32 cm³. En la prueba realizada en laboratorio en cultivos duales, se demostró la agresividad del antagonista mostrando un crecimiento arriba del 40% en tres días y el patógeno con un crecimiento aproximado del 2%. De manera general, la evaluación en campo de las dosis del biopreparado *T. koningii* y *T. harzianum* para controlar *S. rolfsii*, demostró obtener resultados favorables utilizando cualquier dosis para controlar la enfermedad, además de aumentar el crecimiento sano y vigoroso de planta.

Así mismo, otros estudios enfocados en el uso de *Trichoderma* como agente biocontrolador de hongos de suelo por Perdomo et al. (2007), se compararon aplicaciones en forma líquida y sólida del *Trichoderma harzianum* en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), para el control de la enfermedad “sancocho” caracterizada por una podredumbre en la base del tallo que causa muerte a la planta y pérdidas al productor. Tomaron muestras de plántulas de tomate que presentaban síntomas de la enfermedad, en Monay estado de Trujillo. De las muestras identificaron los principales hongos patógenos causantes el “sancocho” como *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y el hongo antagonista *T. harzianum*. El hongo *T. harzianum* cepa (Th-04M) se utilizó bajo dos formas de aplicación: Líquida y Sólida. El diseño experimental consistió en 5 tratamientos y 6 repeticiones por tratamientos aplicados directamente al semillero con aproximadamente 5.400 plantas por tratamiento, realizando por cuatro semanas. Donde obtuvieron resultados positivos en la aplicación de *Trichoderma* en forma líquida y sólida para el control de estos patógenos en los semilleros de tomate.

Rivas et al. (2008) describen sus estudios realizados en invernadero aplicando *Trichoderma harzianum* (Bio-Tric® 15WP) en diferentes concentraciones, con el fin de controlar el “mal de talluelo” causados por los hongos *Fusarium* sp., *Phytium* sp.,

Sclerotium sp., en plántulas de aguacate (*Persea americana*). Las siembras con los distintos tratamientos se realizaron por la mañana, e inmediatamente se aplicaron los hongos patógenos causantes del “mal de talluelo”. En sus resultados, ningún tratamiento registró la presencia los patógenos fúngicos inoculados que producen la enfermedad en las plántulas de aguacate, pero si se registró la presencia de *T. harzianum*, con lo que comprobaron la efectividad de dicho hongo en el control de estos fitopatógenos, aunque no existió diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. También enfatizan en que hubo una infección por parte de los diferentes tratamientos de *Trichoderma harzianum* (Bio-Tric® 15WP) hacia los tratamientos testigos, atribuyendo esta infección a la agresividad en el crecimiento de este hongo.

Cubillos-Hinojosa et al. (2009) realizaron un experimento en condiciones de laboratorio e invernadero, para evaluar el efecto de la cepa nativa TCN-014 y la cepa comercial TCC-005 de *Trichoderma harzianum* sobre la germinación y el crecimiento del maracuyá. Se utilizaron inóculos de 10^4 , 10^6 y 10^8 conidias/mL para cada cepa y se aplicaron a semillas de maracuyá; se evaluó el número de semillas germinadas durante 15 días; también se calculó el porcentaje de germinación, el índice de velocidad de germinación y el tiempo medio de germinación. Luego, las semillas germinadas se llevaron a invernadero, después de dos meses se midió la altura de las plántulas, el grosor del tallo, el número de hojas, la longitud de la raíz y el peso seco total. Como resultado, observaron que todos los tratamientos estimularon la germinación y aceleración de este proceso en las semillas y el desarrollo de las plántulas; aunque la cepa nativa mostró mejores resultados que la cepa comercial.

En Colombia, Cubillos et al. (2011) con el propósito de evaluar el potencial antagónico de la cepa nativa TCN-014 y la comercial TCC05 de *Trichoderma harzianum* en condiciones de invernadero frente a *Fusarium solani* causante de la marchitez del maracuyá en la zona bananera de la Magdalena, seleccionaron la cepa TCN-014 de *T. harzianum* aislada del suelo de un cultivo de palma africana en

la Estación Experimental Caribia de CORPOICA, que se destaca por su capacidad micoparasítica frente al patógeno *F. solani*, también seleccionaron la cepa comercial TCC-005 y la cepa patógena de *F. solani* que fue aislada a partir de plantas de maracuyá. Encontrando que la cepa nativa TCN-014 y la comercial TCC-005 de *T. harzianum* presentan buen efecto biocontrolador sobre *F. solani*, disminuyendo considerablemente los síntomas de marchitez, el número de plántulas enfermas, plantas con pudrición y plántulas muertas, en condiciones de invernadero. Además de observar que existe una mayor efectividad de la cepa nativa frente a la comercial.

Trabajos posteriores como el de Michel-Aceves et al. (2013) quienes realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el potencial de cepas nativas de *Trichoderma*, en la reducción de daños ocasionados por *Sclerotium rolfsii* en cacahuete en cultivos *in vitro* y en invernadero. Observaron que en condiciones *in vitro*, uno de los tratamientos inhibió el 73% del crecimiento micelial de *S. rolfsii*, mientras que otro tratamiento con menor concentración de *Trichoderma* sólo inhibió el 62%. En invernadero, el tratamiento con la cepa del hongo *Trichoderma* Thzcf-12 MT fue el más sobresaliente, aun sobre el fungicida químico PCNB D, con 36.80 g. reportando diferencias muy significativas al comparar las cepas Thzcf-12 y Tcn-11 (43.4 g) contra *S. rolfsii* (26.50 g), observando mayor protección y crecimiento del sistema radicular por parte de los agentes biológicos.

Por otro lado, Ortuño et al. (2013) seleccionaron cepas de *Trichoderma* spp., como generadoras de metabolitos promotores de crecimiento en plantas cultivadas *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*. Donde se Estudió la interacción *Trichoderma-Trichoderma* entre 35 cepas, debido al potencial del hongo para sintetizar Metabolitos Secundarios (MS), como el ácido-3-indolacético (AIA), mediante enfrentamientos duales en medio de cultivo sólido (PDA). Para la selección de las cepas de *Trichoderma* spp. productoras de MS, se produjo el estrés biológico del hongo mediante enfrentamientos duales, se tomaron las cepas capaces de formar “barreras de defensa” entre 0.5-0.7cm como ancho óptimo. Los enfrentamientos

seleccionados se replicaron en medio de cultivo líquido potato-dextrose-broth (PDB), a los 9 días de crecimiento se filtró el caldo para separar los metabolitos sintetizados por el hongo. De esta forma identificaron *in vitro* y a nivel de invernadero algunos tratamientos que podrían utilizarse como promotores de crecimiento de *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*, ya que en los cultivos tratados con el inóculo del caldo que contenía metabolitos secundarios presentaron hojas más resistentes en comparación con el fertilizante químico INKAFERT-AZULI, el cual a su vez presentó mayor marchitamiento tempranamente.

Otro estudio realizado en Costa Rica, con el objetivo de estudiar la capacidad antagónica *in vitro* del hongo *Trichoderma* sp. y la bacteria *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo; *Sclerotium cepivorum*, *Pseudomonas marginalis* y *Penicillium* sp., Astorga-Quirós et al. (2014) utilizaron muestras de tejido vegetal como bulbos de ajo, rizosfera y suelo con signos de las diferentes enfermedades en el campo, procedentes de la zona norte de Cartago. Las pruebas de antagonismo se realizaron en cultivos duales. En el enfrentamiento de bacteria frente a bacteria, se incubaron cepas de *B. subtilis* y *P. marginalis* en un medio glucosado y del mismo modo se utilizó un medio glucosado para evaluar *B. subtilis* frente a *Penicillium* sp. y a *S. cepivorum*. Para determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. frente a *P. marginalis* se utilizó PDA y el mismo medio de cultivo para evaluar a *Trichoderma* sp. contra *Penicillium* sp. y *S. cepivorum*. Las bacterias se rayaron en la placa y los hongos se colocaron en un disco de 1 cm de diámetro en el centro de la placa. En sus resultados se determinó que las cepas estudiadas de *Trichoderma* sp. pueden ser utilizadas como antagonistas frente a la pudrición por *Penicillium* sp. en ajo, bacteriosis por *P. marginalis* y pudrición blanca por *S. cepivorum*. Observando por el contrario que la cepa aislada de *Bacillus subtilis*, no logró controlar los diferentes patógenos.

Avilés (2014) realizó un estudio en el Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA, para evaluar la efectividad antagónica de dos cepas de *Trichoderma* sobre hongos patógenos de la semilla de frijol. Utilizando para ello una cepa de CORDES

y otra con procedencia de Bolivia y algunos hongos patógenos de la semilla de frijol como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Sclerotium* sp. y *Fusarium* sp., todos aislados de semillas de frijol que ingresan como muestras al laboratorio. Como resultado de los enfrentamientos duales, observó que la cepa de *Trichoderma* spp., proveniente de Bolivia controló con mayor rapidez a los patógenos, en comparación con el *Trichoderma* spp., proveniente de CORDES, a pesar de que no hubo resultados estadísticamente significativos entre ellos. También determinó que ambas cepas atacaron a los patógenos, controlando con mayor eficiencia a *Penicillium* spp. y *Sclerotium* spp. Y observó que *Fusarium* sp. demostró mayor resistencia a ser controlado.

Un trabajo reciente con *Trichoderma* en El Salvador fue elaborado por López (2015), quien estudió la inducción de resistencia al virus del mosaico dorado del chile dulce (*Capsicum annuum* L.), mediante la interacción de la planta con preparados orgánicos y *Trichoderma harzianum*, Rifai, realizado en vivero con el objeto de disminuir la incidencia de enfermedades virales. Para ello cuantificó la efectividad de tres preparados orgánicos (Bocashi, Lombriabono y Té de lombriabono) y un preparado comercial de *T. harzianum* Rifai (Excalibur Gold 5 FS®), como inductores de resistencia. Se realizaron dos ensayos inoculando el virus con mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) a los 25 y 22 días después de la siembra del chile dulce (*Capsicum annuum* L.). En los resultados observó que los plantines tratados con *T. harzianum* Rifai (5X10⁹ UFC/5 ml) presentaron un menor grado de enfermedad, comparado con los preparados orgánicos. La adición de preparados orgánicos (Bocashi, Lombriabono y Té de lombriabono) al sustrato promovió un mayor desarrollo en las plantas, pero no tuvo efecto en el control de la infección por el virus. Demostrando que la inoculación con *T. harzianum* Rifai (5X10⁹ UFC/5 ml) al sustrato para la producción de plantines puede ser una opción técnica y económicamente viable.

4.2. Origen y distribución del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

Investigaciones en características morfológicas, agronómicas y genéticas, establecen que el frijol común se originó en Mesoamérica y fue domesticado aproximadamente entre 500 y 2000 años a.C. A su vez, estudios arqueológicos revelan que esta domesticación del frijol comenzó en Mesoamérica y en los Andes, siendo dos áreas geográficamente bastante separadas y donde se encontraron los restos más antiguos (Hernández-López et al. 2013).

Desde la domesticación del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en América central y México, esta especie se extendió a otras zonas de América y posteriormente a Europa, África, Asia y Oceanía (Mayor 2010).

De acuerdo con el Jardín Botánico de Missouri (2017), sobre la flora de Nicaragua, menciona que esta planta es poco común en bosques de pino-encinos, zonas pacífica y atlántica; 1000 – 1300 m.s.n.m. Además, explica que las poblaciones silvestres se distribuyen desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina.

4.3. Descripción botánica del frijol

4.3.1. Raíz

En las primeras etapas del desarrollo el sistema radical está formado por la radícula del embrión, la cual se convierte después en la raíz primaria, luego se comienzan a observar las raíces secundarias. El sistema radical es superficial ya que el mayor volumen de raíces se encuentra en los primeros 20 cm de profundidad. Una de las principales características de la raíz del frijol es la presencia de nódulos en raíces laterales de la parte superior y media del sistema radical, los cuales son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, que fijan el nitrógeno atmosférico que es utilizado por la planta (Arias et al. 2007).

4.3.2. Tallo

Es el eje central de la planta, se origina del meristemo apical del embrión de la semilla y está formado por la sucesión de nudos y entrenudos. Cada nudo del tallo es un punto donde se insertan las hojas o los cotiledones, también las ramas, los racimos y las flores. El tallo es herbáceo y posee un diámetro mayor que las ramas, este a su vez puede ser erecto, semiprostrado y prostrado, según la variedad de frijol (Arias et al. 2007).

4.3.3. Hojas

El frijol posee dos tipos de hojas, las hojas simples están insertadas en los nudos del tallo y las ramas. Las hojas primarias son simples y aparecen en el segundo nudo del tallo, estas se forman en la embriogénesis en la semilla y caen antes de que la planta se desarrolle por completo. Las compuestas trifoliadas son las hojas típicas del frijol y tienen tres folíolos, un pecíolo y un raquis, con par de estípulas de forma triangular muy visibles en la inserción de estas hojas (Arias et al. 2007).

4.3.4. Flor

Es una típica flor papilionácea. En su desarrollo se distinguen dos estados; El botón floral, bien originado en las inserciones de un racimo o en el desarrollo floral de las yemas de una axila, está envuelto por bractéolas de forma ovalada o redonda. Y finalmente la corola, que está cerrada, sobresale y está cubierta por bractéolas que cubren sólo el cáliz. Durante el fenómeno de antesis la flor se abre (Arias et al. 2007).

4.3.5. Fruto y semilla

El fruto de la planta de frijol es una vaina con dos valvas. Las vainas pueden presentar diversas características color dependiendo la variedad de frijol.

Según Arias et al. (2007), desde el punto de vista estructural la semilla de frijol está conformada externamente por:

- La testa o cubierta, que corresponde a la capa secundaria del óvulo.
- El hilum, que conecta la semilla con la placenta.
- El micrópilo, que es una abertura en la cubierta cerca del hilum. A través de esta abertura se realiza la absorción del agua.
- El rafe, proveniente de la soldadura del funículo con los tegumentos externos de óvulo.
- Internamente, la semilla está constituida por el embrión, el cual está formado por la plúmula, las dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos cotiledones y la radícula.

4.4. Descripción taxonómica del frijol

El nombre fue asignado por Linneo en 1753 (Díaz 2012) y de acuerdo con la información obtenida de la base de datos en línea del Sistema de Información Taxonómica Integrada (2017), ITIS por sus siglas en inglés. El frijol común *Phaseolus vulgaris* L., se ubica taxonómicamente como:

Reino	<u>Plantae</u>
Subreino	<u>Viridiplantae</u>
Infrareino	<u>Streptophyta</u>
Superdivisión	<u>Embryophyta</u>
División	<u>Tracheophyta</u>
Subdivisión	<u>Spermatophytina</u>
Clase	<u>Magnoliopsida</u>
Superorden	<u>Rosanae</u>
Orden	<u>Fabales</u>
Familia	<u>Fabaceae</u>
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>vulgaris</i> L.

4.5. Cultivo de frijol

Dentro de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común es una de las más importantes. Entre sus propiedades nutritivas se mencionan su alto contenido proteico y en menor proporción carbohidratos, vitaminas y minerales. Dependiendo del tipo de frijol, el contenido de proteínas puede variar entre 14% al 33% (Ulloa et al. 2011).

Se calcula que a nivel mundial se generan unos US\$ 11,000 millones de dólares provenientes de la producción de frijol, sobre todo en países en desarrollo y que anualmente se producen cerca de 12 millones de toneladas métricas. A pesar de estas cifras, en algunos países de América las pérdidas en su producción alcanzan hasta un 30% por daños causados por hongos (Erazo 2004).

4.6. Requerimientos para el cultivo de frijol

El agua es un componente indispensable para el crecimiento del frijol, aunque existen variedades que poseen diferentes rangos de tolerancia a deficiencias hídricas. De igual forma, las diferentes variedades de frijol presentan amplios rangos de tolerancia a la temperatura, generalmente el frijol se desarrolla óptimamente en promedios de 15 a 27°C a elevaciones entre 400 a 1,200 msnm.

La exposición a la luz también es importante para realizar el proceso fotosintético; sin embargo, la alta intensidad puede afectar a planta, por otro lado, la mejor producción de frijol se obtiene de suelos sueltos y livianos que presentan buen drenaje (CENTA 2008).

4.7. Etapas de desarrollo de la planta de frijol

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) estableció una escala para diferenciar las etapas de desarrollo del frijol, basada en la morfología y cambios fisiológicos de la planta; dividiendo su ciclo biológico en dos fases. La fase vegetativa y la fase reproductiva. La fase vegetativa se inicia cuando se le brindan

a la semilla las condiciones para iniciar la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales o racimos; la fase reproductiva se inicia al aparecer los primeros botones florales o racimos y la madurez de cosecha (Arias et al. 2007).

Las 10 etapas identificadas durante las fases vegetativa y reproductiva en el desarrollo de la planta de frijol, poseen una escala numérica y están delimitadas por eventos fisiológicos importantes (Fernández et al. 1986; Arias et al. 2007).

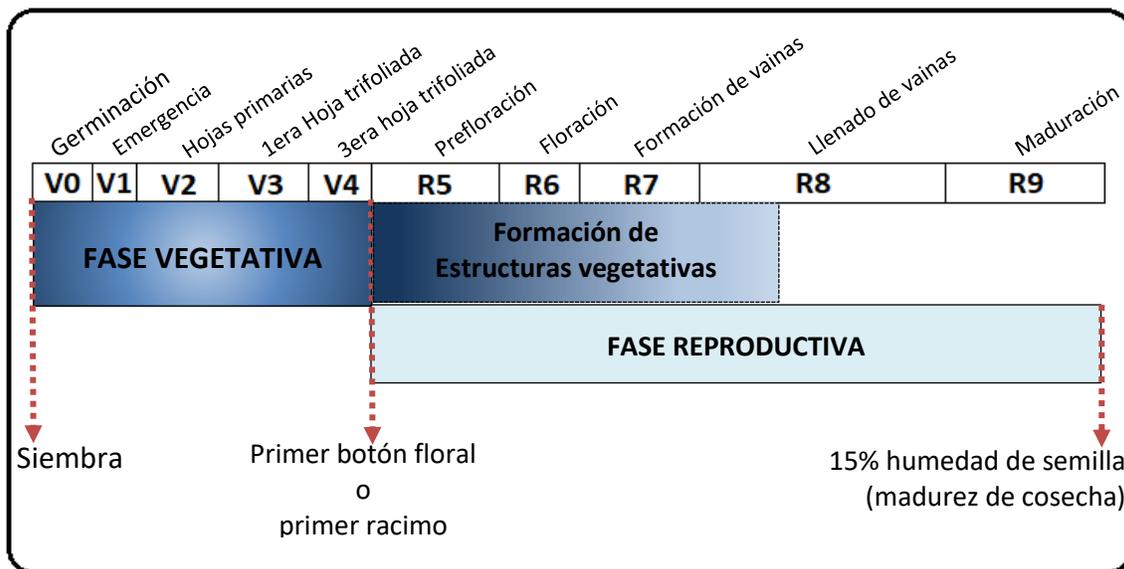


Figura 1. Fase vegetativa y reproductiva del desarrollo de la planta de frijol y las etapas correspondientes a cada fase. Adaptado de: (Arias et al. 2007).

4.8. Agentes causales de enfermedades de la semilla del frijol

4.8.1. *Aspergillus* sp.

El género *Aspergillus* al igual que *Penicillium* se considera como agente de enfermedades de almacenamiento de productos vegetales y legumbres (INTA 2013). Este género posee varias especies que causan la mayoría de las pudriciones y deterioro de granos y leguminosas en el almacenamiento, además al invadir los embriones de las semillas, estos hongos reducen notablemente su porcentaje de

germinación y también tiene la capacidad de producir micotoxinas (Agrios 1995; Bolet y Socarrás 2005).

4.8.2. *Fusarium* sp.

Por lo general se encuentran en el suelo asociados a plantas. La mayoría de las especies de *Fusarium* son saprofitas y afecta a muchas leguminosas como a *Pisum sativum* y *Phaseolus vulgaris* (INTA 2013). Este género es responsable de marchitez y pudrición en raíz de muchas plantas anuales, además atacan granos en el campo y tiene la capacidad de producir micotoxinas (Agrios 1995).

4.8.3. *Penicillium* sp.

El género *Penicillium* produce infecciones en leguminosas almacenadas a bajas temperaturas y con humedad ligeramente arriba de lo normal, es capaz de producir pudrición de frutos y otros órganos, además de producir micotoxinas (Agrios 1995). Se encuentra comúnmente causando podredumbres y es considerado como uno de los hongos más destructivo en almacenamiento, pudiendo encontrarse latente desde su inoculación en la semilla en campo (Bolet y Socarrás 2005; INTA 2013).

4.8.4. *Rhizopus* sp.

Este género causa pudrición blanda de frutos, hortalizas flores, semillas y otros. Se puede encontrar como organismo saprofito o como parásito débil en órganos de plantas y es importante sobre todo durante el almacenamiento, transporte y venta en el mercado de estos productos infectados, este género afecta sobre todo en condiciones altas de humedad. (Agrios 1995).

4.8.5. *Sclerotium bataticola*

Los primeros síntomas de enfermedades causadas por *Sclerotium* pueden ser; amarillamiento, marchitez en hojas inferiores o muerte de la hoja desde su punta

hasta el peciolo. Además de provocar pudrición de raíz y tallo en muchas plantas (Agrios 1995).

4.9. Control biológico

El control biológico de enfermedades de plantas es definido según Bettiol et al. (2014), como el control de un organismo patógeno por otro microorganismo, normalmente denominado antagonista. Para ello, se pueden utilizar poblaciones residentes o introducir el antagonista, considerando como biopesticidas o agentes de control biológico a microorganismos vivos como hongos, bacterias y virus.

Gutierrez-Ramirez et al. (2013) explican que el control biológico involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plagas. La alternativa de control de plagas depende en gran medida de los enemigos naturales utilizados, por lo que sea hace necesario estudiar la ecología, biología y el comportamiento del agente de control seleccionado.

El control biológico presenta una serie de ventajas y desventajas. Una de las ventajas es que los efectos colaterales pueden ser pocos o nulos, además, el control biológico actúa a largo plazo haciendo favorable la relación entre el costo y el beneficio. Las desventajas que presentan están basadas sobre todo en el poco conocimiento sobre los principios del método y falta de apoyo económicos (Guédez et al. 2008).

4.10. *Trichoderma* sp.

4.10.1. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* sp.

El nombre de *Trichoderma* se introdujo por Persoon en 1794, desde entonces la sistemática y taxonomía de estos ha evolucionado, para Blaszczyk et al. (2014) actualmente se clasifica en:

Reino:	Fungi
Filum:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>

4.10.2. Aspectos generales de *Trichoderma* sp.

Este género fue descrito por Persoon en 1794. Posteriormente en 1969 Rifai hizo el primer agrupamiento en especies. En su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y la pared celular está compuesta por quitina y glucano. Pueden reproducirse asexualmente por conidios. Según Martínez et al. (2013) puede presentar conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 µm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados. Posee crecimiento ramificado con hifas de 5 a 10 µm de ancho.

Las especies que pertenecen a este género *Trichoderma* son cosmopolitas, se caracterizan por ser saprofitos, por lo que viven en suelos con materia orgánica siendo capaces de descomponerla y se encuentra distribuido en todas las latitudes desde zonas polares hasta la ecuatorial (Infante et al. 2009).

El hongo *Trichoderma* es anaerobio facultativo, la mayoría de las colonias presentan color blanco al principio y posteriormente se torna a verde oscuro o amarillento, como consecuencia de la densa esporulación, donde se producen tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas, siendo las esporas las más viables de los propágulos que son empleados en diferentes programas de biocontrol. Los valores óptimos para su crecimiento y esporulación oscilan alrededor de los 25°C (Sivila y Alvarez 2013).

Son muchas investigaciones sobre la capacidad de *Trichoderma* para controlar patógenos de muchas plantas importantes económicamente, en las cuales se reduce la incidencia de las enfermedades, pero en la actualidad, la investigación del control biológico de este hongo se centra en la comprensión del modo de acción (Pandya et al. 2011).

4.10.3 Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp.

4.10.3.1 Micoparasitismo

Este mecanismo se refiere a un tipo de simbiosis antagónica muy compleja entre organismos donde se encuentran por lo general enzimas extracelulares implicadas, como quitinasas y celulasas. Durante el micoparasitismo las especies de *Trichoderma* crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante adhiriéndose y enrollándose, en ocasiones las penetran y posteriormente degradan las paredes celulares de este hospedante (Benítez et al. 2004; Infante et al. 2009).

El micoparasitismo ocurre en cuatro etapas las cuales son: *Crecimiento quimiotrófico, adhesión, enrollamiento y Actividad lítica* (Martínez et al. 2013).

4.10.3.2 Antibiosis

Durante la antibiosis, se da la producción de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. (Infante et al. 2009) explica que algunas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que inhiben el desarrollo de otros microorganismos, con los que no hacen contacto físico; estas sustancias inhibidoras son consideradas antibióticas. Además las quitinasas y proteasas de *Trichoderma* spp, se asemejan a la de hongos nematófagos, con lo cual posee el potencial de atacar a pequeños invertebrados, ya sea en el suelo, en el interior de las raíces o sobre estas (Martínez et al. 2013).

4.10.3.3 Competencia

Es uno de los mecanismos más importantes, en este se da un comportamiento desigual entre dos o más organismos por un mismo recurso, este recurso puede ser sustrato o nutrientes como nitrógeno, carbohidratos no estructurales como azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa y quitina; se da cuando uno de los organismo reduce estos nutrientes o el espacio de otros y puede estar asociado a factores como el pH, temperatura, humedad y otros (Infante et al. 2009; Martínez et al. 2013).

El hongo *Trichoderma* posee mayor capacidad que otros organismos para absorber nutrientes, su habilidad su basa en la obtención de ATP por el metabolismo de diferentes azucares (Benítez et al. 2004).

5. HIPÓTESIS

_ Hipótesis nula (H0):

Todos los tratamientos tendrán el mismo efecto en el control de patógenos fúngicos de la semilla de frijol común.

_ Hipótesis alterna (H1):

No todos los tratamientos tendrán el mismo efecto en el control de patógenos fúngicos de la semilla de frijol común.

6. METODOLOGÍA

6.1 Descripción del área de estudio y tiempo de desarrollo:

La investigación se llevó a cabo de octubre de 2016 a enero de 2017, en las instalaciones del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), ubicado en el cantón San Andrés, Ciudad Arce, La Libertad, con coordenadas $13^{\circ}48'09.75''\text{N}$ y $89^{\circ}24'02.64''\text{O}$ y una elevación de 460 msnm, Figura 2.

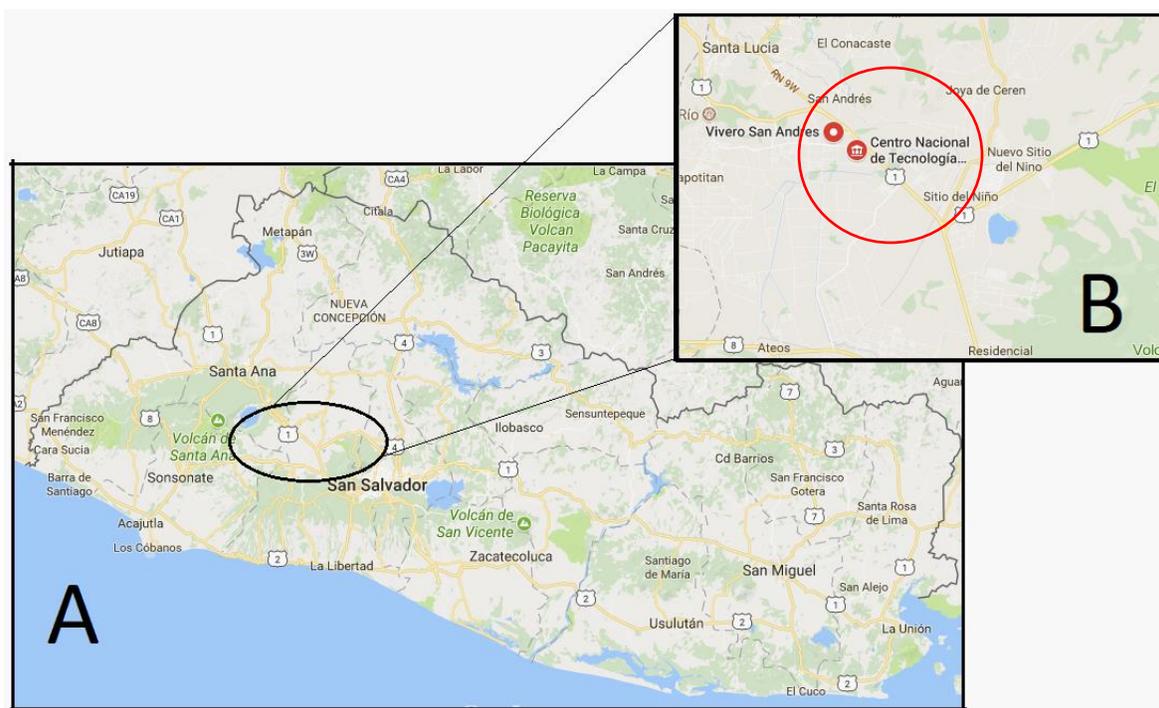


Figura 2. Ubicación geográfica del sitio de estudio; **A:** Mapa de El Salvador
B: Ubicación de CENTA, Ciudad Arce, Depto. La Libertad.

Fuente:

A. <https://www.google.com/maps/search/El+Salvador+RADARES/@13.5666629,-89.2842164,11z/data=!3m1!4b1>

B. <https://www.google.com/maps/search/CENTA+SAN+ANDRES/@13.8179844,-89.35509,12z>

La investigación se desarrolló en dos fases; fase de laboratorio, en el Laboratorio de Parasitología Vegetal y fase de campo, CENTA San Andrés 1, Figura 3.



Figura 3. Ubicación geográfica del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA). **A:** Laboratorio de Parasitología Vegetal; **B:** San Andrés 1 (invernadero).

Fuente: Mapa adaptado de Google Maps 2017.

6.2 Fase 1: Fase de laboratorio

a.1. Selección de las cepas del hongo *Trichoderma*, objeto del estudio: se seleccionaron dos cepas de *Trichoderma* spp. las cuales se nombraron como Cepa 1 y Cepa 2, sugeridas en la literatura por Avilés (2014) y que en ensayos realizados previamente en laboratorio demostraron resultados satisfactorios, pero que no han sido estudiadas en invernadero o en campo. Ambas cepas se tomaron de la micoteca del Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA.

a.2. Evaluación o pruebas de control de calidad: se realizaron las pruebas de control de calidad descritas por Cañedo y Ames (2004); Sivila y Alvarez (2013), para asegurar la confiabilidad del material vegetativo. (Anexo 1)

a.2.1 Pureza: confiabilidad de crecimiento único sin contaminantes.

a.2.2 Concentración: N° de esporas presentes en un volumen determinado.

a.2.3 Viabilidad: capacidad de la espora de reproducirse eficientemente.

a.3. Cultivos monospóricos: cuyo objetivo fue la masificación del hongo para la obtención de esporas, que se utilizaron para la prueba de control de patógenos: para este procedimiento se empleó una mezcla; 40% de granos de sorgo y 60% de aserrín de madera y agua destilada, contenidos en dos frascos de vidrio de 500 mL, los cuales se esterilizaron y posteriormente se inocularon con cada una de las cepas de *Trichoderma* spp., en condiciones de asepsia, en cámara de aislamiento. El material ya inoculado se colocó para su crecimiento dentro de la incubadora (Temperatura de 23 °C) por un período de 1 mes aproximadamente (Cañedo y Ames 2004).

a.4. Secado del hongo y obtención de conidias: cuando el hongo se reprodujo y comenzó a esporular; lo cual se vio en el cambio de coloración del cultivo (color verde) y con el objetivo de extraer la humedad del hongo y obtener únicamente las esporas, se inició el proceso de secado, que consistió en verter el contenido del frasco (hongo y sustrato), dentro de una bolsa o sobre de papel empaque, que se colocó en la cámara de aislamiento por un período de tiempo de 8 días, posteriormente, se procedió a la extracción de esporas. Para ello, se utilizó un tamiz de 35 mesh, bajo el cual se colocó una bolsa plástica, donde quedaron contenidas las esporas. (Anexo 2)

Finalmente, las esporas obtenidas de cada cepa se colocaron en viales rotulados y listos para elaborar los biopreparados.

a.5. Análisis de patología o control de calidad de la semilla de frijol: que incluyó dos métodos; exposición de 10 semillas en caja Petri a luz ultravioleta (10 repeticiones) y siembra de 10 semillas en PDA (2 repeticiones incubadas a

23°C), por cinco días, con lo que se determinó el porcentaje de hongos patógenos que estaban presentes en las semillas seleccionadas. (Anexo 3 y 4)

6.2.1 Selección de semillas

Con base al punto anterior, se utilizaron 4 lb de semillas de la variedad de frijol CENTA-pipil que fue facilitada por el Laboratorio de Parasitología Vegetal, de las muestras que ingresan para realizar el control de calidad de patógenos fúngicos y que presentaron alta incidencia (mayores del 10%), que se utilizarán para la entrega de paquetes agrícolas a los productores.

6.2.2 Preparación de tratamientos

Los tratamientos se prepararon previamente en el laboratorio, para ser llevados al invernadero y ser aplicados directamente a las semillas antes de su siembra, siendo estos:

a.1. *Trichoderma* spp. (Control biológico): de las Cepas 1 y 2, se utilizaron 0.5 g de las conidias obtenidas, ambas se colocaron en un vial respectivamente, con 4 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se agitaron en un vórtex por 3 minutos aproximadamente, para homogenizar la solución.

a.2. Control positivo: la concentración para el control positivo o fungicida comercial, se utilizaron los criterios de aplicación recomendados por el fabricante. Para ello, se utilizó 4 mL de agua destilada estéril y 1 mL de fungicida en un vial y se llevó al vórtex por 3 minutos aproximadamente.

a.3. Control blanco: para el tratamiento 4 o Testigo, se utilizaron 5 mL de agua destilada estéril.

En el Cuadro 1, se detallan la concentración que se esperaba para cada cepa de *Trichoderma* spp., así como la formulación para cada tratamiento:

Cuadro 1. Concentración que se esperaba para cada cepa de *Trichoderma* spp., así como la formulación para cada tratamiento.

Tratamientos	Género o producto	Concentración	Formulación
1	Cepa 1 (Control biológico)	1 x 10 ⁸ conidias aprox.	0.5 g / 4 mL de agua
2	Cepa 2 (Control biológico)	1 x 10 ⁸ conidias aprox.	0.5 g / 4 mL de agua
3	Fungicida (Control positivo)	Aplicado bajo los criterios del fabricante	1 mL / 4 mL de agua
4	Agua (Testigo)	5 mL	5 mL

6.3 Fase 2: fase de invernadero

La fase 2 se realizó en el invernadero de CENTA San Andrés 1, ubicado a 13°48'09.72"N y 89°23'41.35"O a una elevación aproximada de 463 msnm, donde se realizó la siembra de semillas, para ello se utilizó un Macro túnel cubierto con malla agril de aproximadamente 4 m de ancho por 25 m largo. La siembra se realizó en macetas, utilizando 5 para cada tratamiento, lo que equivale a un total de 20 macetas a utilizadas durante el experimento.

6.3.1 Aplicación de tratamientos

Las aplicaciones de los tratamientos se realizaron solo una vez directamente a la semilla, antes de la siembra. Asignando 1 lb de frijol a cada tratamiento. Cada libra de semillas se colocó en una bolsa de polietileno, en la cuales se aplicaron respectivamente cada tratamiento. Posteriormente, se agitaron hasta homogenizar

el contenido de los viales en todas las semillas. Una vez homogenizado, se procedió a su siembra en macetas.

6.3.2 Siembra de las semillas

a.1. Macetas: Por cada tratamiento se utilizaron un total de 5 macetas con capacidad aproximada de 10 L.

a.2. Sustrato: como sustrato se utilizó tierra (suelo franco-arcilloso), extraída de la zona de cultivo del Campo experimental de CENTA San Andrés 1, el cual poseía un pH de 5.9. Además, se le realizó un análisis de presencia de hongos y bacterias en el Laboratorio de Parasitología Vegetal. Los análisis se realizaron antes y después de esterilizar el sustrato. (Anexo 5 y 6)

a.3. Esterilización del sustrato: el sustrato se esterilizó previo a su utilización en el ensayo, por medio del método de solarización, durante dos meses (Pulman 1989), posteriormente se llenaron las macetas.

a.4. Siembra de semillas: por cada maceta se sembraron 5 semillas (5 semillas por puesta), que se sembraron a 2 cm de profundidad, como sugirió Parada (2016) comunicación personal*.

Durante la siembra se etiquetó cada maceta con su respectivo tratamiento. Es importante señalar que la aplicación de tratamientos y siembra de semillas se realizó en el siguiente orden, basándose en los niveles de concentración de cada tratamiento:

(Agua) → (Fungicida) → (*Trichoderma* spp.)

***Comunicación Personal**, Ph. D. Mario Ernesto Parada Jaco, Subgerente de investigación del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA). El Salvador.

a.5. Ubicación de los tratamientos en el macro túnel: Para determinar la ubicación de cada maceta dentro del macro túnel, se utilizó el **Diseño Completamente al azar** con 4 tratamientos y 5 repeticiones por cada uno de ellos.

Las macetas se colocaron en filas transversales, haciendo un total de 5 filas. Donde se sorteó y se dejó al azar la posición de cada tratamiento, de esta forma cada maceta estuvo expuesta a iguales condiciones dentro del macro túnel, sin intervenir el criterio del investigador en la ubicación de las mismas. (Anexo 7)

Es importante recalcar que, cada maceta con sus respectivas semillas tratadas, se colocaron a una distancia de 1 m de separación con las demás macetas, tanto en las filas como en las columnas.

6.4 Toma de datos

6.4.1 Porcentaje de germinación de semillas

La determinación del porcentaje de germinación de semillas de frijol inoculadas con los diferentes tratamientos se realizó por simple observación y conteo, en donde se anotó el total de semillas germinadas por cada maceta. La primera toma de datos se realizó a los cinco días después de la siembra y así sucesivamente hasta alcanzar los nueve días como lo sugiere el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agraria, INTA (2013).

6.4.2 Análisis de presencia de patógenos fúngicos

A los 10 días de germinadas las semillas, se realizó un muestreo destructivo, el cual consistió en extraer una planta de cada maceta. De modo que, se tomó un total de 5 plantas por tratamiento. Las plantas extraídas fueron las que presentaron menor vigor.

Para esta actividad se utilizó medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) en cajas Petri, donde se colocaron pequeños cortes de diferentes partes de la planta de frijol como; cotiledones, raíz, tallo y hoja, incubados por siete días a 23°C, para determinar y cuantificar la presencia de patógenos fúngicos. Además, se realizaron otras observaciones como el apareamiento de manchas foliares o pudriciones en la planta.

Este mismo procedimiento se realizó a los 20 días, para comparar la presencia de patógenos fúngicos con el primer muestreo destructivo.

6.4.3 Comparación del crecimiento de las plantas de frijol

Para comparar el crecimiento de las plantas de frijol que se encontraban en las macetas, cada semana se midió la altura a partir de la base del tallo de dos plantas por maceta, con ayuda de una cinta métrica. Además, se tomaron medidas de la temperatura en cada día de monitoreo (3 veces por semana).

Al final del ciclo del cultivo (65 días), se realizaron mediciones de Longitud de tallo (realizada antes de extraer las plantas de las macetas), posteriormente se extrajeron completamente las plantas bajo tratamiento, para ser llevadas al laboratorio donde se midió la Longitud de raíz y Longitud total de cada una de ellas.

6.4.4 Análisis estadístico

Con base en los datos obtenidos de la germinación de semillas, presencia de patógeno fúngicos y crecimiento de la planta, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con un 95% de confianza o en su defecto el análogo no paramétrico de este, H de Kruskal-Wallis. Estos procedimientos se desarrollaron de forma automatizada utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI versión 16. 1. 03 para Windows.

Si los datos cumplían todos los supuestos paramétricos se utilizó ANOVA, cuyos procedimientos matemáticos son:

Fuentes de variación (FV)	Sumas de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Medias cuadráticas (MC)	Valor de F
Entre grupos	SCe	t-1	MCe	MCe / MCI
Intragrupos o Error	SCi	N-t	MCI	
Total	SCt	N-1		

Siendo: $SCe = \sum \frac{(\sum xi)^2}{N} - C$

$SCi = SCt - SCe$

$SCt = \sum Xi^2 - C$

C: término de corrección que a su vez se define $C = \frac{(\sum xi)^2}{N}$ como:

t-1 (grados de libertad entre): número de grupos /tratamiento – 1

N-t (grados de libertad intra): número de participantes total - menos el número de grupos/tratamientos

N-1 (grados de libertad del total): número de participantes - 1

MCE (media cuadrática entre) = SCe / t -1

MCI (media cuadrática intra) = SCi / N-t

Si por el contrario no cumplían los supuestos, se aplicó el análisis de Kruskal–Wallis, para determinar si había diferencia significativa entre los tratamientos. El estadístico de contraste de H' Kruskal-Wallis se calcula como:

$$H = \frac{12}{N(N-1)} \sum_{j=i}^K \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N-1)$$

Dónde:

H = Estadístico de prueba de Kruskal-Wallis

N = número total de observaciones en todas las muestras

T_i = Suma de los rangos asignados

Donde se encontraron diferencias significativas, se realizó un análisis a posteriori mediante la prueba de Tukey ya que esta prueba permite hacer todas las posibles comparaciones de tratamientos de dos en dos (Wong-González 2010).

$$w_{ij} = q \times \sqrt{\frac{CME}{2} \left[\frac{1}{r_i + r_j} \right]}$$

Prueba de Tukey donde:

w_{ij}= comparador para el par de tratamientos i, j

q= valor de la tabla de Tukey, con grados de libertad de tratamientos y grados de libertad del error.

CME= cuadrado medio del error

r_i, r_j= son las repeticiones de los tratamientos i, j.

7. Resultados

Esta investigación fue realizada entre los meses de octubre de 2016 a enero de 2017, en las instalaciones del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), este trabajo comprende dos fases; una de Laboratorio, en la cual se realizaron los procesos de selección de cepas, control de calidad y preparación de los tratamientos utilizados durante la investigación y la otra fase de invernadero, en la que se realizaron los procesos de conteo de germinación de semillas, análisis de patógenos fúngicos en plántulas a los 10 y 20 días, así como la observación y comparación del desarrollo de las plantas.

7.1 Resultados de la Fase 1: Fase de Laboratorio

7.1.1 Selección de las cepas de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas se encontraban resguardadas en el cepario del Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA. Ambas fueron utilizadas en investigaciones a nivel de laboratorio por Avilés (2014).

Antes de iniciar el trabajo de investigación, ambas cepas se sometieron a las pruebas de control de calidad.

7.1.2 Control de calidad de las dos cepas de *Trichoderma* spp.

De las pruebas de control de calidad (pureza, concentración y viabilidad), para asegurar la confiabilidad de las cepas utilizadas, se obtuvieron los siguientes resultados, los cuales se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Control de calidad para la Cepa 1 y Cepa 2 de *Trichoderma* spp.

Prueba	Cepa 1	Cepa 2
Pureza	Cepa libre de contaminantes	Cepa libre de contaminantes
Concentración (conidios/mL)	5.3 x 10 ¹⁰ conidios/mL	6.0 x 10 ¹⁰ conidios/mL
Viabilidad (%)	80%	95%
Rendimiento neto de conidios*	4.2 x 10 ¹⁰	5.7 x 10 ¹⁰

*Rendimiento neto conidios = (conidios/mL) (% de viabilidad) = conidios viables/gr.

7.1.3 Preparación de tratamientos

Después de análisis patológico, se seleccionaron 4 lb de semilla de frijol de la variedad CENTA-pipil, para la aplicación de los tratamientos. En el Cuadro 3, se detalla la concentración utilizada para cada cepa de *Trichoderma* spp., así como la formulación de cada tratamiento a cada libra de frijol.

Cuadro 3. Concentración y formulación para cada tratamiento

N°	Tratamientos	Concentración	Formulación
1	Cepa 1 <i>Trichoderma</i> sp1.	5.3 x 10 ¹⁰ conidios/mL	0.5 g / 4 mL de agua *
2	Cepa 2 <i>Trichoderma</i> sp2.	6.0 x 10 ¹⁰ conidios/mL	0.5 g / 4 mL de agua *
3	Fungicida (Control positivo)	Aplicado bajo los criterios del fabricante	1 mL / 4 mL de agua *
4	Agua (Testigo) *	5 mL de agua*	5 mL de agua *

* Agua destilada estéril.

7.2 Resultados de la Fase 2: fase de invernadero

7.2.1 Germinación de semillas a los 5 días después de la siembra

En la siguiente tabla, se muestra detalladamente la cantidad de semillas germinadas por cada fila, a los 5 días después de su siembra, Cuadro 4.

Cuadro 4. Germinación de semillas de frijol, a los 5 días después de la siembra.

Fila	Tratamiento				Total
	Cepa 1	Cepa 2	Fungicida	Testigo	
1	3	1	4	0	8
2	0	3	1	1	5
3	0	2	3	0	5
4	2	1	1	0	4
5	0	2	1	0	3
Total	5	9	10	1	25

Cepa 1: *Trichoderma* sp1

Cepa 2: *Trichoderma* sp2

Fungicida: Control positivo

Testigo: Agua

Además de realizar el conteo de germinación, se registró fotográficamente parte de la fase vegetativa de las plantas, Figura 4.



Figura 4. Fase Vegetativa de las Plantas de Frijol. A) Etapa V0: Germinación, B) Etapa V1: Emergencia.

En el siguiente gráfico, se muestran los porcentajes (%) de germinación obtenidos a partir de los totales de semillas germinadas para cada tratamiento, Figura 5.

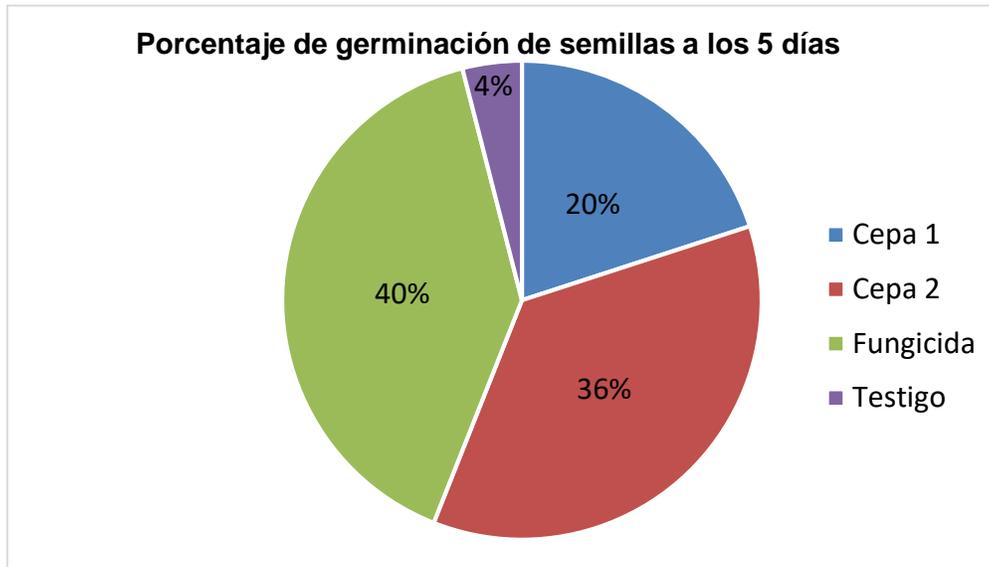


Figura 5. Porcentaje (%) de germinación de semillas tratadas con la Cepa 1 y Cepa 2, Fungicida y el Testigo a los 5 días después de su siembra.

Al analizar estadísticamente los datos, se determinó que los valores de germinación no cumplen con el supuesto de normalidad (Shapiro-Wilk, P -valor=0.00691, $P < 0.05$), por lo cual, se realizó una comparación de medianas con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Dado que el valor- P fue de 0.0463, existe suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis de investigación, la cual se menciona que no todos los tratamientos tendrán el mismo efecto en el control de patógenos fúngicos de la semilla de frijol común. Además, se encontró que existen diferencias significativas entre el tratamiento con la Cepa 2 y el Testigo.

A continuación, se muestran los pares de tratamiento en los cuales se obtuvo diferencias estadísticas, Cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos en los cuales se obtuvieron diferencias estadísticas.

Contraste de pares de tratamientos	Significancia	Diferencia	+/- Límites
Testigo - Fungicida	*	-1.8	1.48394
Testigo - Cepa 2	*	-1.6	1.48394
Testigo - Cepa 1		-0.8	1.48394
Fungicida - Cepa 2		0.2	1.48394
Fungicida - Cepa 1		1.0	1.48394
Cepa 2 - Cepa 1		0.8	1.48394

* indica una diferencia significativa.

7.2.1.1 Germinación a los 9 días después de la siembra

En el siguiente cuadro, se muestran detalladamente la cantidad de semillas de frijol germinadas por cada fila, a los 9 días después de su siembra, Cuadro 6.

Cuadro 6. Germinación de semillas de frijol, a los 9 días después de la siembra.

Fila	Tratamientos				Total
	Cepa 1	Cepa 2	Fungicida	Testigo	
1	4	5	4	4	17
2	4	4	5	4	17
3	4	5	4	3	16
4	5	3	5	5	18
5	3	3	3	3	12
Total	20	20	21	19	80

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

Al finalizar el conteo de germinación a los 9 días, se realizó el monitoreo del crecimiento de las plántulas, para observar la fase en la que se encontraban las plantas, Figura 6.



Figura 6. Fase Vegetativa de las Plantas de Frijol. Etapa V2: Hojas primarias.

Como se observa en el Cuadro 6, el tratamiento con mayor número de semillas germinadas a los 9 días sucedió en el Fungicida, luego en la Cepa 1 y la Cepa 2, estos resultados se observan en la Figura 7.

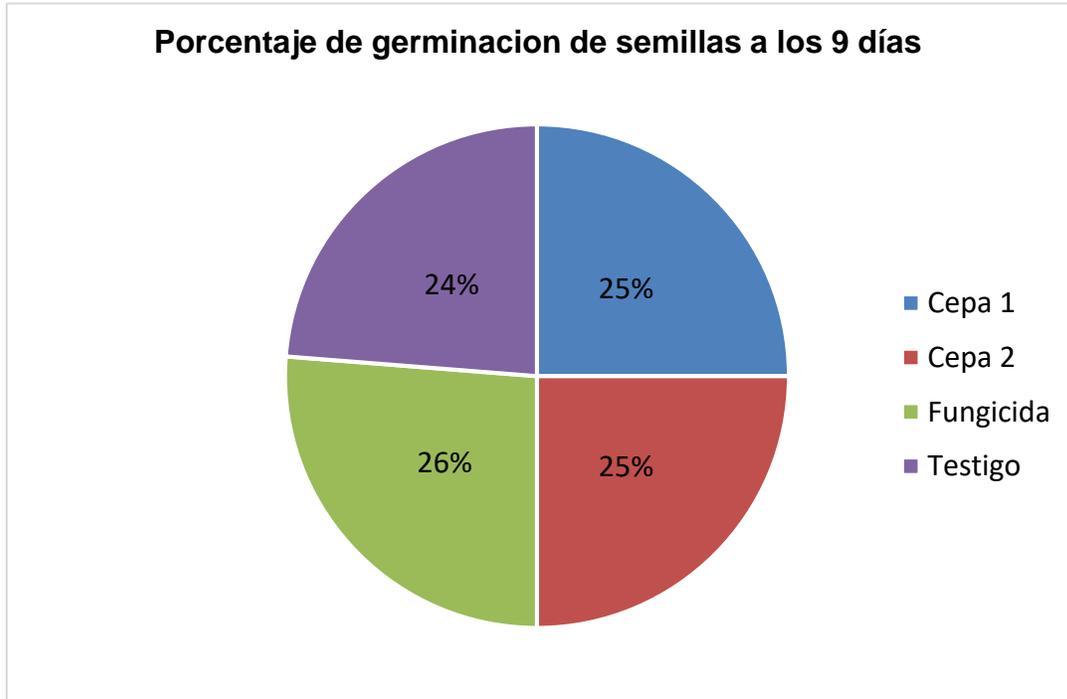


Figura 7. Porcentaje (%) de germinación de semillas tratadas con la Cepa 1 y 2, Fungicida y el Testigo a los 9 días después de su siembra.

Al analizar estadísticamente los datos, se determinó que los valores de germinación a los 9 días no cumplen el supuesto paramétrico de normalidad (Shapiro-Wilk, P-Valor= 0.000883, $P < 0.005$), por lo cual, se realizó una comparación de medianas con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta prueba para germinación por tratamiento a los 9 días, no se encontró diferencias significativas (Valor-P = 0.88876, $P < 0.05$).

7.2.1.2 Total de semillas germinadas del 5° al 9° día después de su siembra

A continuación, se muestra el seguimiento del total de semillas germinadas y emergencia de plántulas de frijol de cada tratamiento; desde el 5° día (donde se tomaron los primeros datos de germinación), hasta el 9° día (en donde ya no se registró ninguna germinación de semillas, por lo que comparten datos similares respecto al 8° día), Cuadro 7.

Cuadro 7. Total de semillas germinadas del 5° al 9° día después de su siembra.

Día	Tratamientos				Total
	Cepa 1	Cepa 2	Fungicida	Testigo	
5	5	9	10	1	25
6	10	14	16	9	49
7	14	20	19	11	64
8	20	20	21	19	80
9	20	20	21	19	80

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

Debido a que las semillas de frijol para cada tratamiento germinaron en días diferentes, también se observó una diferencia en las etapas que presentaban las plántulas en crecimiento durante este tiempo, Figura 8.



Figura 8. Diferentes etapas de crecimiento en las plántulas de frijol en una misma maceta.

El muestreo culminó el día 9 en donde no se observó diferencias con la cantidad de semillas germinadas del día 8, lo cual se representa en la Figura 9.

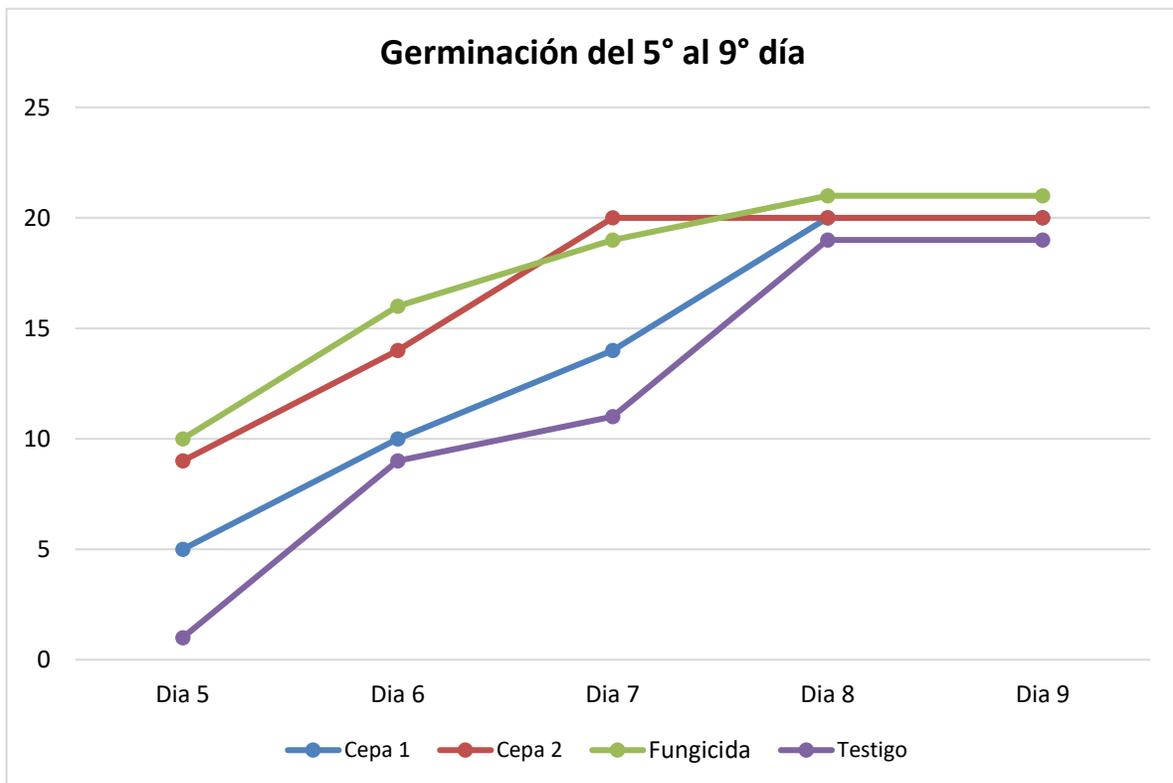


Figura 9. Germinación de semillas del 5° al 9° día.

7.2.2 Análisis de presencia de patógenos fúngicos

Después de la extracción de plántulas por cada tratamiento a los 10 y 20 días de crecimiento y luego de realizar aislamientos de las mismas en medio de cultivo PDA, para el análisis de presencia de patógenos fúngicos, se obtuvieron los resultados que se detallan a continuación:

7.2.2.1 Presencia de patógenos fúngicos a los 10 días

Respecto al control de patógenos, de los primeros aislamientos en PDA, a partir de cortes transversales de las plántulas de frijol, con 10 días de crecimiento (después del primer muestreo de germinación), se encontraron con diferente frecuencia a los géneros que se detallan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.

Género	Tratamiento				Total
	Cepa 1	Cepa 2	Fungicida	Testigo	
<i>Aspergillus</i> sp.	2	5	0	0	7
<i>Fusarium</i> sp.	0	4	5	10	19
<i>Penicillium</i> sp.	1	0	1	0	2
<i>Sclerotium bataticola</i>	5	1	0	0	6
Total	8	10	6	10	34

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
Cepa 2: *Trichoderma* sp2
Fungicida: Control positivo
Testigo: Agua

Durante los aislamientos realizados de plántulas con 10 días de crecimiento, se determinó la presencia de los patógenos fúngicos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Sclerotium bataticola*; los dos primeros fueron los más frecuentes en todos los tratamientos, Figura 10.

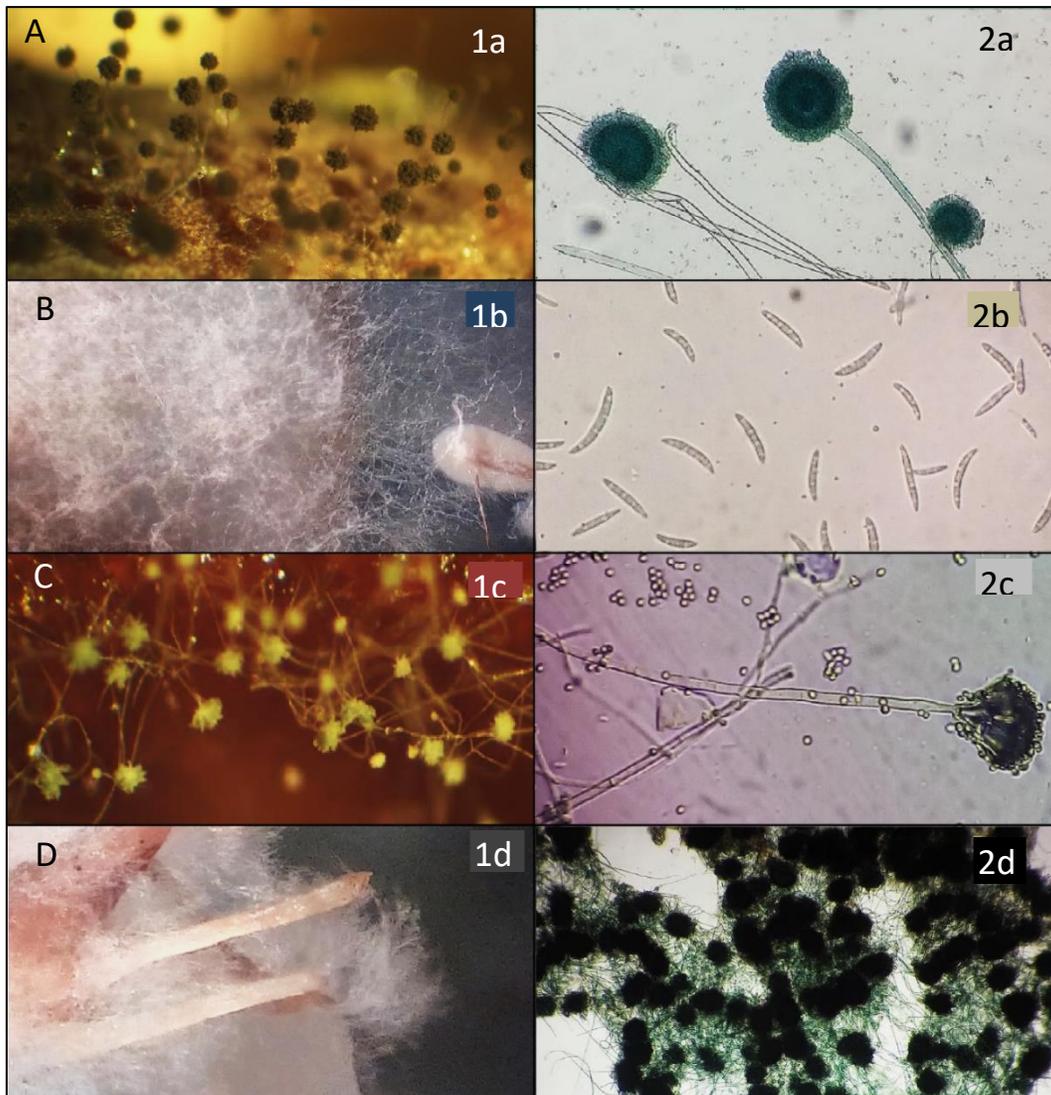


Figura 10. Presencia e identificación de los hongos; A) *Aspergillus* sp., 1a. Conidióforos vistos al estereoscopio, 2a. Conidióforos y esporas vistas al microscopio (10X); B) *Fusarium* sp., 1b. Micelio en corte trasversal de raíz, 2b. Macroconidias vistas al microscopio (40X); C) *Penicillium* sp., 1c. Conidióforos y micelio vistos con el estereoscopio, 2c. Conidióforos y conidios vistas con microscopio (40X); D) *Sclerotium bataticola*, 1d. Micelio en corte de raíz visto con el estereoscopio, 2d. Esclerocios observados con el microscopio (40X).

En el siguiente gráfico se puede observar de forma más clara los resultados obtenidos, de la presencia de patógenos fúngicos en las plántulas, Figura 11.

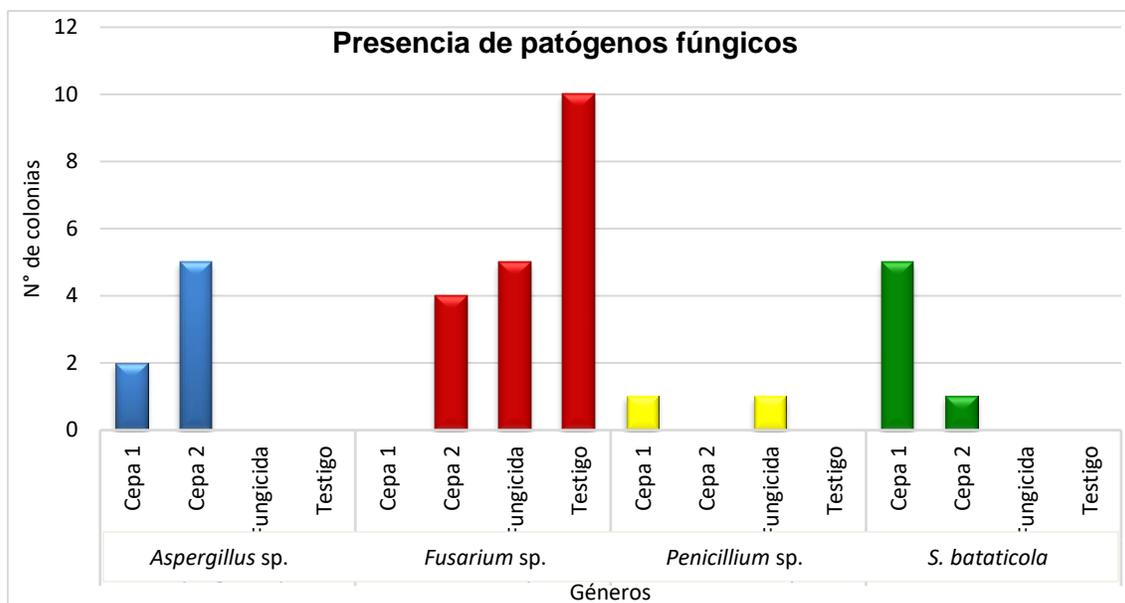


Figura 11. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.

7.2.2.2 Presencia de patógenos fúngicos a los 20 días

De los segundos aislamientos en PDA, a partir de cortes transversales de las plántulas de frijol, con 20 días de crecimiento (después del primer muestreo de germinación), se encontraron con diferente frecuencia a los géneros que se detallan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.

Géneros	Tratamientos				Total
	Cepa 1	Cepa 2	Fungicida	Testigo	
<i>Aspergillus sp.</i>	1	1	0	1	3
<i>Fusarium sp.</i>	4	5	0	5	14
<i>Sclerotium bataticola</i>	5	8	11	12	36
Total	10	14	11	18	53

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

Durante los aislamientos realizados de plántulas con 20 días de crecimiento, se determinó la presencia de los patógenos fúngicos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., y *Sclerotium bataticola*; este último es el más frecuentes en todos los tratamientos, Figura 12.

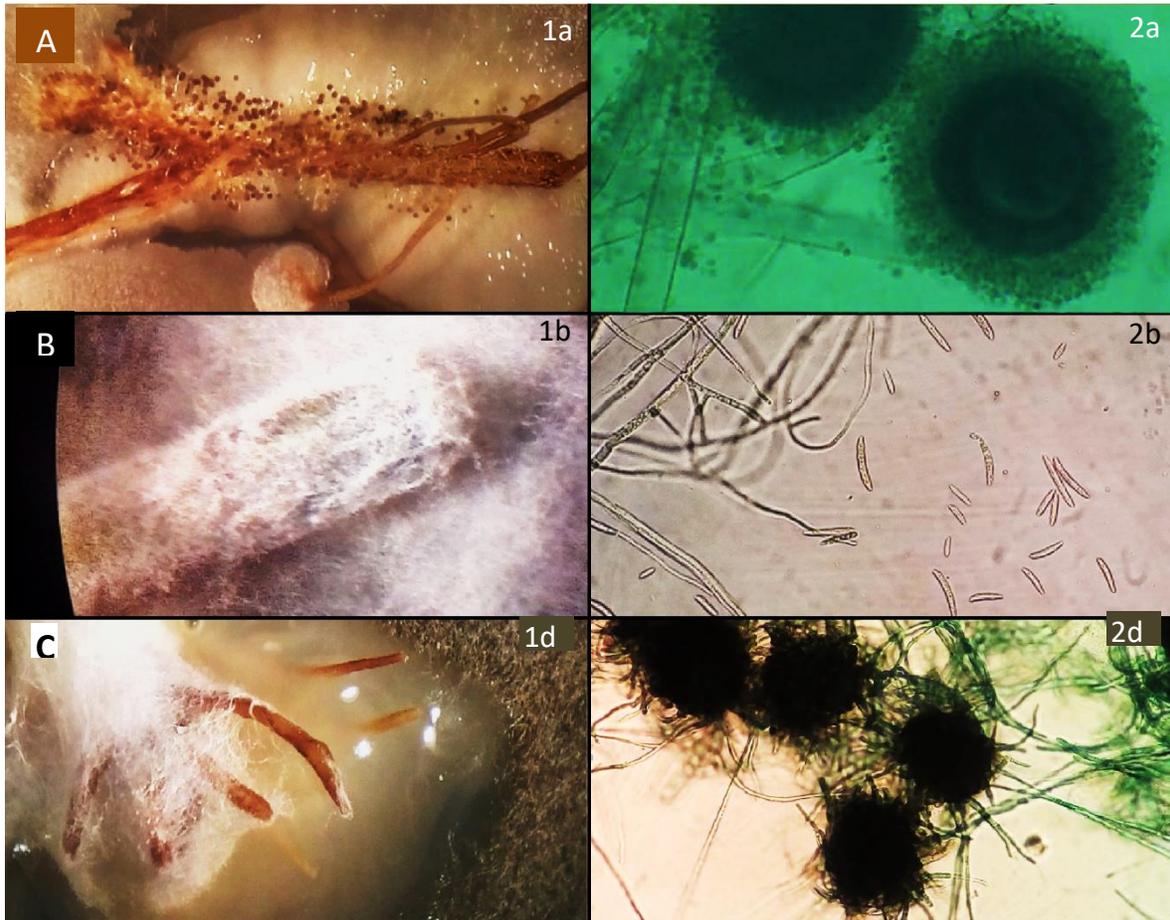


Figura 12. Presencia e identificación de los hongos; A) *Aspergillus* sp., 1a. Conidióforos en corte de raíz, 2a. Conidióforos y esporas vistas al microscopio (40X); B) *Fusarium* sp., 1b. Micelio en corte transversal de tallo, 2b. Micelio y macroconidias vistas al microscopio (40X); C) *Sclerotium bataticola*, 1c. Micelio en corte de raíz visto con el estereoscopio, 2d. esclerocios observados con el microscopio (40X).

En el siguiente gráfico se puede observar de forma más clara los resultados obtenidos, de la presencia de patógenos fúngicos en las plántulas, Figura 13.

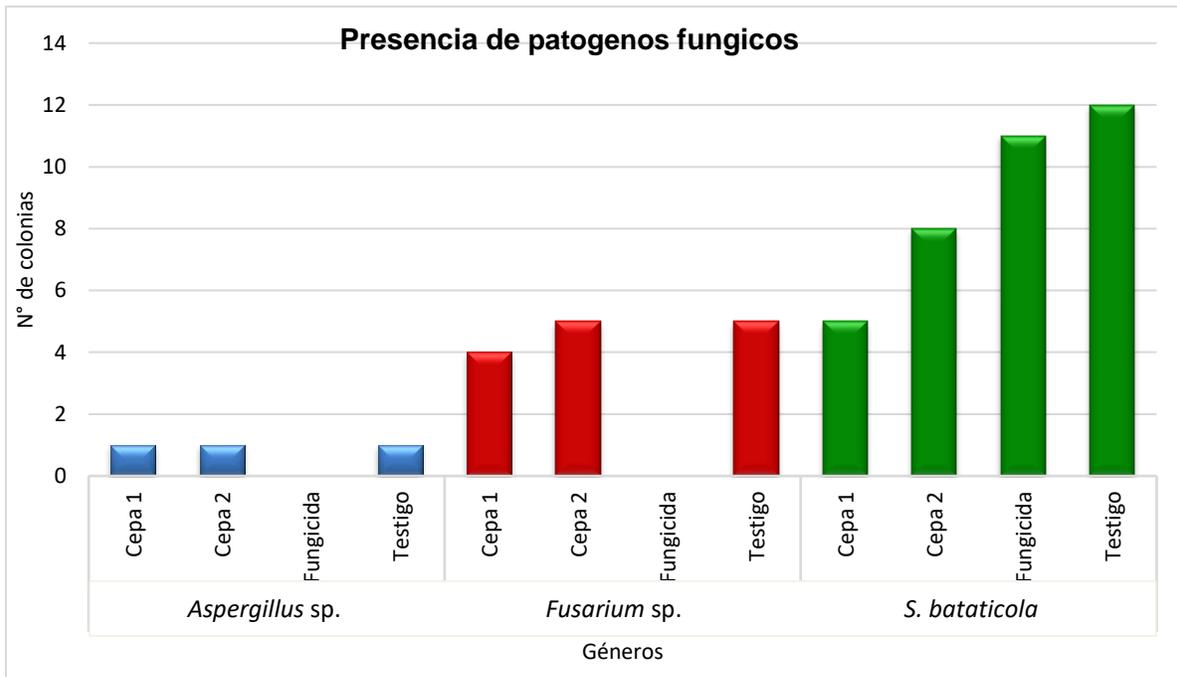


Figura 13. Número de colonias fúngicas presentes en cortes de plántulas en medio de cultivo PDA, por cada tratamiento.

7.2.3 Comparación del crecimiento de las plantas de frijol

Al final del ciclo de cultivo (65 días), se tomaron las plantas restantes por cada tratamiento, para realizar medidas de Longitud de tallo, Longitud de raíz y Longitud total de la planta, las cuales se detallan a continuación.

7.2.3.1 Longitud de tallo al final del ciclo del cultivo.

Durante la medición de las 10 plantas por tratamiento, se registró la Longitud del tallo, esta actividad se realizó antes de la extracción completa de las plantas, Figura 14.



Figura 14. Plantas de frijol durante la medición de tallo, antes de la extracción completa.

Al medir los tallos de 10 plantas de frijol por cada tratamiento, se obtuvieron los siguientes resultados, Cuadro 10.

Cuadro 10. Longitud total en centímetros de los tallos de plantas en cada tratamiento.

Planta N°	Tratamientos			
	Cepa 1 (cm)	Cepa 2 (cm)	Fungicida (cm)	Testigo (cm)
1	82	104.7	117.5	55.7
2	97.5	77.3	80.2	71.6
3	111.2	57.1	128	102.3
4	83.5	63.2	101.8	93
5	44	76.3	117.6	109.6
6	56	107.4	146	132
7	59	73	92	63.4
8	99	58	58.1	86.6
9	107	77	73.3	121.3
10	115.1	72	79	116.6

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

Respecto al análisis estadístico, con la prueba de normalidad se evidenció que los datos cumplen con la distribución esperada (Shapiro-Wilk Valor-P= 0.342345, $P < 0.05$). Por ello, se realizó un contraste de medias con ANOVA de una vía, con el cual no se encontró diferencia significativa entre las medias de las cuatro variables con un nivel del 95.0% de confianza (ANOVA Valor-P= 0.170, $P < 0.05$). Las medias obtenidas para cada tratamiento se detallan en el Cuadro 11 y de igual forma estos valores se representan en la Figura 15.

Cuadro 11. Promedio de Longitud de tallo al final del ciclo de cultivo.

Tratamiento	N	Media \pm D.E	Mínimo	Máximo
Cepa 1	10	85.430 \pm 25.0247	44.0	115.1
Cepa 2	10	76.600 \pm 17.2526	57.1	107.4
Fungicida	10	99.350 \pm 27.6497	58.1	146.0
Testigo	10	95.210 \pm 25.7303	55.7	132.0
Total	40	89.148 \pm 24.9487	44.0	146.0

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

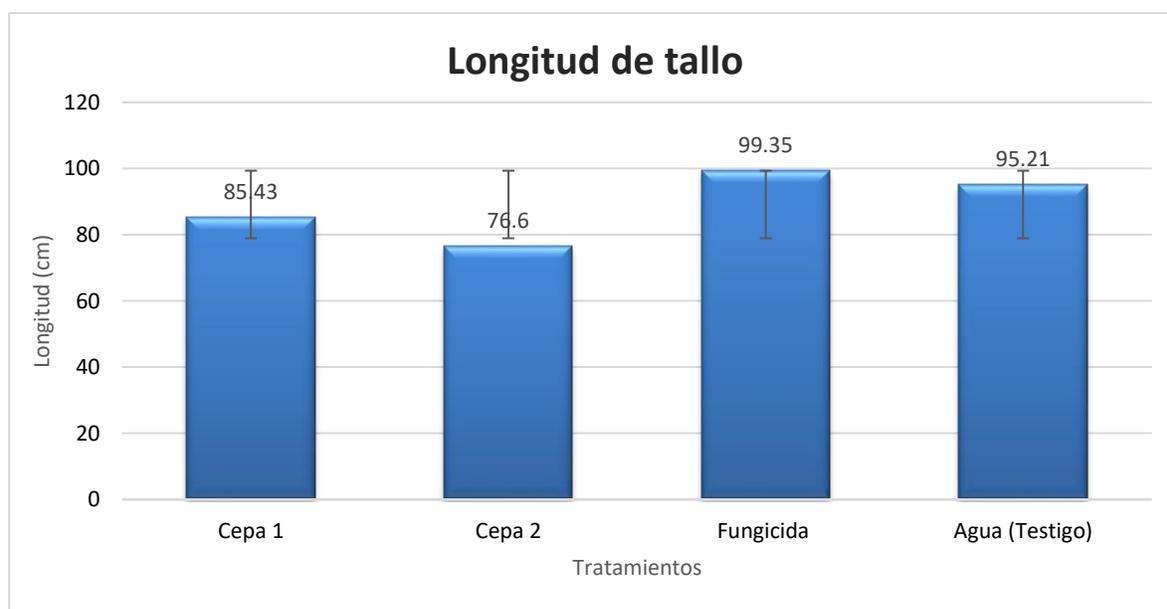


Figura 15. Promedio de la Longitud de tallo de las plantas al final del ciclo de cultivo.

7.2.3.2 Longitud de la raíz al final del ciclo del cultivo

De igual forma, durante la medición de 10 plantas por cada tratamiento, además del sistema radicular normal, se observaron raíces con características morfológicas diferentes, Figura 16.

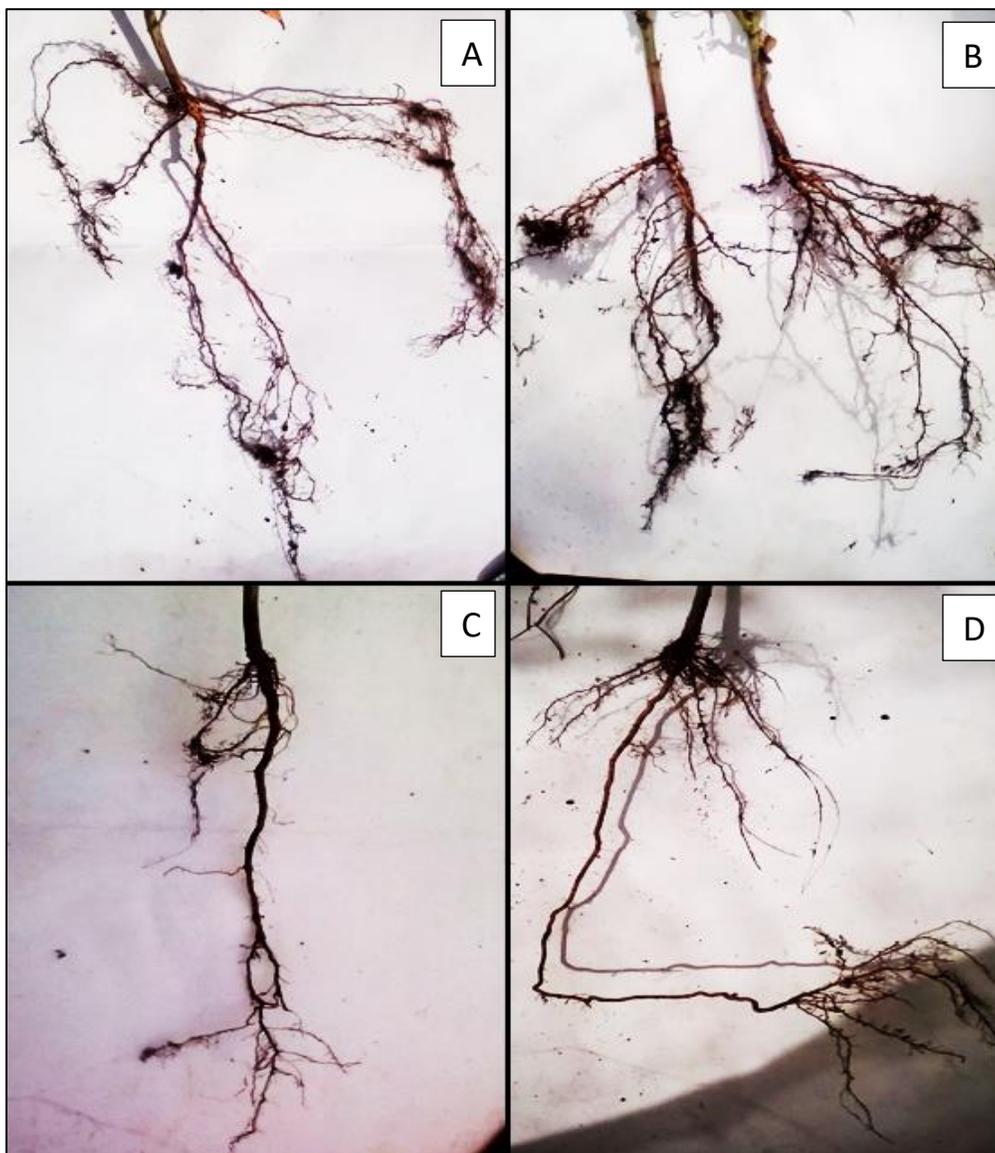


Figura 16. Raíces tipo obtenidas por cada tratamiento; **A)** Cepa 1, **B)** Cepa 2, **C)** Fungicida y **D)** Testigo.

Respecto a los resultados de medición de raíz, se registraron los siguientes datos agrupados por cada tratamiento en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Longitud total en centímetros de las raíces de plantas por cada tratamiento.

Planta N°	Tratamiento			
	Cepa 1 (cm)	Cepa 2 (cm)	Fungicida (cm)	Testigo (cm)
1	51	70.5	45.4	35
2	64	44.7	31	35.2
3	21	21.5	33.7	33
4	21	21.6	23.4	32.7
5	13	51	36	39
6	33	39.5	17.7	31.3
7	18.3	18	30.4	46.8
8	47.5	17.7	21.9	37.4
9	33	32.6	22	16.8
10	27.7	16.4	32.6	11.2

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

Posteriormente, en el análisis estadístico de los resultados, se observó que el valor-P de las pruebas realizadas era menor a 0.05, por lo que se rechazó que la Longitud de la raíz (cm) proviene de una distribución normal con 95% de confianza (Shapiro-Wilk Valor-P= 0.0332, $P < 0.05$).

El análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis demostró que el valor-P es mayor que 0.05, por cual, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza (Valor-P = 0.956154). Las medias obtenidas para cada tratamiento se detallan en el Cuadro 13 y de igual forma estos valores se representan en la Figura 17.

Cuadro 13. Promedio de la Longitud de raíz de las plantas al final del ciclo de cultivo.

Tratamiento	N	Media \pm D. E	Mínimo	Máximo
Cepa 1	10	32.950 \pm 16.4229	13.0	64.0
Cepa 2	10	33.350 \pm 17.9666	16.4	70.5
Fungicida	10	29.41 \pm 8.2714	17.7	45.4
Testigo	10	31.840 \pm 10.4448	11.2	46.8
Total	40	31.888 \pm 13.2764	11.2	70.5

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

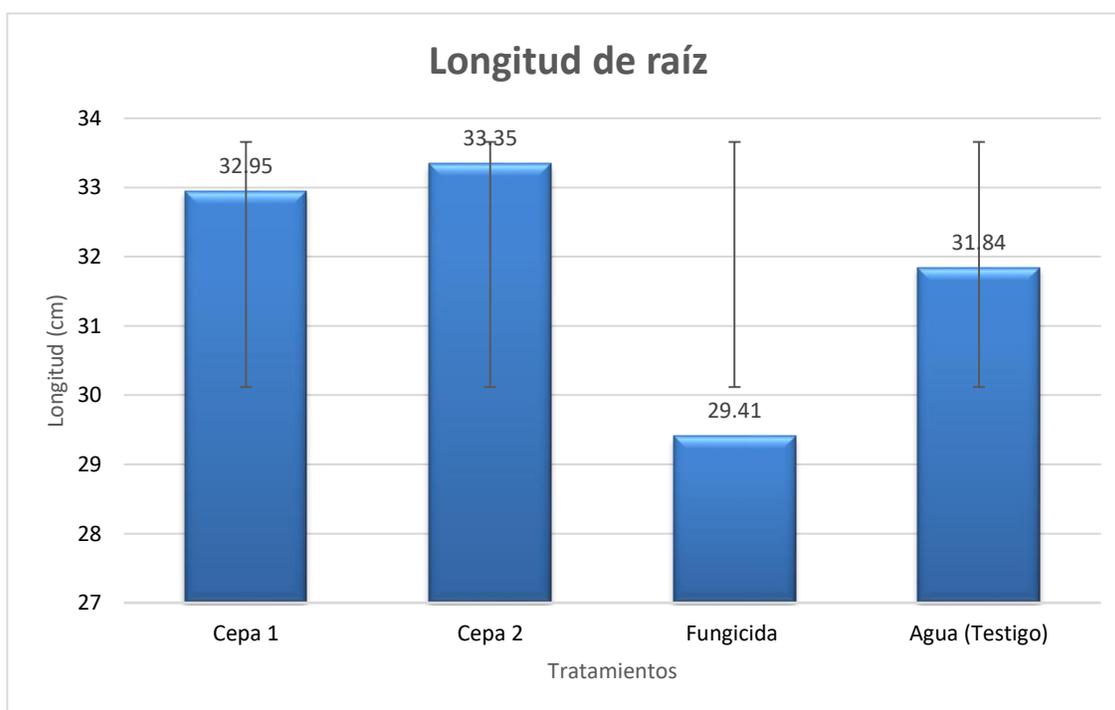


Figura 17. Promedio de la Longitud de raíz de las plantas al final del ciclo de cultivo.

7.2.3.3 Longitud total de las plantas al final del ciclo del cultivo

Durante la medición de 10 plantas por cada tratamiento para obtener la Longitud total de las plantas al final del ciclo de cultivo, se registraron los siguientes datos agrupados por cada tratamiento en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Longitud total en centímetros de las plantas en cada tratamiento.

Planta N°	Tratamiento			
	Cepa (cm)	Cepa (cm)	Fungicida (cm)	Testigo (cm)
1	133.0	175.2	162.9	90.7
2	161.5	122.0	111.2	106.8
3	132.2	78.6	161.7	135.3
4	104.5	84.8	125.2	125.7
5	57.0	127.3	153.6	148.6
6	89.0	146.9	163.7	163.3
7	77.3	91.0	122.4	110.2
8	146.5	75.7	80.0	124.0
9	140.0	109.6	95.3	138.1
10	142.8	88.4	111.6	127.8

Cepa 1: *Trichoderma* sp1

Cepa 2: *Trichoderma* sp2

Fungicida: Control positivo

Testigo: Agua

Después de analizar estadísticamente las longitudes obtenidas, se encontró que los datos de Longitud total de las plantas provienen de una distribución normal (Shapiro-Wilk Valor-P= 0.341853, $P < 0.05$), por lo tanto, se analizó con ANOVA de una vía, sin embargo, con esta prueba se no encontró diferencias significativas en ningún tratamiento (ANOVA Valor-P= 0.4849, $P < 0.05$). La media obtenida para cada tratamiento se detalla en el Cuadro 15 y de igual forma estos valores se representan en la Figura 18.

Cuadro 15. Promedio de la Longitud total de las plantas al final del ciclo de cultivo.

Tratamientos	N	Media \pm D. E	Mínimo	Máximo
Cepa 1	10	118.3800 \pm 34.36645	57	161.5
Cepa 2	10	109.9500 \pm 32.79757	75.7	175.2
Fungicida	10	128.7600 \pm 30.26084	80	163.7
Testigo	10	127.0500 \pm 21.07032	90.7	163.3
Total	40	121.0350 \pm 29.87388	57	175.2

Cepa 1: *Trichoderma* sp1
 Cepa 2: *Trichoderma* sp2
 Fungicida: Control positivo
 Testigo: Agua

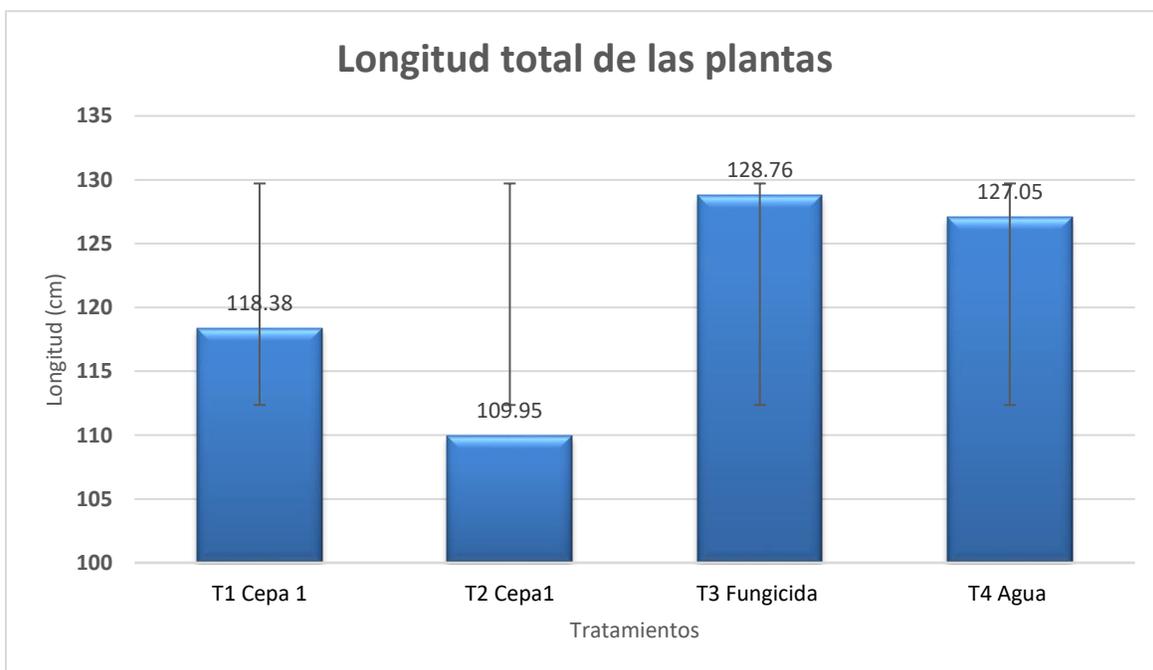


Figura 18. Promedio de la Longitud total de las plantas al final del ciclo de cultivo.

7.3 Temperatura registradas durante el ciclo de cultivo

Durante la investigación también se tomaron medidas de Temperatura (°C), 3 veces por semana durante dos meses, a partir del 17 de octubre hasta 16 de diciembre de 2016, aproximadamente entre las 7:00 y 9:00 am. Posteriormente se obtuvo el promedio de cada mes, Cuadro 16.

Cuadro 16. Promedios de temperatura obtenidas durante dos meses.

Temperatura en °C					
Semana	Dia 1	Dia2	Dia 3	Promedios	
1	28	27.2	26	1er Mes	25.7°C
2	23.4	26.3	25		
3	26.7	24.5	25.5		
4	26.3	24.8	25.1		
5	25	26.3	24.2	2do Mes	24°C
6	23.2	24	23.7		
7	23.3	23.6	23.6		
8	24	23.4	23.7		

De acuerdo con el cuadro anterior, se tiene para el primer mes de ensayo, una temperatura promedio de 25.7°C y para el segundo mes, una temperatura promedio de 24°C.

Además, se registró la temperatura máxima obtenida para las horas de mayor intensidad (a medio día), la cual fue de 36.5 °C.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

8.1 Germinación de semillas de frijol

Según el Instituto Nicaragüense de Tecnología Agraria (INTA 2013), es necesario elaborar un cronograma para la toma de datos en pruebas de germinación de semillas de granos básicos, en este sentido explica que, para el frijol, la toma de datos debe iniciarse a los cinco días de siembra y finalizar a los nueve días. Después de la última toma de datos de germinación (9 días después de siembra), se obtuvieron porcentajes de: Fungicida 84%, Cepa 1 80%, Cepa 2 80% y el Testigo con 76%, aunque no se obtuvo diferencias significativas estadísticamente.

Según la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense (NTON), el porcentaje mínimo de germinación en campo aceptado es de 80 % (INTA 2013). Si se toma como referencia esta norma, las Cepa 1 y Cepa 2 estarían dentro de los valores mínimos requeridos para la germinación de semillas de frijol, de forma similar se encuentra el Fungicida, aunque con un valor apenas más alto del 84%. Cabe señalar que todos los tratamientos anteriores superan al Testigo. Es importante recordar que los porcentajes de germinación en este caso se obtuvieron de un total de 25 semillas para cada tratamiento, en invernadero.

También es importante observar el comportamiento de los datos de germinación de semillas obtenidos a los cinco días, en los cuales se encontró diferencias significativas por parte de la Cepa 2 y el Fungicida contra el Testigo, Cuadro 4 y 5.

En la Figura 9, se observa la Germinación de semillas del 5° al 9° día, se puede inferir que existe una aceleración en la germinación para el Fungicida y la Cepa 2 entre el 5° y el 8° día, aunque en este último día, la Cepa 1 alcanza la misma cantidad de semillas germinadas que la Cepa 2, no así el Testigo, el cual obtiene valores de germinación menores a los tratamientos anteriores, desde el primero hasta el último día de toma de datos.

Esto también fue observado por Cupull et al. (2003) en viveros de café, donde se determinó que el uso de *T. viride* producía una aceleración en la germinación de

estos granos, en este caso los datos se obtuvieron partir de los 50 y 60 días. Así mismo, Cubillos-Hinojosa et al. (2009), observaron un aumento en la germinación y aceleración de este proceso al aplicar diferentes dosis de *T. harzianum* a semillas de maracuyá a los 15 días después de la siembra. De igual forma, Arias y Duarte (2006) observaron que al utilizar biopreparados de *T. koningii* y *T. harzianum* en cualquier dosis, contra *Sclerotium rolfsii* en semillas de chile dulce, también producía un aumento en la germinación de las mismas, en este caso los datos de germinación también se obtuvieron a los 15 días después de siembra. Además, Ezziyyani et al. (2004) menciona que en las plántulas de pimiento crecidas a partir de semillas tratadas con *T. harzianum*, el porcentaje de germinación supero a las no tratadas.

Como se menciona anteriormente, a pesar de estos resultados, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los datos de germinación obtenidos en el 9° día; pero queda claro que el uso de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. favorecen la aceleración de germinación de semillas de frijol, y que probablemente se deba al antagonismo de este, contra patógenos fúngicos que disminuyen la capacidad germinativa de las semillas y a su capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas, Altomare et al. (1999); citado por Cubillos-Hinojosa et al. (2009).

8.2 Presencia de patógenos fúngicos

8.2.1 Presencia de patógenos fúngicos a los 10 días de crecimiento.

Al evaluar la presencia de patógenos fúngicos, en los aislamientos de cortes transversales de las plántulas de frijol con 10 días de crecimiento, se observó sobre todo la presencia de los géneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. y *Sclerotium bataticola* después de la incubación por siete días en medio de cultivo PDA.

En general, se encontró que a nivel de invernadero la cepa más efectiva contra *Fusarium* sp. fue la Cepa 1. Es de vital importancia mencionar que, es difícil comparar el control sobre los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., y *S. bataticola*, por su poca o nula presencia en todos los tratamientos, sobre todo para el Testigo (Cuadro 8 y Figura 11). A diferencia de lo observado durante el experimento *in vitro* realizado por Avilés (2014), utilizando las mismas cepas de *Trichoderma* spp., en donde encontró que la Cepa 2 controló con mayor efectividad y rapidez a los patógenos; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Fusarium*, en comparación a la Cepa 1 contra estos mismos géneros de hongos. También, señala que el género *Fusarium* sp. fue el más difícil de controlar en condiciones de laboratorio. De igual forma, Perdomo et al. (2007), obtuvo buenos resultados en el uso de *T. harzianum* para el control de *Fusarium* sp. y otros hongos causantes de la enfermedad “sancocho”. De igual forma, Cubillos et al. (2011), obtuvo buenos resultados utilizando cepas nativas y comerciales de *T. harzianum* para el control de *Fusarium solani* en maracuyá a nivel de invernadero, señalando además que su uso es más efectivo a nivel preventivo que curativo.

Respecto al género *Aspergillus* sp., se sabe que afecta con mayor frecuencia a las semillas en condiciones de almacenamiento disminuyendo su capacidad germinativa (Agrios 1995; INTA 2013), siendo esta una de las probables causas del por qué su poca presencia a nivel de invernadero.

Al igual que el género anterior, no se encontraron a los patógenos *Penicillium* sp. y *S. bataticola* en los tratamientos utilizados como Testigos. Por lo cual, las razones por las que no se encontraron estos géneros en todos los tratamientos puede obedecer a causas de establecimiento de los mismos en las plántulas, o a que fueron eliminados durante el proceso de esterilización de los cortes. Respecto a *Penicillium* sp., es considerado también como uno de los hongos más destructivo para la semilla de frijol en almacenamiento (INTA 2013), pese a ello, no tuvo mayor relevancia en los resultados de los aislamientos. Por otro lado, *S. bataticola* tuvo una incidencia considerable para los aislamientos de la Cepa 1, a pesar de su presencia, no se observó pudrición de raíz o tallo en ninguna de las plántulas

extraídas como explica Agrios (1995), sobre las enfermedades causadas por este género.

Por último, para *Rhizopus* sp., no se presentó ninguna incidencia en ninguno de los tratamientos. Lo cual es importante, ya que para los técnicos del Laboratorio de Parasitología Vegetal de CENTA, es uno de los géneros que causan mayor problema provocando la pudrición de raíz durante la germinación de las semillas a nivel de laboratorio, lo cual no se verificó su presencia durante la realización de aislamientos procedentes de plántulas en invernadero.

8.2.2 Presencia de patógenos fúngicos a los 20 días de crecimiento.

Al evaluar la presencia de patógenos fúngicos, en los aislamientos de cortes transversales de las plántulas de frijol con 20 días de crecimiento, solo se observó la presencia de los hongos; *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *S. bataticola*., en este caso puede observarse que hay mayor establecimiento de estos hongos patógenos en las plántulas de frijol.

De mayor importancia en los tratamientos, *S. bataticola* fue claramente el patógeno con mayor presencia para cada uno. De este modo, para la Cepa 1 se obtuvieron 4 colonias, Cepa 2 con 8 colonias, Fungicida con un total de 11 y el Testigo con 12 colonias de esta especie (Cuadro 9 y Figura 13). Comparando el total de colonias de cada tratamiento, se puede deducir que los tratamientos con la Cepa 1 y Cepa 2 de *Trichoderma* spp. fueron los más efectivos al combatir a esta especie, comparada con el Fungicida y el Testigo, aunque no suprimieron por completo la presencia de este patógeno. Esto también fue observado por Avilés (2014), ya que, a nivel de laboratorio, ambas cepas de *Trichoderma* spp. lograron ejercer un control de los hongos *S. bataticola* y *Penicillium* sp., aunque este último hongo no se registró en ningún tratamiento de los cortes de plántulas con 20 días de crecimiento. Por su parte, pero con otra especie de *Sclerotium*, Hoyos-Carvajal et al. (2008) en condiciones de invernadero, encontró que aislamientos de *Trichoderma* sp. fueron altamente eficaces contra *S. rolfsii* en plantas de frijol en semillero, logrando una

reducción mayor al 90% de la enfermedad. De igual manera, Michel-Aceves et al. (2013), concluyeron que se logró la protección del cultivo de cacahuate del ataque de *S. rolsfii* al evaluar la cepa nativa Tcn-11 identificada como *T. harzianum* Rifai, a nivel de invernadero.

Respecto al género *Aspergillus* sp., Figura 13. Se puede observar la poca presencia de este patógeno para los tratamientos, con la Cepa 1, Cepa 2 y Testigo, por otro lado, en el Fungicida no hubo presencia de este género. Probablemente su establecimiento en las plántulas extraídas fue menor y de menor importancia. Aunque a nivel de laboratorio Avilés (2014), observó que la Cepa 2 controlaba de forma efectividad y rápida tanto al género *Aspergillus* sp., como a los otros géneros en estudio.

Al evaluar el género *Fusarium* sp. (Figura 13). Se puede observar su presencia en los tratamientos con la Cepa 1, Cepa 2 y para el Testigo, no así el Fungicida en el cual no hubo presencia de este género. Ya que la cantidad de colonias de *Fusarium* sp. encontradas tanto en los tratamientos con la Cepa 1 y Cepa 2 son similares al Testigo, podría decirse que el control ejercido por *Trichoderma* spp. sobre este hongo, se reduce a los 20 días.

Por último, y al igual que en las plántulas extraídas con 10 días de crecimiento, no se registró la presencia del género *Rhizopus* sp., ni el género *Penicillium* sp.

Es importante enfatizar que, en los cortes aislados de plántulas extraídas a los 10 y 20 días, se determinó la presencia del género *Trichoderma* spp. para ambas Cepas en tratamiento, con lo cual se verifica el establecimiento de este hongo en el cultivo de frijol durante esos días. Lo cual es comparable con el trabajo de Guigón-López y González-González (2004), en el cual, veinte días después de terminado el estudio, se logró reaislar a ambos antagonistas de muestras de suelo y raíz.

8.3 Comparación del crecimiento de las plantas de frijol.

Al comparar los resultados de las plantas restantes por cada tratamiento respecto a la Longitud total de las plantas, Longitud de tallo y Longitud de raíz al final del ciclo de cultivo, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas, para ninguna de estas variables medidas, pese a ello, se observaron representantes importantes para algunos tratamientos durante las mediciones.

Al observar los valores máximos para cada tratamiento en el Cuadro 15, respecto a la Longitud total de las plantas. La Cepa 2 posee el representante con valor más alto 175.2 cm, superando al representante más alto del Fungicida (163.7 cm). Luego, se encuentra el del Testigo y la Cepa 1. Es importante señalar que, aunque durante esta investigación la Cepa 2 presenta el representante de mayor longitud, también posee los promedios más bajo respecto a los otros tratamientos. De igual forma López-Herrera et al. (1999), no encontró diferencias significativas en el incremento de altura de las plantas de aguacate. Por su parte, Guigón-López y González-González (2004) observaron que todos los tratamientos que incluyeron las cepas nativas de *Trichoderma* spp. superaron en crecimiento al testigo; sin embargo, no todos fueron estadísticamente significativos. Por su parte, Ezziyyani et al. (2004) explica que el porcentaje de la longitud de las plántulas tratadas con *T. harzianum* fue superior al de las no tratadas. Lo cual no está generalizado en los resultados obtenidos durante esta investigación como se explica anteriormente. Respecto al tallo, la Cepa 1 posee promedios superiores a los obtenidos por la Cepa 2, pero no superan al Testigo (Cuadro 11 y Figura 15).

Por otro lado, en el Cuadro 13 y Figura 17 se muestran los resultados de la Longitud de raíz, donde se observa que los promedios más altos son para la Cepa 2 y de igual forma el representante más alto posee 70.5 cm, superando al valor más alto obtenido para la Cepa 1 (64 cm), el Testigo (46.8 cm) y el del Fungicida (45.4 cm). Respecto al desarrollo de raíz, López-Herrera et al. (1999) también observó un desarrollo significativo de raíces de plantas de aguacate en presencia de *Trichoderma*. También, a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente

significativas, en el estudio de Guigón-López y González-González (2004), también se observó un aumento en las raíces de plantas de Chile.

Cabe mencionar que además de la longitud, el aspecto de las raíces al final del ciclo del cultivo mostró diferencias para las plantas de cada tratamiento, observándose con mejor sistema radicular las raíces de las plantas tratadas con las Cepas de *Trichoderma* spp.; lo cual probablemente se deba a la protección generada contra hongos que causan pudrición de raíz como *Fusarium* sp. y *Sclerotium bataticola*, lo cual se muestra en la Figura 16.

8.4 Temperatura registradas durante el ciclo de cultivo

Según Martínez et al. (2013), la acción de *Trichoderma* como micoparásito natural se demostró por Weindling en el año 1932, aunque su utilización como control biológico fue hasta 1970, sobre todo en hortalizas. Se sabe que existen diversas investigaciones, pero la información es insuficiente y dispersa respecto a biología de este hongo, por lo cual, es importante conocer los rangos de temperatura, humedad o mecanismos de acción.

Durante la investigación, en el invernadero se registró temperaturas 23.3°C y 28°C entre las 7:00 y 9:00 de la mañana lo cual se muestra en el Cuadro 16; al medio día la máxima temperatura registrada fue de 36.5 °C. Respecto a los rangos de temperatura, Martínez et al. (2013), explica que las diferentes especies del género *Trichoderma* poseen diferentes rangos de temperatura para su crecimiento, por ejemplo, se sabe de cepas aisladas en Alaska, donde crecen naturalmente a temperaturas de 4 °C y que estas logran tolerar y crecer a 33° C. Además, menciona que las especies; *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* Hammill toleran de 40 a 41°C, las especies *T. koningii* y *T. hamatum*: 35 °C y *T. viride* y *T. polysporum*: 31°C, mientras *T. harzianum* hasta 38 °C. Explica también, que es importante no confundir los términos, si bien pueden crecer con estos niveles de temperatura, no significa que sea la temperatura óptima para su crecimiento, por ejemplo según Knudsen y Bin (1990); citado por Martínez et al. (2013), menciona que la

temperatura óptima para *T. harzianum* es de 20 °C, aunque otros investigadores como Argumedo-Delira et al. (2009), mencionan que esta temperatura puede variar de 25 a 30°C.

Martínez et al. (2013), menciona que Las especies de *Trichoderma* no son exigentes con relación al pH del sustrato y que pueden crecer en suelos con pH desde 5,5 a 8,5, aunque los valores óptimos se encuentran entre 5,5-6,5; es decir en un ambiente ligeramente ácido, en contraste, en esta investigación el pH encontrado fue de 5.9, un pH óptimo para su crecimiento.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados y discusión de los datos obtenidos durante esta investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- A los cinco días, el porcentaje de germinación de las semillas de frijol tratadas con *Trichoderma* spp., fue mayor que en las semillas utilizadas como testigo, sobre todo las tratadas con la Cepa 2. Aunque a los nueve días, el porcentaje fue igual para ambas cepas (80%). Indicando, que el porcentaje de germinación se vio afectado positivamente con la aplicación del hongo previo a la siembra.
- En las pruebas de invernadero se evidenció la virulencia de *Trichoderma* sp. Cepa 1, la cual, demostró efectividad para controlar al hongo *Fusarium* sp., en plántulas que tenían 10 días de crecimiento y *S. bataticola* en plántulas con 20 días de crecimiento. Es de importancia mencionar que, a los 20 días el control sobre *Fusarium* sp. fue deficiente, pero comparada con la Cepa 2, fue la que ejerció mejor control.
- En esta investigación, no se observó la presencia del hongo patógeno *Rhizopus* sp. a nivel de invernadero, por tanto, no se consideró como un patógeno importante.
- De las plantas que crecieron a partir de las semillas tratadas con ambas cepas de *Trichoderma* spp., se obtuvieron raíces más largas y con mayor presencia de raíces secundarias, contrario a las tratadas con el Fungicida comercial y el Testigo. Esto probablemente se deba a la protección del sistema radicular por las cepas de *Trichoderma* spp., contra las pudriciones de raíces causadas por patógenos fúngicos como *Fusarium* sp. y *S. bataticola* ya que fueron los hongos de mayor presencia durante esta

investigación. Esto también se evidenció anteriormente en los aislamientos de plántulas con 10 y 20 días de crecimiento.

- El establecimiento del hongo *Trichoderma* sp. en el sustrato a nivel de invernadero fue efectivo, determinando la presencia de ambas cepas en plántulas con 10 y 20 días de crecimiento.
- Basado en las hipótesis planteadas, se acepta la hipótesis alterna (H1), que; no todos los tratamientos tuvieron el mismo efecto en el control de patógenos fúngicos de la semilla de frijol común. Favoreciendo la germinación, control de patógenos fúngicos y el crecimiento radicular en las plantas de las semillas tratadas con las dos cepas de *Trichoderma* spp.

10. RECOMENDACIONES

Después de conocer de forma más profunda el comportamiento de ambas cepas del hongo *Trichoderma* spp. y los efectos en la germinación y crecimiento del frijol común de la variedad CENTA-pipil a nivel de invernadero, se recomienda lo siguiente:

- Realizar una investigación con las mismas cepas a nivel de campo, esto es importante ya que ambas cepas poseen el potencial antagónico sobre los patógenos fúngicos; *Fusarium* sp. y *S. bataticola*, además de fortalecer el sistema radicular de las plantas de frijol y mejorar la germinación de las semillas.
- Se recomienda, que en próximas investigaciones se trabaje independientemente con cada uno de los patógenos, para obtener resultados en campo que sean más precisos.
- Realizar investigaciones con diferentes sustratos y ámbitos de temperatura, esto para caracterizar más los tipos de sustrato y/o temperatura en los que se desarrolla con mayor efectividad el hongo *Trichoderma* spp.
- Seguir realizando aislamientos de diferentes cepas de *Trichoderma* a nivel de laboratorio para ser estudiadas a nivel de invernadero y campo.
- Cuando se trabaje con cultivos es importante conocer el manejo agronómico que debe de emplearse, además de conocer los tipos de enfermedades ligados a estos, para no errar respecto a los diferentes síntomas de enfermedades mostrados en los cultivos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agrios G. 1995. Fitopatología, 2th Edition. Academic Press, México ISBN 968-18-5184-6.
- Argumedo-Delira R, Alarcón A, Ferrera-Cerrato R, Peña-Cabriaes JJ. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Rev. Int. Contam. Ambient. 25:257–269.
- Arias JH, Rengifo T, Jaramillo M. 2007. Manual técnico: buenas prácticas agrícolas (BPA): en la producción de frijol voluble. Medellín: Corpoica Mana FAO.
- Arias OU y Duarte CA. 2006. Determinación de las dosis efectivas del biopreparado *Trichoderma (Koningii y harzianum)* sobre *Sclerotium rolfsii* causante del mal del talluelo en chile dulce (*Capsicum annuum*) en época lluviosa. [Tesis de grado]. Universidad de El Salvador.
- Arzate-Vega J, Michel-Aceves AC, Domínguez-Márquez VM, Santos-Eméstica OA. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e Invernadero. Rev. Mex. Fitopatol. 24.
- Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga-Vega C, Brenes-Madriz J, Rivera-Méndez W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Rev. Tecnol. En Marcha 27:83–91.
- Avilés LA. 2014. Evaluación de la actividad antagónica de *Trichoderma* sp. en hongos patógenos de semilla de frijol a nivel de laboratorio. Centro nacional de tecnología agropecuaria y forestal, “Enrique Alvarez Cordova”. El Salvador.
- Blaszczyk L, Siwulski M, Sobieralski K, Lisiecka J, Jedryczka M. 2014. *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. Journal of plant protection research. 54:309-317.

- Benítez T, Rincon A, Limon M, Codón A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7:249–260.
- Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre J, Colmenárez Y. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. 404 p.
- Bolet AM y Socarrás MM. 2005. Micotoxinas y cáncer. *Rev. Cuba. Investig. Bioméd.* 24:54–59.
- Cañedo V y Ames T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center (CIP), Lima, Perú, 62 p.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova", CENTA. 2008. Guía técnica para el manejo de variedades de frijol; Programa de granos básicos.
- Cubillos-Hinojosa J, Valero N, Mejía L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana* 27(1), 81-86.
- Cubillos JG, Páez A, Mejía L. 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo Secadera en Maracuyá, bajo condiciones de invernadero. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 64:5821–5830.
- Cupull R, Andreu CM, Pérez C, Delgado Y, Cupull M. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Cuba. Centro Agrícola.* 1:21-25.
- Díaz JL. 2012. Caracterización molecular del metabolismo del alantoato en judía (*Phaseolus vulgaris*). [Tesis de grado]. Universidad de Córdoba.
- Erazo ÁH. 2004. Deterioro de calidad física y viabilidad de semillas de maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), y sorgo (*Sorghum bicolor*) durante su almacenamiento en Zamorano [Tesis de grado].

- Ezziyyani M, Pérez C, Sid A, Requena ME, Candela ME. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). In: Anales de biología. p. 35–45.
- Fernández F, Gepts P, López M. 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali: CIAT.
- Groenewold B, Mayek N, Padilla JS. 2003. Hongos Asociados a la Semilla de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. Rev. Mex. Fitopatol. 21:375 - 378.
- Guédez C, Castillo C, Cañizales L, Olivar R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. 7: 50 – 74
- Google Maps. 2017. A: Mapa geográfico de El salvador, <https://www.google.com/maps/search/El+Salvador+RADARES/@13.5666629,-89.2842164,11z/data=!3m1!4b1>; B: Ubicación geográfica de CENTA, <https://www.google.com/maps/search/CENTA+SAN+ANDRES/@13.8179844,-89.35509,12z>.
- Guigón-López C y González-González P. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 22:117–124.
- Gutierrez-Ramírez A, Robles-Bermudez A, Santillan-Ortega C, Ortiz-Catón M, Cambero-Campos OJ. 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. Rev. Bio Cienc. 2.
- Hernández-López VM, Vargas-Vázquez ML, Muruaga-Martínez JS, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N. 2013. Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. Rev. Fitotec. Mex. 36:95–104.

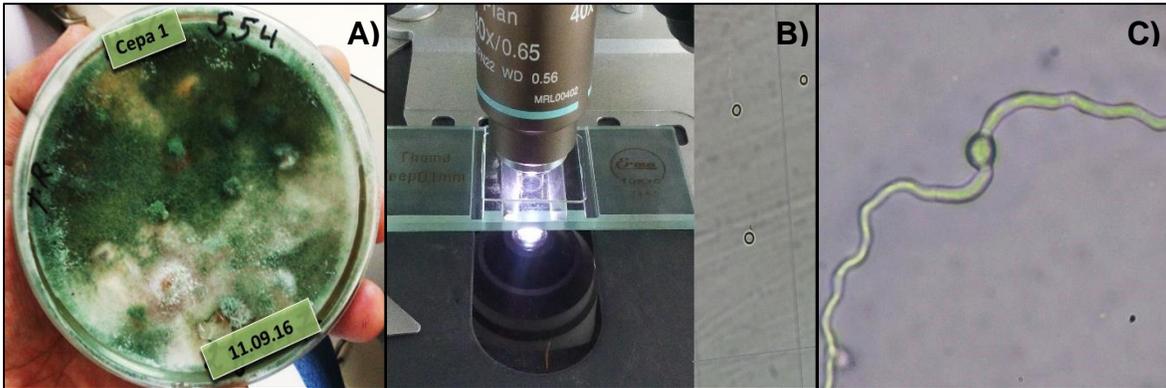
- Hoyos-Carvajal L, Chaparro P, Abramsky M, Chet I, Orduz S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agron. Colomb. 26:451–458.
- Hoyos-Carvajal L, Duque G, Orduz P. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Rev. Col. De Ciencias Hortícolas. 2. 76-86.
- Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 24:14–21.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. 2013. Catálogo de hongos en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Nicaragua. Managua, Nicaragua.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. 2013. Evaluación de calidad de semillas. Prueba de germinación para semillas de granos básicos. Proyecto “Apoyo a la producción de semillas de granos básicos para la seguridad alimentaria de Nicaragua”.
- Integrated Taxonomic Information System, ITIS. 2017. Clasificación taxonómica del “frijol común”, *Phaseolus vulgaris* L. Disponible en: <http://www.itis.gov>.
- López-Herrera CJ, Pérez-Jiménez RM, Llobel A, Monte-Vázquez E, Zea-Bonilla T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 5:261–265.
- López MU. 2015. Inducción de resistencia al virus del mosaico dorado del chile dulce (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso de preparados orgánicos y *Trichoderma harzianum* Rifai en fase de vivero. [Tesis de grado] Universidad de El Salvador.
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. 28:1–11.

- Martínez E, Cantillo T, García D. 2014. Hongos asociados a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas en Cuba. *Biotecnología Vegetal*. 14; 99 – 105.
- Mayor VM. 2010. Evaluación de líneas de frijol común andino (*Phaseolus vulgaris*) proveniente de cruza intra/inter acervo para tolerancia a sequía. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Colombia.
- Membreño JB, Zapata M, Beaver J, Smith R. 2001. Microflora en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agron. Mesoam.* 12:135–139
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A, Alarcón-Cruz N. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuete. *Av. En Investig. Agropecu.* 17:89–107.
- Missouri Botanical Garden. 2017. Flora de Nicaragua; *Phaseolus vulgaris* L. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/13031753?projectid=7>
- Ortuño N, Miranda C, Claros M. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *J. Selva Andina Biosphere* 1:16–24.
- Pandya JR, Sabalpara AN, Chawda SK. 2011. *Trichoderma*: a particular weapon for biological control of phytopathogens. *J. Agric. Technol.* 7:1187–1191.
- Perdomo M, Peña J, Guédez C, Castillo CE, Cánsales L. 2007. *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad “sancocho” en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill). *Academia* 6:52–61.
- Pulman GS, De Vay JE, Elmore CI, Hart WH. 1989. Solarización del suelo; Un método no químico para el control de enfermedades y plagas. *Rev. IPA La Platina.* 52:48-52.
- Rivas GA, Martínez DA, González AA. 2008. Control de “Mal de Talluelo” en plántulas de aguacate (*Persea americana*), en la modalidad de viverista, aplicando *Trichoderma harzianum* (Bio-Tric® 15WP) en diferentes concentraciones. [Tesis de grado]. Universidad de El Salvador.

- Sivila N y Álvarez S. 2013. Producción artesanal de *Trichoderma*. 1a ed. San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy. Universitaria de Jujuy.
- Stefanova M, Sandoval I, Martínez ML, Heredia I, Ariosa M D, Arévalo R. 2004. Control de hongos fitopatógenos del suelo en semilleros de tabaco con *Trichoderma harzianum*. Fitosanidad, vol. 8, núm. 2, junio, 2004, pp. 35-38 Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana, Cuba.
- Tovar JC. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista “*in vivo*” de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo Fitopatógeno *Rhizoctonia solani* [tesis de grado]. [Bogotá]: Pontificia Universidad Javeriana.
- Ulloa JA, Rosas MP, Ramírez JC, Ulloa BE. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Rev. Fuente. núm. 8.
- Wong-González E. 2010. ¿Después de un análisis de variancia qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. Agron. Mesoam. 21:349–356.

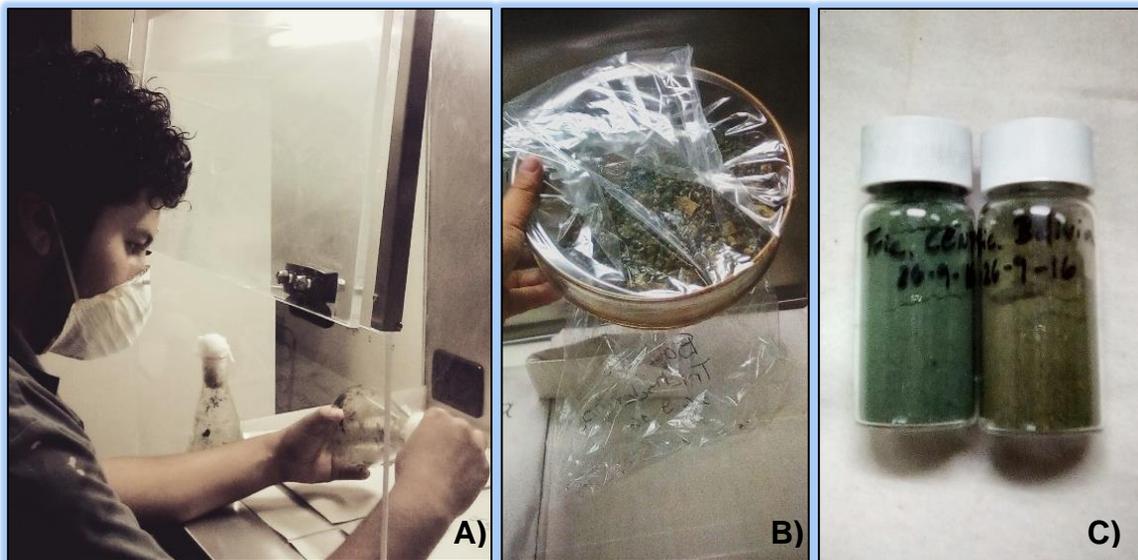
12. ANEXOS

Anexo 1. Evaluación o pruebas de control de calidad para las cepas de *Trichoderma* spp. (Pureza, concentración y vialidad).



A) Micelio puro de *Trichoderma* sp. Cepa 1, **B)** Hematocitómetro y esporas, **C)** Crecimiento isodiamétrico de una espора de *Trichoderma* sp. en 24 horas.

Anexo 2. Proceso de extracción de esporas de las cepas de *Trichoderma* spp.



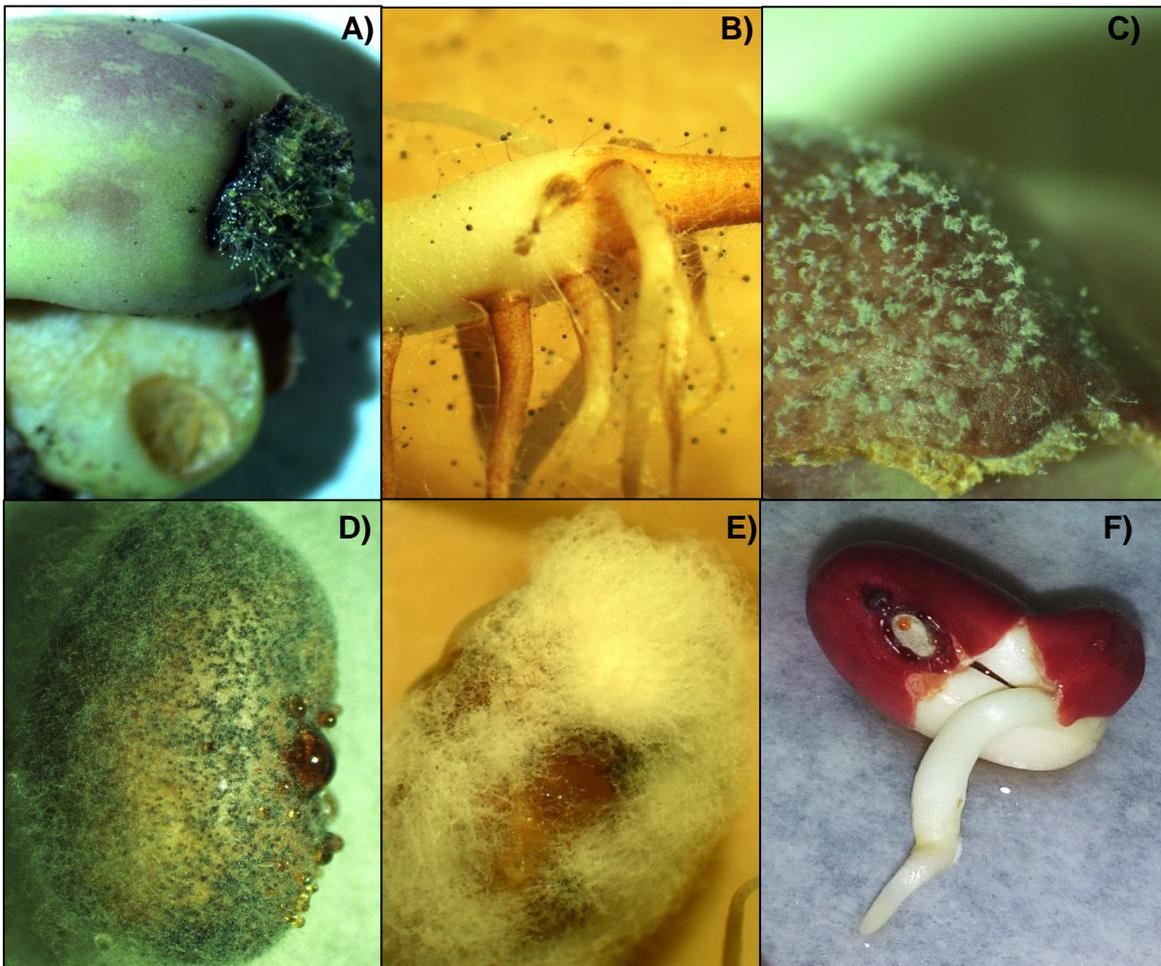
A) Secado de sustrato inoculado con *Trichoderma* sp., **B)** Extracción de esporas con tamiz, **C)** Esporas extraídas en viales.

Anexo 3. Resultado del análisis patológico de las semillas de frijol CENTA-pipil.

Patógeno	Porcentaje	
	Luz UV	PDA
<i>Aspergillus</i> sp.	70%	20%
<i>Fusarium</i> sp.	20%	20%
<i>Penicillium</i> sp.	30%	20%
<i>Rhizopus</i> sp.	20%	100%
<i>Sclerotium bataticola</i>	90%	100%

(10%; presencia mínima permisible)

Anexo 4. Resultado del análisis patológico de las semillas de frijol CENTA-pipil.



Semilla de frijol; A) *Aspergillus* sp., B) *Rhizopus* sp. en raíz, C) *Penicillium* sp., D) *Sclerotium bataticola*, E) *Fusarium* sp., F) Semilla sana.

Anexo 5. Presencia de hongos y bacterias en suelo, anterior a la solarización.

Grupo	Géneros	Dilución	
		10 ⁴	10 ⁵
	<i>Aspergillus</i> sp.	X	X
	<i>Fusarium</i> sp.	X	X
Hongos	<i>Gloeosporium</i> sp.	X	X
	<i>Penicillium</i> sp.	X	
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	X	
	<i>Rhizopus</i> sp.	X	
Bacterias	<i>Erwinia</i> sp.	X	X
	<i>Pseudomonas</i>	X	

Anexo 6. Presencia de hongos y bacterias en suelo, posterior a la solarización.

Grupo	Géneros	Dilución	
		10 ⁴	10 ⁵
Hongos	<i>Aspergillus</i> sp.	X	X
	<i>Rhizopus</i> sp.	X	
Bacterias	<i>Erwinia</i> sp.	X	X

Anexo 7. Ubicación de los tratamientos en el macrotúnel

