



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“EFECTO ANTAGÓNICO *in vitro* DE *Trichoderma sp.* Y *Pseudomonas sp.*
FRENTE A *Lasiodiplodia sp.*, ICA, AGOSTO 2017 - ENERO 2018”.**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. NAVARRETE RAMOS, Rita Stephani Pierina

Bach. TELLO GONZALES, Xenia Briseida

ICA – PERÚ

2018

Gracias a Jehová Dios por darme
la vida y permitirme seguir
adelante a pesar de todas las
dificultades.

A mi madre Briseida por ser mi
consejera, amiga incondicional y
la persona más especial en mi
vida; a mi abuelita Pascuala quien
fue uno de los más grandes
motivos que me impulsaron a
seguir adelante en el camino que
Dios está trazando en mi vida y a
mi prima Wendy que con su
ejemplo me inspira a seguir mis
sueños.

Xenia

A Dios, por haberme permitido llegar a este momento tan importante en mi vida.

A mi familia; en especial a mis padres; Martín y Carmen; mis hermanas; Valeria y Valentina; abuelos, Flor, Juan, Julia y José; a Kevin; por su incondicional apoyo en mi desarrollo personal y profesional; son la más grande razón de mi esfuerzo y dedicación.

Pierina

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, damos infinitas gracias a nuestro Dios, por protegernos durante nuestro camino y darnos las fuerzas necesarias para superar todos los obstáculos y las dificultades que se nos presentaron en nuestras vidas; así mismo, guiarnos en culminar esta importante etapa.

A nuestras familias, por su apoyo incondicional en nuestro desarrollo y guiarnos en el día a día para el cumplimiento de todas nuestras metas.

A nuestros asesores de tesis; Blgo. Luis Cartagena Sigvas, por guiarnos con sus conocimientos y orientarnos siempre con paciencia durante el desarrollo del presente trabajo, de igual manera al Blgo. Hanna Cáceres Yparraguirre, por el aporte y apoyo constante y brindarnos la oportunidad de ejecutar este proyecto de investigación en el CITEagroindustrial.

Al Centro de Investigación Productiva y Transferencia Tecnológica Agroindustrial (CITEagroindustrial) y al Centro de Investigación, Capacitación y Asesoría (CICA) por darnos las facilidades de ingresar a sus instalaciones y hacer uso de los laboratorios equipados, los cuales fueron de gran apoyo para la culminación de la investigación.

Al laboratorio de análisis clínico PacíficoLab, a cargo del Blgo. Pilar Martínez por proporcionarnos los medios necesarios para realizar la bioquímica para la identificación de las cepas aisladas de Pseudomonas.

De manera muy especial agradecemos al Dr. Walter Ramos Mayurí, por su gran ayuda y guía en la parte estadística del presente trabajo de investigación.

Los autores

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|-------------|
| RESUMEN | |
| ABSTRACT | |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| I. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 1.1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 3 |
| 1.1.1. Antecedentes a nivel internacional | 3 |
| 1.1.2. Antecedentes a nivel nacional | 6 |
| 1.1.3. Antecedentes a nivel local | 8 |
| 1.2. BASES TEÓRICAS DE LA INVESTIGACIÓN | 8 |
| 1.2.1. Hongos fitopatógenos | 8 |
| 1.2.2. Lasiodiplodia | 9 |
| 1.2.3. Microorganismos Antagonistas | 10 |
| 1.2.4. Hongos antagonistas | 11 |
| 1.2.5. Trichoderma | 11 |
| 1.2.6. Bacterias antagonistas | 13 |
| 1.2.7. Pseudomonas | 13 |
| 1.3. MARCO CONCEPTUAL | 15 |
| 1.3.1. Aislamiento | 15 |
| 1.3.2. Antagonismo | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.3. Fitopatógeno | 15 |
| 1.3.4. Identificación parcial | 15 |
| 1.3.5. Inhibición de crecimiento micelial | 16 |
| 1.3.6. Microorganismos antagonistas | 16 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 17 |
| 2.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA | 17 |
| 2.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | 18 |
| 2.2.1. Problema General | 18 |
| 2.2.2. Problemas Específicos | 18 |
| 2.3. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA | 19 |
| 2.3.1. Delimitación espacial y geográfica | 19 |
| 2.3.2. Delimitación temporal | 19 |
| 2.3.3. Delimitación social | 19 |
| 2.3.4. Delimitación conceptual | 19 |
| 2.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN | 20 |
| 2.4.1. JUSTIFICACIÓN | 20 |
| 2.4.2. IMPORTANCIA | 20 |
| 2.5. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN | 21 |
| 2.5.1. OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 2.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 2.6. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN | 22 |
| 2.6.1. HIPÓTESIS GENERAL | 22 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.6.2. | HIPÓTESIS ESPECÍFICAS | 22 |
| 2.7. | VARIABLES DE INVESTIGACIÓN | 23 |
| 2.7.1. | IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES | 23 |
| 2.7.2. | OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES | 24 |
| III. | METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.1. | TIPO, NIVEL Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.1.1. | TIPO DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.1.2. | NIVEL DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.1.3. | DISEÑO DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.2. | POBLACIÓN Y MUESTRA MATERIA DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.2.1. | POBLACIÓN DE ESTUDIO | 25 |
| 3.2.2. | MUESTRA DE ESTUDIO | 26 |
| IV. | TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN | 27 |
| 4.1. | TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS | 27 |
| 4.1.1. | MATERIALES | 27 |
| 4.1.2. | MÉTODOS | 27 |
| 4.1.2.1. | Aislamiento e identificación parcial de cepas de Trichoderma | 27 |
| 4.1.2.2. | Aislamiento e identificación parcial de cepas de Pseudomonas | 32 |

| | | |
|------------|---|----|
| 4.1.2.3. | Reactivación de la cepa de <i>Lasiodiplodia sp.</i> | 34 |
| 4.1.2.4. | Reactivación de la cepa de <i>Trichoderma viride</i> | 34 |
| 4.1.2.5. | Ensayos de enfrentamiento antagónico según Bhadra et al., 2014 modificado por Navarrete y Tello, 2018 | 34 |
| 4.1.2.5.1. | Enfrentamientos antagónicos de <i>Trichoderma sp.</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> | 35 |
| 4.1.2.5.2. | Enfrentamientos antagónicos de <i>Pseudomonas sp.</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> | 35 |
| 4.1.2.5.3. | Enfrentamientos antagónicos conjuntos de <i>Trichoderma sp.</i> (T1) y <i>Pseudomonas sp.</i> (P2) frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> | 36 |
| 4.2. | INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS | 40 |

| | |
|--|----|
| 4.2.1. Fichas de toma de muestras | 40 |
| 4.2.2. Diseño experimental – Técnica de cultivos duales | 40 |
| 4.3. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE DATOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS | 43 |
| 4.3.1. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE DATOS | 43 |
| 4.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 43 |
| V. PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 44 |
| 5.1. PRESENTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS | 44 |
| 5.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 47 |
| VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS | 52 |
| 6.1. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS GENERAL | 52 |
| 6.2. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS ESPECÍFICAS | 52 |
| CONCLUSIONES | 54 |
| RECOMENDACIONES | 55 |
| FUENTES DE INFORMACIÓN | 56 |
| ANEXOS | 68 |

RESUMEN

Existen microorganismos como *Trichoderma* y *Pseudomonas* que tienen acción antagónica sobre hongos fitopatógenos como *Lasiodiplodia sp.*, que afecta a diferentes cultivos agrícolas de importancia económica; es por ello que, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto antagónico *in vitro* de especies nativas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* Se realizaron muestreos de suelos y colocaron trampas de arroz en distintos cultivos para aislar los microorganismos en estudio. Las cepas aisladas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* fueron enfrentadas de forma individual por el método de enfrentamiento por cultivos duales frente a *Ladiodiplodia sp.*; posteriormente, se seleccionó una cepa de cada género basándose en el mejor comportamiento antagónico, y se elaboró una mezcla de ambos antagonistas para evaluar un posible sinergismo al enfrentarlos frente a *Ladiodiplodia sp.* Se aislaron en total 6 cepas nativas para cada género de *Trichoderma* y *Pseudomonas*. Todas las cepas de *Trichoderma* y *Pseudomonas* aisladas mostraron efecto antagónico sobre *Lasiodiplodia sp.*; la combinación de la cepa de *Trichoderma sp.* T1 y *Pseudomonas sp.* P2 no superó el control ejercido por la cepa comercial. La cepa *Trichoderma sp.* T1 fue la que mostró mejor efecto antagónico tan igual que la cepa comercial *Trichoderma viride*. Se concluye que tanto *Trichoderma* y *Pseudomonas* tienen efecto antagónico frente a *Lasiodiplodia sp.*

Palabras claves: Control biológico, antagonismo, *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *in vitro*.

ABSTRACT

There are microorganisms such as *Trichoderma* and *Pseudomonas* that have antagonistic action on phytopathogenic fungi such as *Lasiodiplodia sp.*, that affects different agricultural crops of economic importance, that is why the objective of this research was to evaluate the antagonistic effect *in vitro* of native species of *Trichoderma sp.* and *Pseudomonas sp.* against *Lasiodiplodia sp.* Soil samplings were carried out and rice traps were placed in different crops to isolate the microorganisms under study. The isolated strains of *Trichoderma sp.* and *Pseudomonas sp.* were confronted individually by the method of confrontation by dual cultures against *Ladiodiplodia sp.*; subsequently, a strain of each genus was selected based on the best antagonistic behavior, and a mixture of both antagonists was elaborated to evaluate a possible synergism when facing them against *Ladiodiplodia sp.* A total of 6 native strains were isolated for each *Trichoderma* and *Pseudomonas* genus. All *Trichoderma* and *Pseudomonas* strains isolated showed antagonistic effect on *Lasiodiplodia sp.*; the combination of the *Trichoderma sp.* T1 and *Pseudomonas sp.* P2 did not exceed the control exercised by the commercial strain. The *Trichoderma sp.* T1 was the one that showed the best antagonistic effect, as well as the commercial strain *Trichoderma viride*. It is concluded that both *Trichoderma* and *Pseudomonas* have an antagonistic effect against *Lasiodiplodia sp.*

Key words: Biological control, antagonism, *Trichoderma sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lasiodiplodia sp.*, *in vitro*.

**UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

**“EFECTO ANTAGÓNICO *in vitro* DE *Trichoderma sp.* Y *Pseudomonas sp.*
FRENTE A *Lasiodiplodia sp.*, ICA, AGOSTO 2017 - ENERO 2018”.**

ÁREA DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA SALUD

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA Y CONSERVACIÓN DEL
MEDIO AMBIENTE**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. NAVARRETE RAMOS, Rita Stephani Pierina

Bach. TELLO GONZALES, Xenia Briseida

ASESORES:

BLGO. LUIS ANTONIO CARTAGENA SIGUAS

BLGO. HANNA CÁCERES YPARRAGUIRRE

INTRODUCCIÓN

En todo cultivo, existe una serie de problemas fitosanitarios que lo afectan y que pueden causar serios daños (1). Los daños ocasionados no sólo se refieren a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. Las pérdidas económicas, pueden ser de tipo cuantitativo y/o cualitativo, sabor, textura, color y forma (2).

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona, y por lo tanto, sobre el que más investigación se ha realizado.

Lasiodiplodia sp. es un hongo parásito facultativo que penetra en los tejidos vegetales, tanto por aberturas naturales, como por heridas ocasionadas por las podas, insectos o cualquier otro agente a temperaturas mayores de 23°C y precipitaciones medias (3).

Actualmente, se emplean controladores físicos y químicos para erradicar este hongo fitopatógeno de los cultivos (4). El control químico consta en el uso de fungicidas y se limita a unos pocos ingredientes activos, los que, por su modo de acción específica, el hongo patógeno adquiere resistencia, pero su uso se restringe a ciertos periodos de la fenología del cultivo debido a los Límites Máximos de Residuos (LMR) y los Periodos de Carencia (PC) (1).

En los últimos años, el uso de biocontroladores en los cultivos ha tenido grandes resultados al ser efectivos y no afectar al medio ambiente (5).

Se plantea controlar esta plaga de gran importancia en la agricultura mediante el uso del control biológico empleando un hongo antagonista *Trichoderma sp.* y una bacteria, *Pseudomonas sp.*

Las especies del género *Trichoderma* son habitantes comunes del suelo y se propagan en diversos sustratos. Se caracterizan por ser antagonistas eficientes, presentar la capacidad de parasitar diversos hongos fitopatógenos (6), y por competir por el espacio y los nutrientes mediante la producción de metabolitos (7).

Las *Pseudomonas* son un género bacteriano de gran interés biológico. Son uno de los grupos más extendidos en la naturaleza y con un mayor éxito evolutivo debido a su gran amplitud de rango de supervivencia de sus especies (8). Tienen un gran potencial de compuestos aromáticos y xenobióticos, presentando la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos, rápido crecimiento, compatibilidad con plaguicidas, colonizar el sistema radicular de plantas, formar biopelículas y ser manejable desde el punto de vista genético (9). La presente investigación determinó la capacidad antagonista del hongo *Trichoderma sp.* y de la bacteria *Pseudomonas sp.* frente al hongo fitopatógeno *Ladosiplotia sp.*

I. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En los últimos años, la necesidad de manejar cultivos de forma eficiente y salvaguardando el medioambiente ha llevado a investigar el uso de microorganismos que tengan efecto antagónico frente a las diversas plagas y enfermedades que constituyen un problema a pequeños y grandes productores en el Perú.

Entre los microorganismos utilizados para el control biológico encontramos a *Trichoderma sp.* que es un hongo antagonista y la bacteria *Pseudomonas sp.*; ambos encontrados en diversidad de suelos y ampliamente utilizados para controlar diversas plagas en la agricultura.

Una de las plagas más importantes que afecta a diversos cultivos de gran interés agroindustrial, es sin duda *Lasiodiplodia sp.* (10).

Este hongo fitopatógeno causa variadas sintomatologías que incluyen la presencia de exudados gomosos, muerte descendente en la corteza que puede llegar hasta la raíz de planta, pudrición seca en frutos, necrosis floral, tizón, canchales en ramas, etc. (11).

1.1.1. Antecedentes a nivel internacional.

Priya y Nagaveni (2009), en la India, probaron la eficacia de seis especies de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. koningii*, *T. virens* y *T. hamatum*), para inhibir el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae*, patógeno de la pudrición de la fruta de *Elaeocarpus munronii* a través de la doble cultivo y producción *in vitro*

de metabolitos volátiles y no volátiles. Estos aislamientos variaban en su tasa de crecimiento, producción de esporas y metabolitos y en capacidad antagonista contra el patógeno. Las seis especies mostraron una inhibición efectiva (> 50%) contra el patógeno en el cultivo dual. Los aislamientos de crecimiento rápido fueron mejores que los aislamientos de crecimiento lento en la inhibición del patógeno por la producción de metabolitos no volátiles, ya que los aislamientos de crecimiento lento inhibieron significativamente al patógeno mediante la producción de metabolitos más volátiles. *T. virens* y *T. hamatum* fueron eficaces en la inhibición del patógeno tanto en el cultivo dual como en la producción de metabolitos volátiles y *T. pseudokoningii* fue el inhibidor efectivo del patógeno a través de la producción de metabolitos no volátiles. Por lo tanto, la tasa de crecimiento y la producción de esporas son factores cruciales que intervienen en la determinación de la capacidad antagónica de las especies *Trichoderma* contra *L. theobromae* (12).

Plata (2010), en México, aisló seis cepas nativas de *Trichoderma spp.* en viñedos de la región vitivinícola de la Costa de Ensenada. Todas las cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *D. seriata*, *F. australe*, *N. vitifusiforme*, *D. corticola* y *L. theobromae*, en menor o mayor grado. La menor inhibición del crecimiento hacia los patógenos probados se observó en la cepa SACH26-1 hacia *L. theobromae* (13).

Coelho et al. (2011), evaluaron en Brasil el potencial antagónico de aislados del agente de biocontrol *Trichoderma sp.* con respecto a *Lasiodiplodia sp.* y *Fusarium sp.*, para ello se usaron dos cepas de *Trichoderma sp.* En la primera evaluación, después de 5 días, se observó el control de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia sp.* y *Fusarium sp.*, de 50 a 80%, en presencia de *Trichoderma sp.* en relación a los testigos (14).

Latha et al. (2011), en la India, examinaron aislados de agentes de biocontrol fúngico y bacteriano de manera individual contra *Lasiodiplodia theobromae in vitro*. Entre los antagonistas fúngicos (*Trichoderma*) y bacterianos (*Pseudomonas* y *Bacillus*) examinados contra *L. theobromae* en condiciones de laboratorio, los aislados de *Trichoderma viride* (Tv1), *Pseudomonas fluorescens* (Pf1) y *Bacillus subtilis* (Bs16) redujeron eficazmente el crecimiento micelial del patógeno. Los estudios de compatibilidad revelaron que los aislamientos de *T. viride* (Tv1), *P. fluorescens* (Pf1) y *B. subtilis* (Bs16) eran compatibles entre sí y también con enmiendas orgánicas y micronutrientes (15).

Nieblas (2012), en Estados Unidos-Baja California, evaluó el efecto *in vitro* de ocho aislados nativos de *Trichoderma spp.* sobre tres aislados de *L. theobromae* en donde encontró un efecto antagónico similar hacia el patógeno por las ocho *Trichodermas* evaluadas. También evaluó la sensibilidad de cinco *Trichoderma spp.* ante fungicidas. Concluye que

T. gamsii T6 tiene potencial para ser utilizada en el control biológico de *L. theobromae* (16).

Bhadra et al. (2014), en la República Popular de Bangladés, encontraron la eficacia de cepas de *Trichoderma viride* sobre *Lasiodiplodia theobromae* realizando experimentos en donde evaluaron la bio-eficacia de cuatro especies de *Trichoderma*, a saber. *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* (cepa verde), *T. viride* (cepa amarilla) contra el patógeno *Lasiodiplodia theobromae*. *T. koningii* y *T. viride* mostraron una inhibición máxima en el control de los patógenos, de estos dos fue el segundo quien tuvo más eficacia frente a *Lasiodiplodia theobromae* (17).

1.1.2. Antecedentes a nivel nacional.

Rodríguez y Veneros (2011), en Trujillo, investigaron el efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre los hongos patógenos de frutos de postcosecha de papaya. Los hongos fitopatógenos determinados fueron: *Rhizopus nigricans* Ehr., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) W. Yamamoto, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. *Trichoderma harzianum*, demostró realizar un efectivo control biológico sobre los hongos patógenos de frutos de post-cosecha de *Carica papaya* “papaya” (18).

Vite (2012), en Trujillo, determinó el efecto *in vitro* de *Trichoderma viride* nativa sobre la germinación y el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de *Persea americana* “palto” concluyendo que *T. viride* nativa tiene un efecto antagónico tipo 1 sobre el crecimiento de *L. theobromae* y, disminuye la germinación de *Lasiodiplodia theobromae*. Para ello empleó la técnica de cultivo dual, que consistió en enfrentar a *T. viride* con *Lasiodiplodia theobromae* en agar papa dextrosa; y evaluó microscópicamente las diferentes formas de micoparasitismo. También determinó el porcentaje de germinación conidial de *L. theobromae* frente a las conidias de *T. viride* nativa. Se encontró que *T. viride* nativa presenta un antagonismo tipo 1 sobre *L. theobromae*; observándose microscópicamente enrollamiento, adherencia, deformación de la hifa, fragmentación, penetración, clamidosporas, vacuolización y estrangulamiento. En relación a la germinación, *T. viride* disminuye la germinación de las conidias de *L. theobromae* hasta en un 46,65% (19).

Gamarra (2015), en Lima, demostró la efectividad *in vitro* de la acción antagonista de *Trichoderma harzianum* para ejercer control sobre *Lasiodiplodia theobromae* y *Cladosporium herbarum*, empleando el enfrentamiento dual en placa y la metodología propuesta en la norma ASTM D 4445-03, la cual consiste en utilizar cinco concentraciones diferentes de *T. harzianum* como controlador, probetas de madera de congona tratadas en solución de esporas de *L. theobromae*, *C. herbarum*

y una mezcla de esporas de ambos como bloques de prueba. Los resultados obtenidos muestran que *T. harzianum* genera un control superficial en *L. theobromae*, extendiéndose la mancha de manera interna en la madera. Mientras que para *C. herbarum* y para la mezcla de ambos, no se muestra una diferencia significativa entre el testigo y las concentraciones a nivel superficial (20).

Supanta et al. (2017), en Lima, realizaron pruebas de eficacia de *Trichoderma spp.* y productos químicos frente a *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.), mediante diferentes pruebas. En las pruebas *in vitro* el fosfito de cobre fue el que tuvo los mejores resultados con 100% de Porcentaje de Inhibición de Crecimiento del Micelio (PICM), por su parte inhibió el 45,7% de crecimiento micelial, observándose una acción de micoparasitismo y antibiosis sobre el patógeno (21).

1.1.3. Antecedentes a nivel local.

No se cuentan con antecedentes a nivel local sobre el efecto antagónico de *Trichoderma* y *Pseudomonas* frente a *Lasiodiplodia*.

1.2. BASES TEÓRICAS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1. Hongos Fitopatógenos

Según Agrios (2) y Urbina (22), los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos

componentes. Se considera que más de 8000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas (2,22).

La determinación de si el hongo observado es un organismo patógeno o saprofito se logra mediante el estudio microscópico de su micelio, de sus estructuras fructíferas y de sus esporas. En el caso de algunos hongos, existen medios de cultivo nutritivos especiales que permiten llevar a cabo su aislamiento selectivo, identificación o promover su esporulación. Otros hongos requieren ser incubados bajo ciertas condiciones de temperatura, ventilación o luz para producir sus esporas. No obstante, la mayoría de los hongos producen sus esporas y estructuras fructíferas en los tejidos enfermos, cuando éstos se colocan sobre un plástico, vidrio o “cámara húmeda” (2).

1.2.2. Lasiodiplodia

Lasiodiplodia sp. es un hongo endófito en ciertas especies vegetales (23), de conidias hialinas y pigmentadas, ovoides, ápice redondeado y una base truncada, las conidias pigmentadas presentan un septo y apariencia estriada gracias a los depósitos de melanina en su capa externa (10). Este hongo parásito facultativo, penetra en los tejidos vegetales por aberturas naturales, heridas generadas en épocas de podas, insectos u otros daños mecánicos, a temperaturas mayores de 23°C y precipitaciones medias. Sus conidias oscuras, color café, se diseminan por el viento, herramientas de poda, insectos, y el ser humano.

Las plantas afectadas se caracterizan por presentar secamiento y

necrosis de ramas terminales, observándose la muerte descendente y defoliación parte afectada (3). La infección por *Lasiodiplodia sp.* puede presentarse en cualquier estadio de la planta y en todos sus órganos (24).

Taxonómicamente pertenece al Reino Mycetae, División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Ascomycetes, Orden Sphaeropsidales, Familia Sphaeropsidaceae, Género *Lasiodiplodia* (25).

1.2.3. Microorganismos Antagonistas

Frecuentemente presentes en la naturaleza y usados como métodos de control biológico. Se utilizan para proteger directamente a las plantas del ataque de los patógenos incluyen la acción de microorganismos antagonistas en el sitio de infección antes o después de que ocurra la infección. (2).

Los mecanismos por los cuales los microorganismos benéficos ejercen acción sobre los agentes fitopatógenos aún no son completamente conocidos (26-27). Dentro de los modos de acción de los microorganismos antagonistas, es considerado como principal la competencia por nutrientes y espacio entre el patógeno y el antagonista (28). La resistencia inducida, el parasitismo directo, la adhesión a patógenos y la producción de metabolitos secundarios (antibiosis), son otros modos de acción los cuales suprimen la actividad de los patógenos (29).

1.2.4. Hongos Antagonistas

Los hongos antagonistas son componentes naturales del suelo, encontrándose en materiales vegetales en estado de descomposición y en numerosos suelos de uso agrícola, ya que, tiene la capacidad de adaptarse a varios ambientes (30).

1.2.5. Trichoderma

Es uno de los géneros más importantes en el control de plagas ya que actúan frente a un amplio rango de hongos fitopatógenos, son comunes en el suelo, principalmente en aquellos ácidos y ricos en materia orgánica, tienen gran facilidad para ser aislados y cultivados debido a que se propagan en diversos sustratos y no afectan a plantas superiores. Muchas especies del género *Trichoderma* se están utilizando como agentes de biocontrol en múltiples países, para el control de varias enfermedades en cultivos de importancia económica.

Trichoderma coloniza las raíces, formando una capa protectora creando una simbiosis en el que el hongo se alimenta de los exudados de las raíces protegiéndolas simultáneamente, reduciendo o eliminando las fuentes de alimento del patógeno y sirviendo como una barrera para prevenir la entrada de patógenos a las raíces.

Ejercen su actividad por medio de la combinación de mecanismos como un hiperparásito, compitiendo por nutrientes a través de la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, adicionalmente es de beneficio a las plantas que produce sustancias promotoras de crecimiento celular.

Taxonómicamente pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae. Es un hongo filamentoso cuyo estado teleomórfico corresponde al hongo *Hypocrea spp.* Morfológicamente se compone de conidias y fiálides (30).

Características:

- **Macroscópicas:**

- **Colonias:** De crecimiento rápido y coloración característica en tonalidades de color blancas – verdes y amarillo – verdosas. Las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos (31,32).

Es común que el revés de las colonias no sea coloreado, o con tonos amarillo, ámbar ó amarillo-verde. Muchas de las especies producen abundantes clamidosporas en cultivos sumergidos (33).

- **Microscópicas según Barnett y Hunter, B. (32):**

- **Conidióforos:** son erectos, hialinos, en su mayoría con un eje principal ramificados en forma piramidal, no verticilados, que pueden ser solitarios o en grupos.
- **Conidias:** Unicelulares, hialinos a verdes, lisos u ornamentados, subglobosos, lisas, ovoides o elipsoidales, acumulados en cabezuelas aparentemente húmedas, frescas y pulverulentas después. De conidiación difusa o formando pústulas de color verde.

- **Fiálides:** Con forma de botella, únicas o en grupos, verticiladas, algunas especies con apéndices terminales en el extremo del conidióforo, hinchadas en la región central, pero delgadas hacia el ápice.

Las especies que se producen y que se utilizan en el control de plagas fitopatógenas son *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. virens.*, *T. martiale*, *T. asperellum*, *T. lignorum*. (30).

1.2.6. Bacterias Antagonistas

El uso de bacterias antagonistas es una manera de disminuir el daño de fitopatógenos (34).

Las rizobacterias, tienen la capacidad de sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana, además de la formación de endosporas, estructuras especializadas resistentes al calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos, siendo ello una de las razones por la que están mejor adaptadas a las condiciones adversas del medio ambiente (35).

1.2.7. Pseudomonas

Forma parte de las rizobacterias que cuentan con evidencia de ser antagonistas debido a la producción de antibióticos, la competencia por los nutrientes y por el efecto directo que causan sobre los patógenos (34,36).

Las Pseudomonas son bacterias bacilos Gram-negativo de forma recta o ligeramente curvas saprofíticas. Pueden encontrarse en ecosistemas

acuáticos y suelos, no forman esporas. Los flagelos polares que poseen hacen posible su movimiento activo en medios líquidos (37).

Pérez et al. (38) mencionan que “Las bacterias del género *Pseudomonas* presentan gran capacidad para utilizar diversidad de nutrientes, razón por la que se explica su ubicuidad. Su actividad enzimática las convierte en un grupo de microorganismos importante, debido a que son responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en diversos ecosistemas.

La efectividad de cepas de *Pseudomonas* con actividad antagonista, frente a fitopatógenos que afectan a cultivos de importancia económica, fue informada con anterioridad por otros autores. Este género bacteriano constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos a través de los cuales ejerce un efectivo control biológico, incluyendo el antagonismo directo y la inducción de resistencia en la planta. Sin embargo, *Pseudomonas* no tiene la capacidad de producir esporas de resistencia.”

El género *Pseudomonas* está compuesto por más de 100 especies, las cuales fueron divididas por análisis de secuencias multilocus (MLSA-multilocus sequence analysis) en nueve grupos mayoritarios: *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Pseudomonas syringae* Van Hall, *Pseudomonas lutea* Peix, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Pseudomonas anguilliseptica* Mlakabayashi y Egusa, *Pseudomonas straminea* Iizuka y Komagata, *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter,

Pseudomonas oleovorans Lee y Chandlery,
Pseudomonas stutzeri Lehmann and Neumann (39).

Taxonómicamente pertenece al reino Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase Gammapreobacteria, Orden Pseudomonales, familia Pseudomonales y Género *Pseudomonas*.

1.3. MARCO CONCEPTUAL

1.3.1. Aislamiento

Es la separación de un determinado microorganismo del resto que le acompañan. Técnicas usadas en el laboratorio de microbiología para la transferencia de un microorganismo de un ambiente a otro con la finalidad de inducir su crecimiento para su identificación (40).

1.3.2. Antagonismo

El antagonismo microbiano se define como la capacidad de un microorganismo para inhibir el desarrollo de otros microorganismos (41)

1.3.3. Fitopatógeno

Causantes de enfermedades de las plantas, pueden ser virus, fitoplasmas, espiroplasmas, bacterias, hongos y nemátodos (42).

1.3.4. Identificación parcial

Identificación preliminar que consiste en el estudio visual del aspecto de las colonias, como la morfología, elevación, bordes, tamaño, color y otras características; su comportamiento frente a distintos sustratos incorporados al medio de cultivo y posteriormente, el estudio del comportamiento metabólico mediante pruebas bioquímicas como la

utilización de diversas fuentes orgánicas e inorgánicas con la producción de sustancias detectables por reacciones directas e indirectas (43).

Se considera parcial porque sólo se llegó a identificar hasta el género.

1.3.5. Inhibición de crecimiento micelial

Es la reducción del crecimiento microbiano o causa de una disminución del número de organismos presentes, o de alteraciones en el entorno microbiano (37).

1.3.6. Microorganismos antagonistas

Son microorganismos con la capacidad de ejercer efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés, se han empleado para controlar diversas enfermedades en frutos y vegetales (44-45).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

Se conoce que el uso de hongos y bacterias antagonistas en los cultivos han tenido grandes resultados al ser efectivos para el control de plagas y enfermedades sin afectar al medio ambiente. La utilización de éstos en la agricultura, se trata de un método que emplea organismos vivos con el objetivo de limitar las poblaciones de otro organismo como una alternativa al empleo de los productos químicos (5).

En la mayoría de los estudios de biocontrol es aplicado un solo agente biocontrolador. Sin embargo, se ha señalado que se requiere evaluar el efecto de varios antagonistas combinados para asegurar un control adecuado de la enfermedad, disminuyendo dosis y minimizando el empleo de productos sintéticos, considerando además que el uso de aditivos mejora el efecto de los microorganismos antagonistas.

El Perú es un país agroexportador que en los últimos años ha mostrado un predominante uso de productos agroquímicos para el manejo de los cultivos, causando efectos negativos en el medioambiente, contaminando los suelos, el aire y el agua, y afectando también la salud de las personas.

Una de las enfermedades que atacan a los cultivos de importancia para la agroexportación, es la muerte regresiva en palto, mango, vid, arándano y otros cultivos, causada por el hongo *Lasiodiplodia sp.*, por lo que se plantea utilizar microorganismos antagonistas como los géneros *Trichoderma* y

Pseudomonas frente a este fitopatógeno por su capacidad de control y de minimizar los efectos secundarios en el medioambiente, siendo ésta, la contribución de la presente investigación.

2.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

2.2.1. Problema General

¿Existe efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en Ica, agosto 2017 – enero 2018?

2.2.2. Problemas Específicos

P.E.1. ¿Es posible el aislamiento e identificación parcial de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* de suelos de cultivo agrícola de la provincia de Ica y Ayacucho, agosto 2017 – enero 2018?

P.E.2. ¿Existe efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en Ica, agosto 2017 – enero 2018?

P.E.3. ¿Existe efecto antagónico *in vitro* de *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en Ica, agosto 2017 – enero 2018?

P.E.4. ¿Existe efecto antagónico *in vitro* al combinar una cepa de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en Ica, agosto 2017 – enero 2018?

P.E.5. ¿Existe diferencia significativa entre los tratamientos de efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.* en Ica, agosto 2017 – enero 2018?

2.3. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

2.3.1. Delimitación espacial o geográfica

Las muestras son procedentes de los suelos de cultivo agrícola de la provincia de Ica y la provincia de Ayacucho. Se realizaron los procedimientos experimentales en el laboratorio agrícola de El Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Agroindustrial, CITEAgroindustrial – ICA.

2.3.2. Delimitación temporal

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en un periodo de 6 meses comprendidos en el periodo de agosto 2017 a enero del 2018.

2.3.3. Delimitación social

La presente investigación beneficiará a pequeños y grandes productores en el manejo de sus cultivos, así como en la reducción de los efectos negativos que causan los agroquímicos en el medioambiente y la salud de las personas.

2.3.4. Delimitación conceptual

La investigación se enfoca en el aislamiento y enfrentamiento antagónico de dos microorganismos; el hongo *Trichoderma* y la bacteria *Pseudomonas*, que se utilizarán para combatir al hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia sp.*

2.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

2.4.1. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades causadas por *Lasiodiplodia sp.* se perciben en diversos cultivos alrededor del mundo, afectando a pequeños y grandes productores. A lo largo de los años, se han investigado y evaluado distintos métodos de control biológicos, que sean efectivos y que, a su vez, no comprometan el medio ambiente. Regularmente, se emplea un solo microorganismo antagonista, sin embargo, se requiere evaluar si el efecto de combinar dos antagonistas o más muestran mayor efectividad frente a una o más enfermedades, disminuyendo así las dosis y minimizando el empleo de productos químicos. Actualmente existen diversos productos biológicos cuya composición son hongos y bacterias para combatir diversas enfermedades. El aislamiento de cepas nativas en nuestro país motiva la creación y desarrollo de empresas especializadas en la producción y comercialización de nuevos productos biológicos. Por lo que, es necesario encontrar cepas nativas que cuenten con la misma capacidad antagónica que las cepas comerciales actualmente a la venta, de tal manera que puedan ser de utilidad en la misma región del cual fueron aisladas.

2.4.2. IMPORTANCIA

La importancia de esta investigación está orientada a la búsqueda de nuevos microorganismos antagonistas como biocontroladores que puedan inhibir el desarrollo del fitopatógeno *Lasiodiplodia sp.*

causante de pérdidas económicas en el sector agrícola. El uso de biocontroladores genera un menor gasto en su uso y contribuye a la protección del medio ambiente, ya que no elimina la microbiota autóctona del suelo a diferencia de insumos químicos utilizados. Los resultados de la presente investigación podrán ser difundidos aportando nuevos conocimientos de libre acceso a la comunidad científica, quienes se verán beneficiados y motivados a realizar más investigaciones sobre controladores biológicos y su efectividad frente a *Lasiodiplodia sp.* y otros fitopatógenos. Se dará importancia a realizar aislamientos de cultivos autóctonos del Perú, obteniendo cepas nativas; de esta manera se ayudará a promover, implementar y desarrollar nuevas estrategias de actuación frente a plagas y enfermedades con microorganismos propios de nuestro país.

2.5. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.

2.5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

2.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O.E.1. Aislar e identificar parcialmente cepas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* de diversos suelos de cultivo agrícola de la provincia de Ica y Ayacucho, agosto 2017 - enero 2018.

O.E.2. Determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

O.E.3. Determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

O.E.4. Determinar el efecto antagónico *in vitro* al combinar una cepa aislada de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

O.E.5. Determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos de efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

2.6. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.

2.6.1. HIPÓTESIS GENERAL

Trichoderma sp. y *Pseudomonas sp.* presentan efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

2.6.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

H.E.1. Las cepas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* son aisladas e identificadas parcialmente, encontrándose presentes en los suelos de cultivos agrícolas de la provincia de Ica y Ayacucho, agosto 2017 - enero 2018.

H.E.2. Las cepas de *Trichoderma sp.* presentan efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

H.E.3. Las cepas de *Pseudomonas sp.* presentan efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

H.E.4. La combinación de una cepa aislada de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* presenta efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

H.E.5. Existe diferencia significativa entre los tratamientos de efecto antagónico *in vitro* realizados frente a *Lasiodiplodia sp.*, Ica, agosto 2017 - enero 2018.

2.7. VARIABLES DE INVESTIGACIÓN.

2.7.1. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

Variable independiente: Efecto antagónico *in vitro* de cepas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.*

Variable dependiente: *Lasiodiplodia sp.*

2.7.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

| VARIABLES | DIMENSIONES | INDICADORES |
|--|---|--|
| V.1. INDEPENDIENTE Efecto antagónico <i>in vitro</i> de cepas de <i>Trichoderma sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> | D.G | I.G |
| | Determinar el efecto antagónico de <i>Trichoderma sp</i> y <i>Pseudomonas sp</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> y determinar el mejor tratamiento. | Observación macroscópica y microscópica según Barnett y Hunter (32) y Akintui et al. (46) según el manual de Bergey. Medición de inhibición de crecimiento micelial expresado en cm. |
| | D.E | I.E |
| | D.E.1. Aislar e identificar cepas de <i>Trichoderma sp.</i> y <i>Pseudomonas sp</i> entre los microorganismos presentes en los suelos de cultivos agrícolas de la provincia de Ica y Ayacucho. | I.E.1. Observación macroscópica y microscópica de <i>Trichoderma</i> según Barnett y Hunter (32) y <i>Pseudomonas</i> , por Akintui et al. (46) según el manual de Bergey. |
| | D.E.2. Determinar el efecto antagónico de <i>Trichoderma sp</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> y determinar cuál es el mejor tratamiento. | I.E.2. Medición de inhibición de crecimiento micelial expresado en cm. y análisis de varianza. |
| V.2. DEPENDIENTE <i>Lasiodiplodia sp.</i> | D.E.3. Determinar el efecto antagónico de <i>Pseudomonas sp</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> y determinar cuál es el mejor tratamiento. | I.E.3. Medición de inhibición de crecimiento micelial expresado en cm. y análisis de varianza. |
| | D.E.4. Determinar el efecto antagónico de <i>Trichoderma sp</i> y <i>Pseudomonas sp</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> | I.E.4. Medición de inhibición de crecimiento micelial expresado en cm. y análisis de varianza. |
| | H.E.5. Determinar el mejor tratamiento de efecto antagónico <i>in vitro</i> realizado frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> | I.E.5. Análisis de varianza y Comparativo de Duncan. |

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. TIPO, NIVEL Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN:

BÁSICA: Busca determinar el efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en la provincia de Ica.

3.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

DESCRIPTIVO: Los investigadores aíslan, identifican y evalúan *in vitro* si existe efecto antagónico de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en la provincia de Ica.

3.1.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

EXPERIMENTAL: Se investiga *in vitro* si existe efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* en la provincia de Ica, aplicando diferentes tratamientos.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA MATERIA DE INVESTIGACIÓN.

3.2.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Cepas nativas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* aisladas de suelos de cultivo agrícola y cepa de *Lasiodiplodia sp.* donada por la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica que fue preservada en refrigeración.

3.2.2. MUESTRA DE ESTUDIO

La muestra para el presente trabajo de investigación es universal. Es decir, se consideraron el total de cepas obtenidas descritas anteriormente.

IV. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

4.1. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

4.1.1. MATERIALES

4.1.1.1. Cepas fúngicas

- a. Cepa comercial de *Trichoderma viride* nombrada como: CCBLA103, donada de la colección de cepas del proyecto UVASANA del CITEagroindustrial Ica (Figura 1).
- b. Cepa de *Lasiodiplodia sp.* nombrada como: LS-2817, perteneciente al cepario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica (Figura 2).

4.1.1.2. Suelos de cultivos agrícolas.

4.1.2. MÉTODOS

4.1.2.1. Aislamiento e identificación parcial de cepas de *Trichoderma*

4.1.2.1.1. Aislamiento en muestras de suelo

Se colectaron 8 muestras de suelos de cultivo agrícola de Ica (vid) y Ayacucho (habas), sin antecedentes de aplicaciones de insecticidas químicos. Los datos de las muestras fueron

recogidos en las fichas de muestreo de suelo agrícola para el aislamiento de *Trichoderma sp.* (Figura 3).

En cada punto de muestreo, se realizaron excavaciones de 30 cm de profundidad cercanas a la raíz de la planta con ayuda de una pala limpia, libre de óxido y agroquímicos. El muestreo fue realizado al azar, iniciando de una esquina de la parcela y avanzando hacia la parte contraria en forma diagonal tratando de cubrir todo el campo. En total fueron 5 puntos de muestreo por cada parcela, de cada punto se obtuvieron submuestras de un volumen similar (200 g aprox.); las que fueron homogenizadas a la vez que se procedían a desmenuzar los terrones; el peso de cada bolsa muestreada fue de 1 kg en total, el cual fue rotulado según la procedencia, fecha y hora; posteriormente fueron llevadas al laboratorio para su proceso (47).

Todas las bolsas con muestras de 1 kg fueron homogenizadas y cernidas en tamices Endecotts LTD de 18 mm de apertura, de tal manera que se pudo eliminar todo residuo presente en el suelo. Se

pesó 10 g de cada muestra en envases descartables en una balanza analítica.

Dentro de la cabina de flujo laminar, se agregó la muestra de suelo de 10 g a 90 mL de caldo peptonado, obteniéndose la dilución 10^{-1} , luego, con ayuda de una micropipeta se llevó 1 mL de esta dilución a un tubo con 9 mL de caldo peptonado y así sucesivamente hasta obtener la dilución 10^{-5} . Se sembró por superficie a partir de la dilución 10^{-2} en placas Petri con medio de cultivo PDA para el crecimiento de hongos, al cual se le añadió cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias. Se colocaron las placas en una incubadora a 25°C de temperatura por 3 días (48) (Figura 4, Figura 5 a., b. y c).

Se seleccionaron colonias con características macroscópicas de *Trichoderma* para su posterior identificación.

4.1.2.1.2. Aislamiento colocando trampas de arroz

Se colectaron también 20 muestras de trampas de arroz, colocadas en suelo de cultivo de vid y en el bosque relicto de huarango del CITEagroindustrial Ica. Los datos de las muestras fueron recogidos en las fichas de muestreo de trampa de arroz en suelo

agrícola para el aislamiento de *Trichoderma sp.* (Figura 6).

Para el colocado de trampas de arroz se procedió con el siguiente protocolo:

- a. Se lavó 1,5 kg de arroz con agua corriente.
- b. Se colocó en una olla previamente desinfectada, el arroz lavado, se añadió agua en proporción 1:1, y se llevó a fuego moderado hasta la pre-cocción del arroz.
- c. Se elaboraron los envases trampa, usando vasos de plástico de ¼ kg y tela tul cortada en base a los vasos, estos fueron usados como cubierta.
- d. Se colocó el arroz pre-cocido en los envases de plástico dejando unos 5 cm de espacio para favorecer el crecimiento del micelio, paso seguido se colocó como cubierta la tela tul y se aseguraron con cinta masking tape de 1" x 40 m.
- e. Una vez listas las trampas de arroz se llevaron a campo para colocarlos en el cultivo realizando el mismo procedimiento de la toma de muestras de suelo.

f. Transcurridos 5 días, se colectaron las trampas y se llevaron al laboratorio para su proceso (49).

Se observó el crecimiento de colonias en la superficie del sustrato, sospechándose la presencia de *Trichoderma* debido a la aparición del crecimiento de algunas colonias de color blanco verdoso a verde amarillento. Con ayuda de una pinza previamente desinfectada se separaron las pequeñas porciones de colonias con características de *Trichoderma* en envases de plástico para su posterior identificación (Figura 7 y Figura 8 a., b. y c.).

4.1.2.1.3. Identificación parcial de las cepas de *Trichoderma*

Con ayuda del asa bacteriológica se tomó una asada del micelio en cuestión hacia una placa Petri con medio de cultivo PDA; se incubó por 3 días a una temperatura de 25°C (Figura 9).

Se observaron las características macroscópicas de la colonia sembrada y con ayuda de la técnica de la cinta scotch se corroboró las características microscópicas, confirmando la presencia de *Trichoderma sp.* (Figura 10). Se consideraron

como colonias de *Trichoderma* aquellas de morfología macroscópica y microscópica característica, según Barnett y Hunter (32). Se llegó a identificar sólo hasta el género (Tabla 1).

Las cepas de *Trichoderma* aisladas tanto de suelo como de trampas de arroz fueron codificadas mediante letras según género y números según lugar de muestreo.

Una vez confirmada la identificación del género se procedió a realizar el aislamiento de la cepa, tomando una parte de la colonia y sembrándola por punción en tubos con medio PDA, que se incubaron a 25°C por 5 días. Posteriormente, se refrigeraron a 9°C.

4.1.2.2. Aislamiento e identificación parcial de cepas de *Pseudomonas*

4.1.2.2.1. Aislamiento en muestras de suelo

Se colectaron 06 muestras de suelo cultivable del distrito de Ica. Los datos de las muestras fueron recogidos en las fichas de muestreo de suelo agrícola para el aislamiento de *Pseudomonas sp.* (Figura 11).

De las muestras de suelo se realizaron diluciones en caldo peptonado hasta 10^{-5} que fueron sembradas por superficie en medio de cultivo

selectivo agar Cetrimide y se incubaron a 30°C por 48 horas (Figura 4).

4.1.2.2.2. Identificación parcial de cepas de Pseudomonas

Las colonias bacterianas que crecieron en medio Cetrimide fueron sometidas a una identificación parcial utilizando coloración Gram, morfología microscópica característica, motilidad y pruebas bioquímicas: TSI, LIA, SIM, Citrato de Simmons (Figura 9). Se consideraron como cepas del género Pseudomonas aquellas que presentaron características descritas por Akintui et al. (46) según el Manual de Bergey de bacteriología sistémica (Figura 12 y Figura 13). Se llegó a identificar sólo hasta el género (Tabla 2).

Las cepas de Pseudomonas aisladas fueron codificadas mediante letras según el género y números según lugar de muestreo.

Una vez confirmada la identificación del género se procedió a realizar el aislamiento de la cepa, tomando una parte de la colonia y sembrándola por agotamiento y estría en placas Petri con medio Cetrimide, que se incubaron a 30°C por 48 horas. Posteriormente, se refrigeraron a 9°C.

4.1.2.3. Reactivación de la cepa de *Lasiodiplodia sp.*

La cepa de *Lasiodiplodia sp.*, conservada en agar PDA en refrigeración, fue sembrada por puntura en placas Petri con medio de cultivo PDA y se colocaron en la incubadora a 25°C por 7 días en oscuridad. Posteriormente, se llevaron a la cámara de cultivo Fitotron a la misma temperatura y bajo condiciones de luz por un periodo de 10 días, para estimular la formación de picnidios.

4.1.2.4. Reactivación de la cepa de *Trichoderma viride*

La cepa de *Trichoderma viride*, conservada en agar PDA a temperatura ambiente, fue sembrada por puntura en placas Petri con medio de cultivo PDA y se colocaron en la incubadora a 25°C por 7 días.

4.1.2.5. Ensayos de enfrentamiento antagónico según Bhadra et al., 2014 modificado por Navarrete y Tello, 2018

Para evaluar el enfrentamiento antagónico de las cepas aisladas de *Trichoderma* y *Pseudomonas* frente al hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia sp.* se empleó la técnica de cultivo dual para observar la inhibición de crecimiento radial que consiste en colocar un disco con el antagonista y en el extremo opuesto un disco de *Lasiodiplodia sp.*, ambos discos de 0,5 cm. y posicionados al borde de la placa Petri:

4.1.2.5.1. Enfrentamientos antagónicos de

Trichoderma sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.

Se evaluó la actividad antagónica de 6 cepas de *Trichoderma sp.* y *Lasiodiplodia sp.* obtenidas del aislamiento de suelo de cultivos y trampas de arroz. Se reactivaron las 6 cepas en placas con medio de cultivo PDA a 25°C por 7 días y se realizó el procedimiento antagónico. Para el enfrentamiento antagónico se utilizó agar PDA, se realizaron 5 repeticiones y se incubaron a 25°C por un periodo de 20 días (Figura 14, Figura 15).

Para los monitoreos, se midieron cada 24 horas los halos de crecimiento de ambos microorganismos con ayuda de una regla milimetrada (Figura 16 y Figura 17). Pasado el tiempo de monitoreo, se eligió la cepa con mejor actividad antagónica de acuerdo a los datos obtenidos del crecimiento (cm.) del antagonista (Tabla 3).

4.1.2.5.2. Enfrentamientos antagónicos de

Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.

Se evaluó la actividad antagónica de 6 cepas de *Pseudomonas sp.* obtenidas del aislamiento de suelo de cultivos. Se reactivaron las 6 cepas en placas con medio de cultivo agar Cetrimide a 30°C

por 48 horas. Para el enfrentamiento antagónico se usó el medio de cultivo PDA más medio de cultivo agar Nutritivo. Se realizaron 5 repeticiones y se incubaron por 3 días a 28°C con el fin de brindar una temperatura de crecimiento tanto a la bacteria como al hongo patógeno (Figura 14, Figura 15).

Los monitoreos fueron realizados cada 24 horas midiendo los halos de cada microorganismo con la ayuda de una regla milimetrada (Figura 16). Pasado el tiempo de monitoreo, se eligió la cepa con mejor actividad antagónica de acuerdo a los datos obtenidos del crecimiento (cm.) del antagonista (Tabla 4).

4.1.2.5.3. Enfrentamientos antagónicos conjuntos de *Trichoderma sp.* (T1) y *Pseudomonas sp.* (P2) frente a *Lasiodiplodia sp.*

Se realizaron pruebas de compatibilidad para detectar la inhibición de crecimiento entre los microorganismos antagonistas elegidos, para ello, se colocó un disco de *Trichoderma sp.* (T1) a 1 cm del borde de la placa, del lado opuesto, se colocó un disco de *Pseudomonas sp.* (P2) a 1 cm del borde la placa, se incubó a 28°C por 4 días. Posteriormente, se evidenció la compatibilidad al

observarse la ausencia del halo de inhibición entre los microorganismos antagonistas.

Luego de detectar la compatibilidad entre los antagonistas, se evaluó la actividad antagónica de las cepas ganadoras de *Trichoderma sp* (T1). y *Pseudomonas sp.* (P2) enfrentándolas en conjunto a *Lasiodiplodia sp.* Para ello se reactivaron las cepas en placas con medio de cultivo PDA para la cepa *Trichoderma sp.* (T1) a 25°C y agar Cetrimide para la cepa de *Pseudomonas sp.* (P2) a 30°C por 5 días y 48 horas respectivamente. Se realizó el enfrentamiento en cultivo dual, colocando un disco micelial del patógeno *Lasiodiplodia sp.* de 7 días de incubación y en el lado opuesto un disco de papel filtro lento de 0,5 cm de diámetro al que se adicionó 1,5 µl del antagonista fúngico (*Trichoderma sp.* a 73×10^6) y 1,5 µl del antagonista bacteriano (*Pseudomonas sp.* 11×10^8), para el control positivo se realizó el mismo procedimiento empleando 1,5 µl de la cepa comercial de *Trichoderma viride* (10×10^8).

Para las concentraciones de los antagonistas, se procedió a realizar el siguiente procedimiento:

- Para las concentraciones de los hongos antagonistas, se obtuvo una suspensión de conidias de las placas esporuladas por 7 días de las cepas: *Trichoderma sp.* (T1) elegida en el primer ensayo y la cepa comercial de *Trichoderma viride*, a las que se agregaron 1 mL de Tween 80 al 0,1% y con ayuda de la espátula de Drigalski se llevó el contenido en un tubo Falcón estéril. Se realizaron cuatro diluciones de las suspensiones, luego se procedió al conteo de conidias con ayuda de la cámara de Neubauer en 5 cuadrantes (4 cuadrantes ubicados en las esquinas y 1 en el centro) del cuadrante medio central; terminado el conteo se realizó el cálculo respectivo (Figura 18 y Figura 19).
- Para la concentración de la bacteria antagonista, se procedió a reactivar la cepa elegida de *Pseudomonas sp.* (P2) del segundo ensayo y se llevó una asada a un tubo con caldo nutritivo, posteriormente, se incubó a 30°C por 48 horas. Trascurrido el tiempo de incubación se realizaron 4 diluciones en solución salina fisiológica, se realizó el conteo en la cámara de

Neubauer con la misma metodología usada en para el conteo de conidias y UFC se realizó el cálculo respectivo.

Para hallar la concentración de los antagonistas se utilizó la fórmula del recuento directo de conidias (6):

$$\text{N}^\circ \text{ conidias o UFC/mL} = \bar{x} \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot \text{ID}$$

Donde:

5= N° de cuadrados contados en el cuadrante central.

\bar{x} = Promedio de conidias contadas.

ID= Inversa de la dilución empleada.

Se realizaron 5 repeticiones de cada tratamiento, los que fueron incubados a 28°C por un periodo de 20 días para los tratamientos 1, 2, C- y C+, y 2 días para el tratamiento 3 (Figura 15, Figura 18).

Los monitoreos se realizaron cada 24 horas, midiendo los halos de crecimiento del tratamiento como del fitopatógeno con ayuda de una regla milimetrada (Tabla 5, Figura 16, Figura 20 y Figura 21).

4.2. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

4.2.1. Fichas de toma de muestras

En la fase de campo los datos de las muestras fueron recogidos en las fichas de muestreo de suelo agrícola para el aislamiento de *Trichoderma sp.* (Figura 3), fichas de muestreo de trampas de arroz para el aislamiento de *Trichoderma sp.* (Figura 6) y fichas de muestreo de suelo agrícola para el aislamiento de *Pseudomonas sp.* (Figura 11).

4.2.2. Diseño experimental – Técnica de cultivos duales

En fase de laboratorio para la recolección de datos de los enfrentamientos se utilizaron los diseños experimentales, en base a la técnica de cultivos duales de los siguientes tratamientos y repeticiones descritos a continuación:

Para el ensayo del enfrentamiento de *Trichoderma* frente a *Lasiodiplodia sp.* se realizaron 6 tratamientos, cada uno con 5 repeticiones.

| TRATAMIENTO | CLAVE | DESCRIPCIÓN |
|---------------|-------|--|
| Tratamiento 1 | T1 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> 1 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 2 | T2 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> 2 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 3 | T3 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> 3 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 4 | T4 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> 4 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |

| | | |
|-------------------------|----|--|
| Tratamiento 5 | T5 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> 5 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 6 | T6 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> 6 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Control negativo | C- | Cepa de <i>Lasiodiplodia sp.</i> Cepas de <i>Trichoderma sp.</i> 1, 2, 3, 4, 5 y 6. |

Para el ensayo del enfrentamiento de *Pseudomonas* frente a *Lasiodiplodia sp.* se realizaron 6 tratamientos, cada uno con 5 repeticiones.

| TRATAMIENTO | CLAVE | DESCRIPCIÓN |
|-------------------------|--------------|--|
| Tratamiento 1 | P1 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> 1 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 2 | P2 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> 2 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 3 | P3 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> 3 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 4 | P4 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> 4 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 5 | P5 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> 5 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 6 | P6 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> 6 frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Control negativo | C- | Cepa de <i>Lasiodiplodia sp.</i> Cepas de <i>Pseudomonas sp.</i> 1, 2, 3, 4, 5 y 6. |

Para el ensayo del enfrentamiento de *Trichoderma sp* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* se realizaron 3 tratamientos, cada uno con 5 repeticiones.

| TRATAMIENTO | CLAVE | DESCRIPCIÓN |
|--------------------------|-------|---|
| Tratamiento 1* | T1P2 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> seleccionadas frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> (colocadas en disco). |
| Tratamiento 2* | T1 | Cepa de <i>Trichoderma sp.</i> seleccionada frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Tratamiento 3** | P2 | Cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> seleccionada frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |
| Control negativo | C- | Cepa de <i>Lasiodiplodia sp.*</i> Cepa de <i>Trichoderma viride*</i> Cepa de <i>Trichoderma sp.*</i> Cepa de <i>Pseudomonas sp.**</i> Cepa combinada <i>Trichoderma sp.*</i> más <i>Pseudomonas sp.*</i> (colocadas en el disco). |
| Control positivo* | C+ | Cepa de <i>Trichoderma viride</i> frente a <i>Lasiodiplodia sp.</i> |

*Tratamientos incubados a 28°C por 20 días.

** Tratamiento incubado a 28°C por 48 horas.

4.3. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE DATOS, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

4.3.1. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE DATOS

Se organizaron los datos obtenidos de Inhibición de crecimiento radial micelial en cm. de cada una de las 6 cepas aisladas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* respectivamente para poder elegir la mejor cepa de acuerdo a los siguientes criterios de los investigadores:

- Mayor medida de Inhibición de crecimiento radial micelial en cm.
- Mejores características de crecimiento.

Los datos obtenidos se ingresaron a una tabla de doble entrada en Microsoft Excel considerando los tratamientos y repeticiones de cada ensayo.

| | REPETICIONES | | | | |
|---------------|--------------|---|---|---|---|
| TRATAMIENTO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Tratamiento 1 | | | | | |
| Tratamiento 2 | | | | | |
| ... | | | | | |
| C | | | | | |

4.3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el software estadístico InfoStat para determinar la distribución normal, análisis de varianza y la comparación de medias de Duncan.

V. PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. PRESENTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Tabla 1. Aislamiento e identificación parcial de cepas de *Trichoderma sp.* a partir de muestras de suelo y trampas de arroz en cultivos de las provincias de Ica y Puquio.

| GÉNERO | Cepa | Muestra | Procedencia | Características macroscópicas | Características microscópicas |
|-------------|------|---|-------------------|--|---|
| Trichoderma | T1 | Suelo de cultivo de vid | San Juan Bautista | Colonias algodonosas de color blanco verdoso y tonalidades amarillas formando anillos concéntricos, revés incoloro. De fácil y rápido crecimiento. | Conidióforos hialinos, muy ramificado, no verticilado, fiálides |
| | T2 | Suelo de cultivo de vid | San Juan Bautista | | unitarias o en grupos, conidia (fialospora) |
| | T3 | Suelo de cultivo de vid | Ocucaje | | hialina, con formas |
| | T4 | Trampa de arroz de cultivo de vid | Ica | | ovoides que nacen en |
| | T5 | Trampa de arroz de bosque relicto de huarango | Ica | | pequeños grupos |
| | T6 | Suelo de cultivo de haba | Puquio | | terminales. |

Tabla 2. Aislamiento e identificación parcial de cepas de *Pseudomonas sp.* a partir de muestras de suelo cultivable del distrito de Ica.

| GÉNERO | Cepa | Muestra | Procedencia | Características macroscópicas | Características microscópicas | TSI | LIA | SIM | Citrato de Simmons |
|-------------|------|-----------------------------|-------------|---|--|---------|---------|-----|--------------------|
| Pseudomonas | P1 | Suelo de cultivo de plátano | Ica | | | K/K/-/- | K/K/-/- | + | + |
| | P2 | Suelo de cultivo de vid | Ica | En medio selectivo | | K/K/-/- | K/K/-/- | + | + |
| | P3 | Suelo de cultivo de higuera | Ica | Agar Cetrimide las colonias se presentan de color verde cremoso con bordes irregulares. | Bacilos Gram negativos, con gran motilidad en preparado en fresco. | K/K/-/- | K/K/-/- | + | + |
| | P4 | Suelo de cultivo de vid | Ocucaje | | | K/K/-/- | K/K/-/- | + | + |
| | P5 | Suelo de cultivo de noni | Ica | | | K/K/-/- | K/K/-/- | + | + |
| | P6 | Suelo de chirimoya | Ica | | | K/K/-/- | K/K/-/- | + | + |

Tabla 3. Prueba comparativa de Duncan de las medias de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* y *Lasiodiplodia sp.*, primer ensayo.

| TRATAMIENTO Trichoderma | Medias de crecimiento radial de <i>Trichoderma sp.</i> (cm) | Medias de crecimiento radial de <i>Lasiodiplodia sp.</i> (cm)⁽¹⁾ |
|------------------------------------|--|--|
| T1 | 2,28 | 5,10 A |
| T2 | 2,02 | 4,70 A |
| T3 | 2,04 | 4,60 A |
| T4 | 2,18 | 4,88 A |
| T5 | 2,10 | 4,80 A |
| T6 | 1,62 | 5,46 A |
| C- | - | 9,00 B |

⁽¹⁾ P valor < 0,0001

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$)

Tabla 4. Prueba comparativa de Duncan de las medias de crecimiento radial de las cepas de *Pseudomonas* y *Lasiodiplodia sp.*, segundo ensayo.

| TRATAMIENTO Pseudomonas | Medias de crecimiento radial de <i>Pseudomonas sp.</i> (cm) | Medias de crecimiento radial de <i>Lasiodiplodia sp.</i> (cm)⁽¹⁾ |
|------------------------------------|--|--|
| P1 | 0,64 | 5,50 A |
| P2 | 0,41 | 4,80 A |
| P3 | 0,52 | 5,22 A |
| P4 | 0,42 | 5,28 A |
| P5 | 0,54 | 5,34 A |
| P6 | 0,72 | 5,34 A |
| C- | - | 7,00 B |

⁽¹⁾ P valor < 0,0001

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$)

Tabla 5. Prueba comparativa de Duncan de las medias de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma sp.* (T1) más *Pseudomonas sp.* (P2) (T1P2), *Trichoderma sp.* (T1), *Pseudomonas sp.* (P2) y *Trichoderma viride* (C+), tercer ensayo.

| TRATAMIENTO | Medias de crecimiento radial | Medias de crecimiento radial |
|-------------|------------------------------|---|
| | de antagonistas (cm) | de <i>Lasiodiplodia sp.</i> (cm) ⁽¹⁾ |
| T1P2 | 1,82 | 5,18 B |
| T1 | 2,08 | 4,86 A B |
| P2 | 0,34 | 8,00 C |
| C+ | 2,79 | 4,56 A |
| C- | - | 9,00 D |

⁽¹⁾ P valor < 0,0001

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,01$)

5.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De todas las muestras obtenidas procedentes de suelos de cultivo agrícola y trampas de arroz, se pudieron aislar e identificar 6 cepas pertenecientes al género *Trichoderma* de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas según Barnett y Hunter (32) y de las muestras obtenidas procedentes de suelos de cultivo agrícola, se pudieron aislar e identificar 6 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* según las características macroscópicas y microscópicas descritas por Akintui et al. (46) según el Manual de Bergey de bacteriología sistémica, mostrando que, ambos microorganismos fueron exitosamente aislados en los diferentes cultivos procesados, esto afirma que las cepas de *Trichoderma* y *Pseudomonas*, se

encuentran comúnmente presentes en los suelos en forma nativa. Martínez et al. (1), mencionan que, las especies de *Trichoderma*, habitan en casi todos los suelos agrícolas por su crecimiento rápido, debido a la abundante producción de conidias y una extensa cantidad de enzimas, encontrándose especialmente en aquellos suelos que presentan materia orgánica y desechos vegetales en descomposición. Así también Bhattacharyya y Jha (50), afirman que se ha encontrado al género *Pseudomonas* como una de las bacterias colonizadoras de la rizosfera más ampliamente estudiadas, actuando como promotor de crecimiento celular para las plantas.

Al evaluar las diferentes cepas de *Trichoderma* a los 20 días de crecimiento, se determina que existe efecto antagónico de las 6 cepas aisladas de suelos de cultivo y trampas de arroz de acuerdo al *P* valor obtenido estadísticamente mediante el análisis de varianza, sin embargo, la prueba comparativa de Duncan indica que no existe diferencia significativa entre ellas.

Se observó que 5 cepas esporularon sobre su competidor *Lasioidiplodia*, siendo la cepa T1 la que mostró un mayor efecto inhibitorio con 2,28 cm de crecimiento radial sobre *Lasioidiplodia sp.* (Tabla 3) y que desarrolló esporulación en mayor área sobre la colonia del fitopatógeno; fue la que mostró comportamiento morfológico resaltante al crecer sobre *Lasioidiplodia sp.*, degradando lentamente a su competidor, sin embargo, la cepa T6 no mostró esporulación sobre el fitopatógeno.

Trichoderma tiene la particularidad de competir frente a patógenos por recursos limitados, como nutrientes y espacios, adicionalmente a ello realizan la producción de sideróforos que funcionan como elementos biostáticos. La cepa

T1 fue obtenida de suelo de cultivo cuya parcela no recibió tratamiento químico meses anteriores, además de estar rodeada de flora acompañante que pudo proporcionar un mejor desarrollo a esta cepa para ejercer un mayor control frente al fitopatógeno. Los datos resultantes obtenidos de la cepa T1 se asemeja a lo obtenido por Supanta et al. (21), quienes reportaron un crecimiento radial de *Lasiodiplodia theobromae* de 4,58 cm bajo actividad antagónica de la cepa *Trichoderma spp.*, mostrando así efecto antagónico. Adicionalmente, reportaron la competencia por espacio y nutrientes ejercida por *Trichoderma spp.*, sin embargo, no mencionan la producción de esporas sobre su competidor, lo que sí fue evidenciado en la presente investigación.

La Tabla 3 muestra un rango de crecimiento radial entre 4,60 cm y 5,46 cm en las cepas de *Lasiodiplodia sp.* bajo actividad antagónica de las cepas T3 y T6 respectivamente, siendo la cepa T6 la que obtuvo un menor crecimiento radial. Esto se podría explicar debido a que un gran porcentaje de especies de *Trichoderma* son eficaces en inhibir el crecimiento de diversos fitopatógenos, Ordoñez (48) citado por Rodríguez y Veneros (18), señalan que “*T. harzianum* produce sustancias como trichodermina, dermina, sesquiterpeno, suzukacilia, alamethicina, rochotoxina y acetaldehído, todas con propiedades antifúngicas y antibacteriales; así como, las enzimas β -1-3 glucanasas, quitinasas y celulasa, las cuales facilitan la habilidad del antagonista para atacar un amplio rango de fitopatógenos, ejerciendo su efecto sobre las paredes celulares”. Gracias a estos componentes todas las cepas aisladas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Lasiodiplodia sp.* Con respecto al rango de crecimiento, se encontraron resultados similares en el trabajo presentado por Latha et al. (15), quienes

probaron la eficacia de diferentes aislados de *Trichoderma*, siendo la cepa Tv1, la que mostró mejor resultado con 3,22 cm de crecimiento radial de *Lasiodiplodia theobromae*. Por el contrario, el rango menor de eficacia la obtuvo Tv-Co con crecimiento radial de 6,28 cm de *Lasiodiplodia theobromae*, evidenciando que el rango de eficacia de las cepas aisladas en la presente investigación, están dentro de los resultados de los autores mencionados.

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo (Tabla 4) determinaron que las cepas de *Pseudomonas* aisladas en el presente trabajo mostraron efecto antagónico sobre el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia sp.*, tal como muestra la cepa P2 que obtuvo 0,41 cm. sobre el fitopatógeno; de acuerdo al *P* valor obtenido del análisis de varianzas, sin embargo, la prueba comparativa de Duncan mostró que las cepas no tienen diferencia significativa entre sí.

El efecto antagónico observado fue posiblemente por medio de la producción de sideróforos. Esto se vio contrastado al comparar los resultados obtenidos con Latha et al. (15), que aislaron cepas de *Pseudomonas fluorescens*, las cuales, mostraron un efecto antagónico superior a las cepas evaluadas con crecimiento radial de *Lasiodiplodia theobromae* en rangos de 4,2 cm a 7,2 cm.

Los *P* valor obtenidos del análisis de varianzas del tercer ensayo (Tabla 5) indican que existe efecto antagónico en todos los tratamientos probados y el comparativo de Duncan indicó que sí existe diferencia significativa entre los tratamientos *Trichoderma sp.* (T1) más *Pseudomonas sp.* (P2) (T1P2), *Pseudomonas sp.* (P2) y la cepa comercial *Trichoderma viride*, sin embargo, la cepa T1 es estadísticamente igual de efectiva que la cepa comercial *Trichoderma viride*.

Se observa crecimiento radial de 4,86 cm, 5,18 cm y 4,56 cm en *Lasiodiplodia sp.* para los tratamientos con T1, T1P2 y el control positivo (C+) respectivamente. En la investigación realizada por Latha et al. (15), combinaron 2 agentes de biocontrol compuestos por: *T. viride*, *P. fluorescens*, enmiendas orgánicas y micronutrientes. Mostraron un crecimiento radial de 6,72 cm en *Lasiodiplodia theobromae*. Lo cual, evidencia que mezclar dos agentes de biocontrol, disminuyen la efectividad antagónica, como en el caso de las cepas de Trichoderma y Pseudomonas.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

6.1. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS GENERAL

Se aislaron cepas de *Trichoderma* y *Pseudomonas* de suelos de cultivo agrícola, todas con actividad antagónica frente a *Lasiodiplodia sp.*, en Ica, agosto 2017 - enero 2018, por tanto, se corrobora y acepta el enunciado de la hipótesis general indicada en la sección 2.6.1. de acuerdo al análisis de varianza.

6.2. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

6.2.1. H.E.1. Se aislaron e identificaron parcialmente cepas de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* de diversos suelos de cultivo agrícola, según el manual de Barnett y Hunter (32) y Akintui et al. (46) según el Manual de Bergey, por lo que la hipótesis específica 1 es aceptada.

6.2.2. H.E.2. Se determina que las cepas aisladas de *Trichoderma sp.* presentan efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.* de acuerdo al análisis de varianza.

6.2.3. H.E.3. Se determina que las cepas aisladas de *Pseudomonas sp.* presentan efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.* de acuerdo al análisis de varianza.

6.2.4. H.E.4. Se demuestra que la combinación *in vitro* de una cepa aislada de *Trichoderma sp.* (T1) más *Pseudomonas sp.* (P2) presenta efecto antagónico frente a *Lasiodiplodia sp.*, de acuerdo al análisis de varianza.

6.2.5. Se demuestra que la cepa aislada de *Trichoderma sp.* (T1) presenta el mismo efecto antagónico *in vitro* frente a *Lasiodiplodia sp.*, que la cepa comercial *Trichoderma viride* de acuerdo al comparativo de Duncan.

CONCLUSIONES

1. Se aislaron 6 cepas de *Trichoderma* y 6 cepas de *Pseudomonas* procedentes de suelos de cultivo agrícola.
2. De las 6 cepas aisladas de *Trichoderma* de los diferentes suelos de cultivo, se determina que todas presentan efecto antagónico, siendo la cepa T1 la que mostró mayor actividad antagónica frente al hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia sp.* mediante el análisis de varianza, sin embargo, entre las cepas no hay diferencia significativa.
3. Las 6 cepas de *Pseudomonas* evaluadas mostraron efecto antagónico frente al hongo *Lasiodiplodia sp.* mediante el análisis de varianza, sin embargo, entre las cepas no hay diferencia significativa.
4. Los tratamientos *Trichoderma sp.* (T1) más *Pseudomonas sp.* (P2) (T1P2), *Trichoderma sp.* (T1), *Pseudomonas sp.* (P2) y *Trichoderma viride* presentan efecto antagónico frente *Lasiodiplodia sp.* y se observa diferencia significativa entre los tratamientos, teniendo mejor efecto antagónico la cepa *Trichoderma sp.* (T1) y *Trichoderma viride*.

RECOMENDACIONES

1. Continuar con la investigación de la cepa de *Trichoderma sp.* (T1) para identificar la especie.
2. Evaluar la efectividad *in vitro* de *Trichoderma sp.* (T1) frente a otros hongos fitopatógenos.
3. Evaluar la efectividad *in vivo* de *Trichoderma sp.* (T1) frente a *Lasiodiplodia sp.* y otros hongos fitopatógenos.
4. Evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma viride* (comercial) más *Trichoderma sp.* (T1) frente a *Lasiodiplodia sp.* y otros hongos fitopatógenos *in vitro* e *in vivo*.
5. Evaluar la cepa de *Pseudomonas sp.* (P2) como promotor de crecimiento celular.

FUENTES DE INFORMACIÓN

LIBROS

2. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. (5ª ed). Edit, ElSevier Academic Press.
32. Barnett, H. y Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. (4ª ed). Edit, The American Phytopathological Society.
37. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (1998). *Brock biología de los microorganismos*. (8ª ed). Edit, Prentice Hall.

REVISTAS

3. Arcila, C y Ariza, S. (2012). *Red de Monitoreo y Seguimiento de Plagas y Enfermedades*, Boletín N°2.
7. INFANTE D, MARTÍNEZ B, GONZÁLES N, REYES Y. Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*. 2009; 24(1): p. 14-21.
9. Matthijs, S., Tehrani, K., Laus, G., Jackson, R., Cooper, R. y Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a Pseudomonas siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. *Revista Environmental Microbiology*, 9(2), 425-434.
10. Alves, A., Crous, P., Correia, A., y Phillips, A. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Revista*

Fungal Diversity, 28(1), 1-13.

12. Priya, K. y Nagaveni, H. (2009). Screening of *Trichoderma spp.* against *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Elaeocarpus munronii*. *Revista Indian Journal of Plant Protection*, 37(1/2), 166-169.
14. Coelho, I., Tremacoldi, C., Boari, A. y Pantoja, K. (2011). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma sp.* a *Lasiodiplodia sp.* e *Fusarium sp.* patogênicos ao dendê (*Elaeis guineensis Mart.*) variedade tenera. 44^o Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Red de repositorios latinoamericanos.
15. Latha, P., Anand, T., Prakasama, V., Jonathan, E., Paramathma, M. y Samiyappan, R. (2011). Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Revista Applied Soil Ecology*. 49, 215-223.
17. Bhadra, M., Khair, A., Hossain, A. y Sikder, M. (2014). Efficacy of *Trichoderma spp.* and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. Bangladesh. *Revista Journal of Scientific and Industrial Research*, 49(2), 125-130.
18. Rodriguez, M. y Veneros, R. (2011). Control biológico de *Trichoderma harzianum* RIFAI sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de zonas de distribución del distrito Trujillo (Perú). *Revista REBIOL*, 31(2), 1-9.

21. Supanta, L., Palma, K., Risco, A. (2017). Pruebas de eficacia de fungicidas químicos y un biológico para el control de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.). Lima, Perú.
23. Mohali, S., Burges, T. y Wingfield, M. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Revista Forest Pathology*, 35(6), 385-396.
24. Savant, N. y Raut, S. (2000). Studies on symptomatology of dieback of mango stone grafts. *Revista Acta Horticulturae*, 509, 823-832.
26. Katan, J. (2017). Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. *Revista Journal of Plant Pathology*, 99(2), 305-315.
27. O'Brien, P. (2017). Biological control of plant diseases. *Revista Australasian Plant Pathology*, 46, 293-304.
28. Marín, A., Atarés, L., y Chiralt, A. (2017). Improving function of biocontrol agents incorporated in antifungal fruit coatings. *Revista Biocontrol Science and Technology*, 27(10), 1220-1241.
29. Sharma, R., Singh, D. y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists. *Revista Biological Control*, 50: 205-221.
33. Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant disease*. *Revista Plant Disease* 87(1), 4-10.

35. Foster, A. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of this conservation amongst species. *Revista Journal of applied Microbiology*, 91(2), 364-372.
36. Hernández, A., Bautista, S., Velázquez, M. y Hernández, A. (2006). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 66-74.
38. Pérez, S., Coto, O., Echemandía, M. y Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula ¿control biológico o patógeno?. *Revista Protección Vegetal*, 30(3), 225-234.
39. Lalucat, M. y Garcia, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the Mulet *Pseudomonas* species. *Revista Environ Microbiology*, 12(6), 1513-1530.
41. Feichtmayer, J., Deng, L. y Griebel, C. 2017. Antagonistic Microbial Interactions: Contributions and Potential Applications for Controlling Pathogens in the Aquatic Systems. *Revista Frontiers in Microbiology*.
43. Gobernado, M., López-Hontangas, J. 2003. Identificación bacteriana. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(S1), 54-60.
44. De Costa, D. y Erabadupitiya, H. (2005). An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Revista Postharvest Biology and Technology*, 36, 31-39.
45. Wisniewski, M. y Wilson, C. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: Recent advances. *Revista HortScience*, 27(2),94-98.

46. Akintui, M., Alcántara, H., Alva, A., Castillo, H., Huayán, J. y Llenque L. (2015). *Pseudomonas fluorescens* de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético. *Revista Reviolest*, 3(2).
49. Ávila, C., Goretti, M. y Lizcano, R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma sp.*, en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*, 1(1), 15–20.
50. Bhattacharyya, P. y Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *Revista World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
51. Alama, I., Maldonado, E. y Rodríguez-Gálvez E. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* afectando al cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Revista Universalia*, 11(2), 4-13.
52. Alemán, I., Sánchez, J., Sealey, M., Otoniel, J. y López, G. (2003). Empleo de una cepa de *Burkholderia cepacia* en el control de la mancha azul en la madera de pino caribe (*Pinus caribae*). *Revista Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences at La Universidad del Zulia*, 11(1), 4-13.
53. Arias, C. y Piñeros, E. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde [Tesis de Pre grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional - Pontificia Universidad Javeriana.

54. Badii, M. y Abreú, J. (2006). Control biológico: una forma sustentable de control de plagas. *Revista Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89.
55. Fernández, R. y Suárez, C. (2009). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio Zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*, 62(1), 4743-4748.
56. Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*, 24 (1), 14-21.
57. Juárez, G., Sosa, M., López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Revista Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 4(2), 14-23.
58. Leucona, R. (1996). *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*. Edit, Buenos Aires: R.L.Leucona.
59. Luo, Y., Zeng, K. y Ming, J. (2012). Control of blue and green mold decay of citrus fruit by *Pichia membranefaciens* and induction of defense responses. *Revista Scientia Horti*, 135, 120-127.
60. Moffiat, A. (2001). Finding new ways to fight plant diseases. *Revista Science*.

292, 2270-2273.

61. Muñoz, V., Cisterna, V. y France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos*. Boletín INIA N° 428, 77-91.
62. Ordoñez, V. (2000). Producción de enzimas microbianas y sus aplicaciones en la industria. *II Congreso internacional de Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana*.
63. Pal, K. y McSpadden-Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *Revista The Plant Health Instructor*.
64. Pandey, D., Tripatti, N., Tripatti, R. y Dixit, S. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oils of *Hyptis suaveolens*. *Revista Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89(6), 344-349.
65. Sociedad Española de Microbiología. (2014). Clave dicotómica para la identificación de hongos aislados sistemáticamente en ambientes mediterráneos. *Revista SEM@foro Revista de la Sociedad Española De Microbiología* 57: 70-71.
66. Zhou, Y., Ming, J., Deng, L., y Zeng, K. (2014). Effect of *Pichia membranaefaciens* in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits. *Revista Biological Control*, 74: 21-29.
67. Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* Y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.

BOLETINES

47. Buduba, C. (2004). Muestreo de suelos. Criterios básicos. *Revista Patagonia Forestal*, 10(1), 9-12.

MONT R. El desarrollo de la Fitopatología en el Perú: Reseña Histórica. 2011.

TESIS

13. Plata, J. (2010). Aislamiento y evaluación *in vitro* del efecto de *Trichoderma spp.* nativas sobre los hongos patógenos de la madera de vid aislados en la región vitivinícola de Ensenada, Baja California. [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)]. Repositorio Institucional – CICESE.
16. Nieblas, N. (2012). Evaluación del potencial de *Trichoderma sp.* y *Glomus intraradices* para controlar a *Lasiodiplodia theobromae*, uno de los agentes causales de la muerte regresiva por Botriosferia en vid (*Vitis vinifera* L.). [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)]. Repositorio Institucional - CICESE.
19. Vite, J. (2012). Efecto *in vitro* de *Trichoderma viride* nativa sobre *Lasiodiplodia theobromae* aislado de *Persea americana* “palto”. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio Institucional - Universidad Nacional de Trujillo.

20. Gamarra, J. (2015). Biocontrol de hongos manchadores en la madera de *Brosimum alicastrum*. [Tesis de Pregrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio Institucional - Universidad Nacional Agraria La Molina.
25. Hanna, E. (2016). Actividad biológica de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de mango de exportación frente a inductores florales y fungicidas en condiciones de laboratorio. [Tesis de Pregrado, Universidad de Guayaquil]. Repositorio Institucional - Universidad de Guayaquil.
34. De La Cruz, A. (2014). Caracterización de bacterias antagonistas en el control de hongos fitopatógenos *in vitro*. [Tesis de Pregrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio Institucional - Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (CID-UAAAN).
68. De La Cruz, N., Machachuay L. Efectividad de *Trichoderma harzianum* y *Verticillium chlamydosporium* en el control de *Meloidogyne incognita* Ch. en *Punica granatum* L. en el valle de Ica. Ica, Perú.
69. Garrido, C. (2016). Evaluación de la actividad micoparasítica de 15 cepas de *Trichoderma spp.* frente a *Rhizoctonia solani*, utilizando frejol caupí (*Vigna unguiculata*) en laboratorio. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio Institucional - Universidad Nacional de Trujillo.

MANUALES

6. Gómez, H., Soberanis, W. y Tenorio, M. (2016). Manual de producción y uso de hongos antagonistas. *Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú, SENASA*.
11. Huamán, R. (2015). Etiología y control de la pudrición del tallo de la vid, en la localidad de Chincha-Ica. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Agraria la Molina]. Repositorio Institucional - Universidad Nacional Agraria la Molina.
22. Urbina, M. (2011). Introducción a la fitopatología, fitopatología general. *Universidad agropecuaria del trópico seco*.
30. Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M. y Torres, E. 2013. Manual de Producción y Uso de Hongos Antagonistas. Lima, Perú: SENASA, Laboratorio de Antagonistas SCB.
31. Arango, M., Ordoñez, N., Castañeda, E. y Restrepo, A. (1988). Manual hongos contaminantes del laboratorio. *Instituto Nacional de Salud*.
42. Sánchez, P., (2018). Manual de Prácticas. Fitopatología (AEJ-1028). *Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de la Zona Maya*.
48. Guillermo, J. (2011). Manual de Fitopatología de la Facultad de Ciencias. *Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica*.
70. Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Organismo de Investigación Centro Internacional de la Papa (CIP)*.

71. De La Garza, G. Fitopatología General. Marín Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nueva León.
72. Peña, R. y Páez, J. (2019). Fitopatología. Universidad Pedagógica Tecnológica de Colombia.
73. URBINA C. Enfermedades causadas por hongos, fitopatología general. Estelí, Nicaragua: Universidad agropecuaria del trópico seco.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS O DE INTERNET

1. Martínez, P. (09 de julio de 2018). *Manejo de Lasiodiplodia theobromae y otros hongos de madera con Atlante Plus (Ácido Salicílico y Fosfonato de potasio) en el cultivo del palto.* Redagrícola. Disponible en: <http://www.redagricola.com/pe/manejo-lasiodiplodia-theobromae-otros-hongos-madera-atlante-plus-acido-salicilico-fosfonato-potacio-cultivo-del-palto/>
4. Gamarra, A. (03 de julio de 2017). *Lasiodiplodia en mango.* Disponible en: <https://es.slideshare.net/PMD12/lasiodiplodia>.
5. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). (03 de julio de 2018). Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa>.
8. Contreras, R. (06 de julio de 2017). *El género Pseudomonas, las bacterias para todo.* La guía de Biología. Disponible en: <http://biologia.laguia2000.com/microbiologia/elgeneropseudomonas-las-bacterias-para-todo#ixzz4m47cJMAX>.

40. Gemyni A. 2013. [En línea] [Citado: 23 de Junio de 2021]. Disponible en:
<https://es.slideshare.net/axeldaza/aislamiento-bacteriano>
74. Asociación De Exportadores (ADEX). (9 de octubre de 2018). *Exportación de palta sigue en crecimiento*. Disponible en:
<http://www.adexperu.org.pe/prensa/notas-de-prensa/item/1374-exportacion-depalta-peruana-sigue-en-crecimiento>
75. Centro de Investigación y Promoción Popular - CENDIPP. (2012). *Curso de Calificación Técnica, módulo: Control de Plagas y Enfermedades de la Vid*. Proyecto “Fortalecimiento de capacidades productivas, asociativas, de gestión y articulación de pequeños/as productores/as de uva en los distritos de Ocucaje, Los Aquijes y Pueblo Nuevo, provincia y región Ica Perú.
76. EROSKU CONSUMER. (10 de enero de 2018). *Frutas. Guía práctica de frutas. Uva: Propiedades*. Disponible en: <http://frutas.consumer.es/uva/propiedades>.
77. ECYT-AR. (23 de junio de 2018). *Rizobacteria*. La Enciclopedia de Ciencias y Tecnologías en Argentina. Disponible en: <https://cyt-ar.com.ar/cyt-ar/index.php/Rizobacteria>
78. REDAGRÍCOLA. [En línea] [Citado: 23 de Junio de 2021]. Disponible en:
<https://www.redagricola.com/pe/memoria-descriptiva-lasiodiplodia-sp/>.

ANEXOS

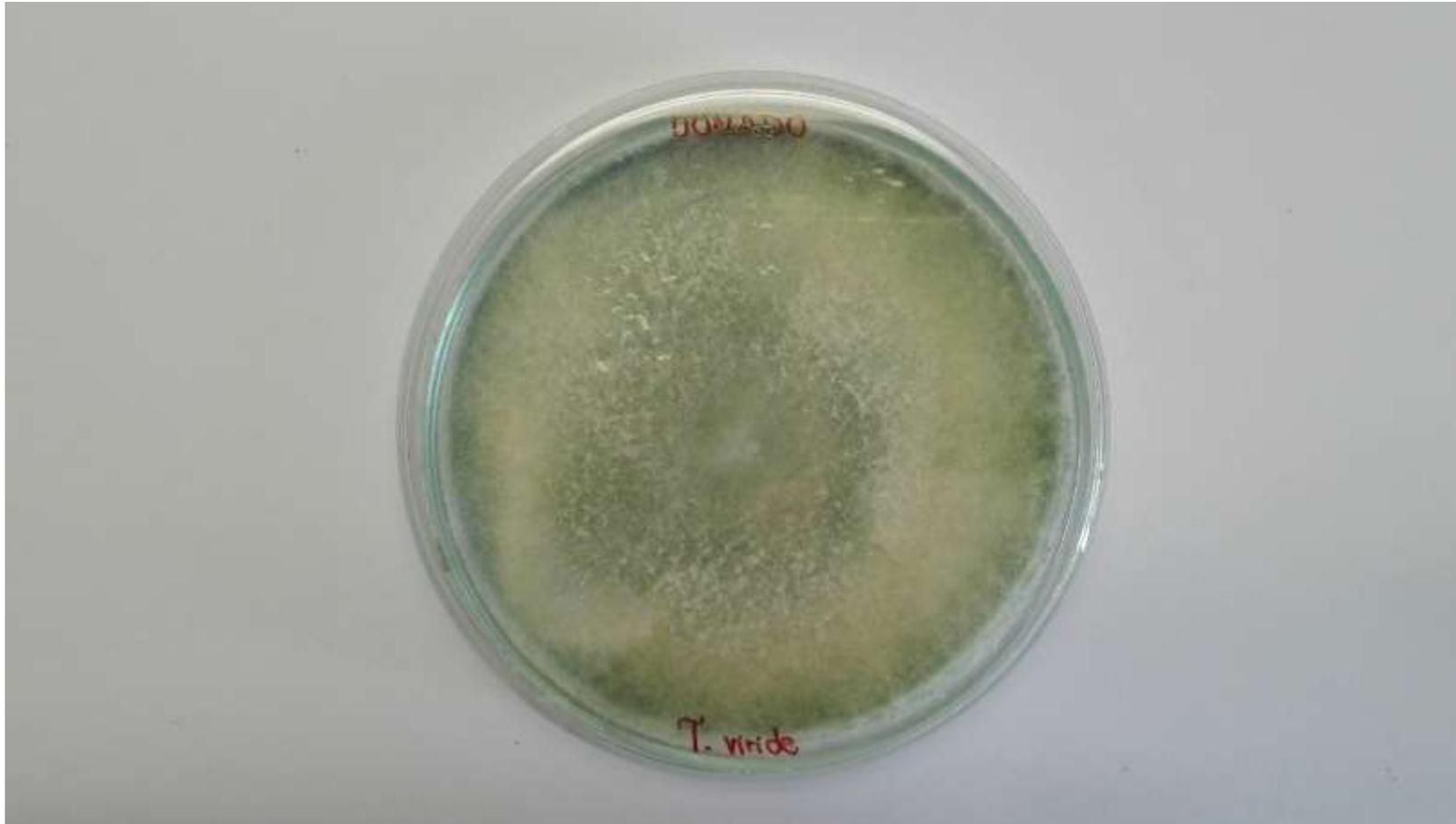


Figura 1. Cepa comercial de *Trichoderma viride* (CCBLA103): Característica macroscópicas.

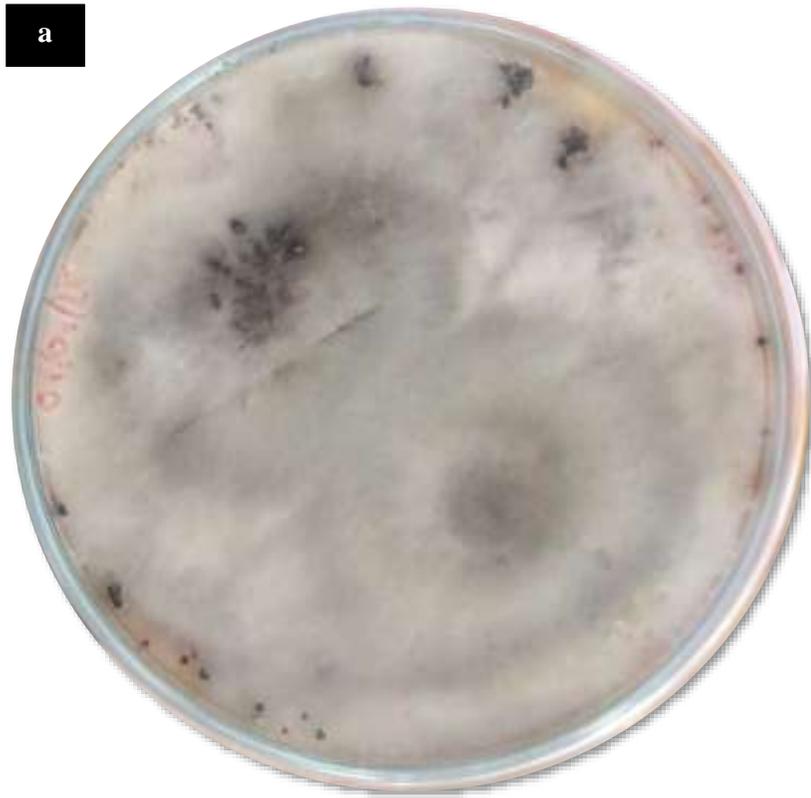


Figura 2. Cepa de *Lasiodiplodia sp.* (LS-2817): **a.** Característica macroscópica, **b.** Característica microscópica 400x.

FICHA N° 01

**TOMA DE MUESTRA DE SUELO AGRÍCOLA PARA EL AISLAMIENTO DE
*Trichoderma sp.***

DATOS RECOLECTADOS

MUESTRA N°

FECHA DE MUESTREO:

DEPARTAMENTO:

DISTRITO:

LUGAR:

TIPO DE CULTIVO:

NOMBRE DEL MUESTREADOR:

OBSERVACIONES ADICIONALES:

Figura 3. Ficha de toma de muestra de suelo agrícola para el aislamiento de *Trichoderma sp.*

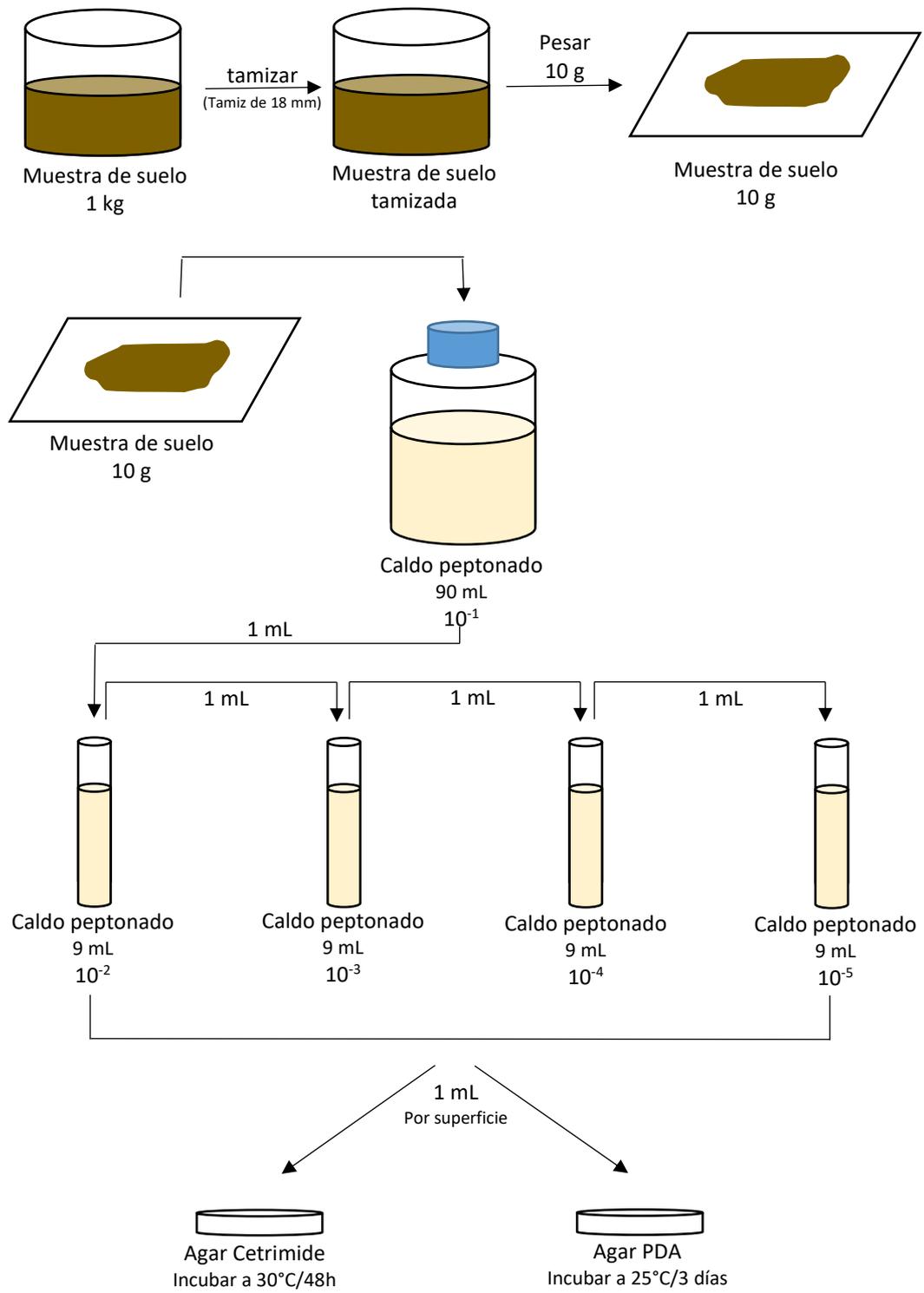


Figura 4. Flujograma para el aislamiento de microorganismos antagonistas de muestra de suelo.



Figura 5. Toma de muestra de suelo

- a.** Muestras de suelo en bolsas, **b.** Cernido de suelo en tamiz,
c. Suelo cernido

FICHA N° 03

**TOMA DE MUESTRA DE TRAMPA DE ARROZ EN SUELO AGRÍCOLA PARA
EL AISLAMIENTO DE *Trichoderma sp.***

DATOS RECOLECTADOS

MUESTRA N°.....

FECHA DE MUESTREO:

DEPARTAMENTO:

DISTRITO:

LUGAR:

TIPO DE CULTIVO:

NOMBRE DEL MUESTREADOR:

OBSERVACIONES ADICIONALES:

Figura 6. Ficha de toma de muestra de trampa de arroz en suelo agrícola para el aislamiento de *Trichoderma sp.*

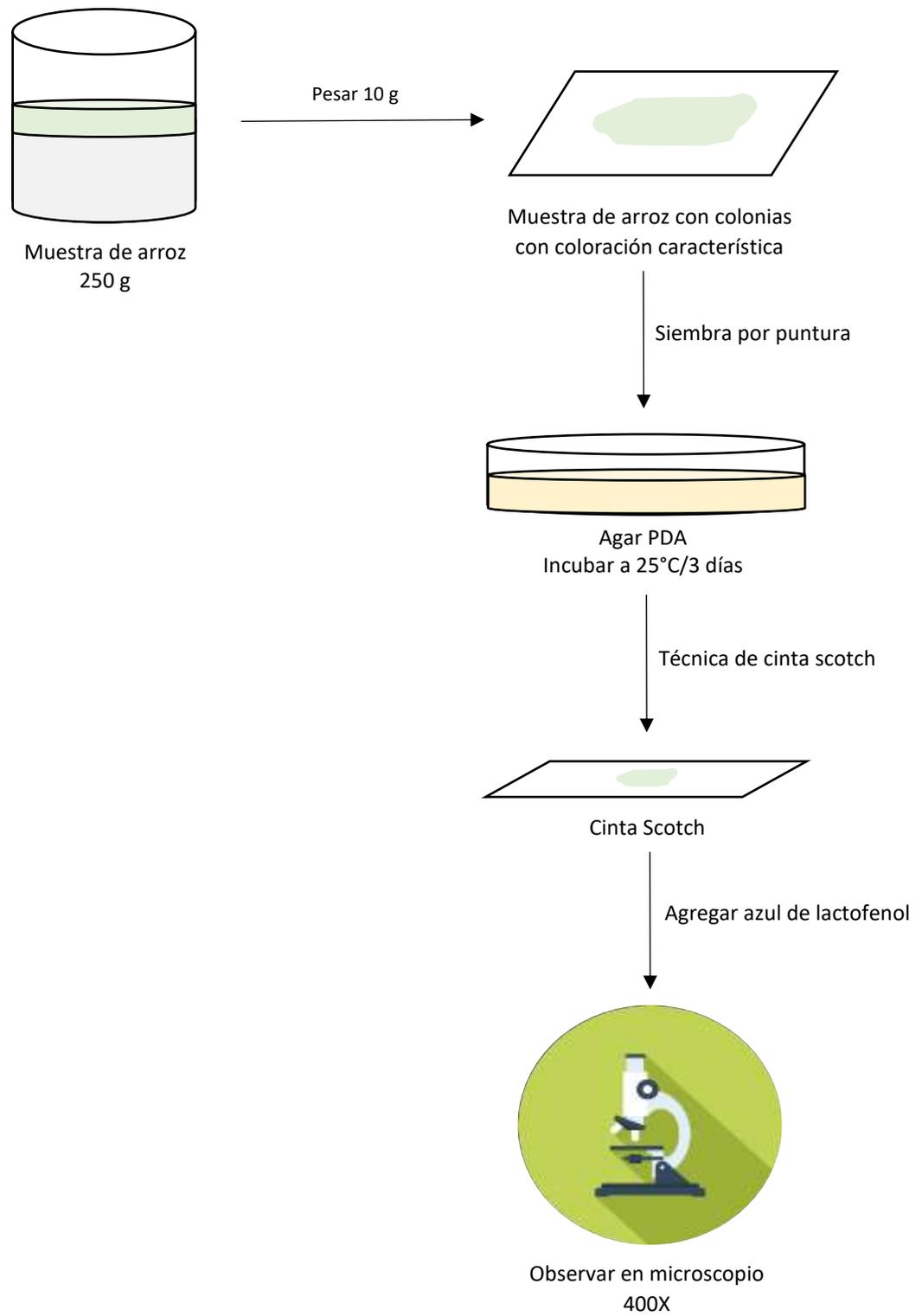


Figura 7. Flujograma para el aislamiento de microorganismos antagonistas de trampa de arroz.



Figura 8. Toma de muestra de trampas de arroz

- a.** Procesamiento de trampas de suelo colectadas de campo, **b.** Separación de porciones con presencia de micelios característicos de *Trichoderma*, **c.** Muestras de trampa de arroz

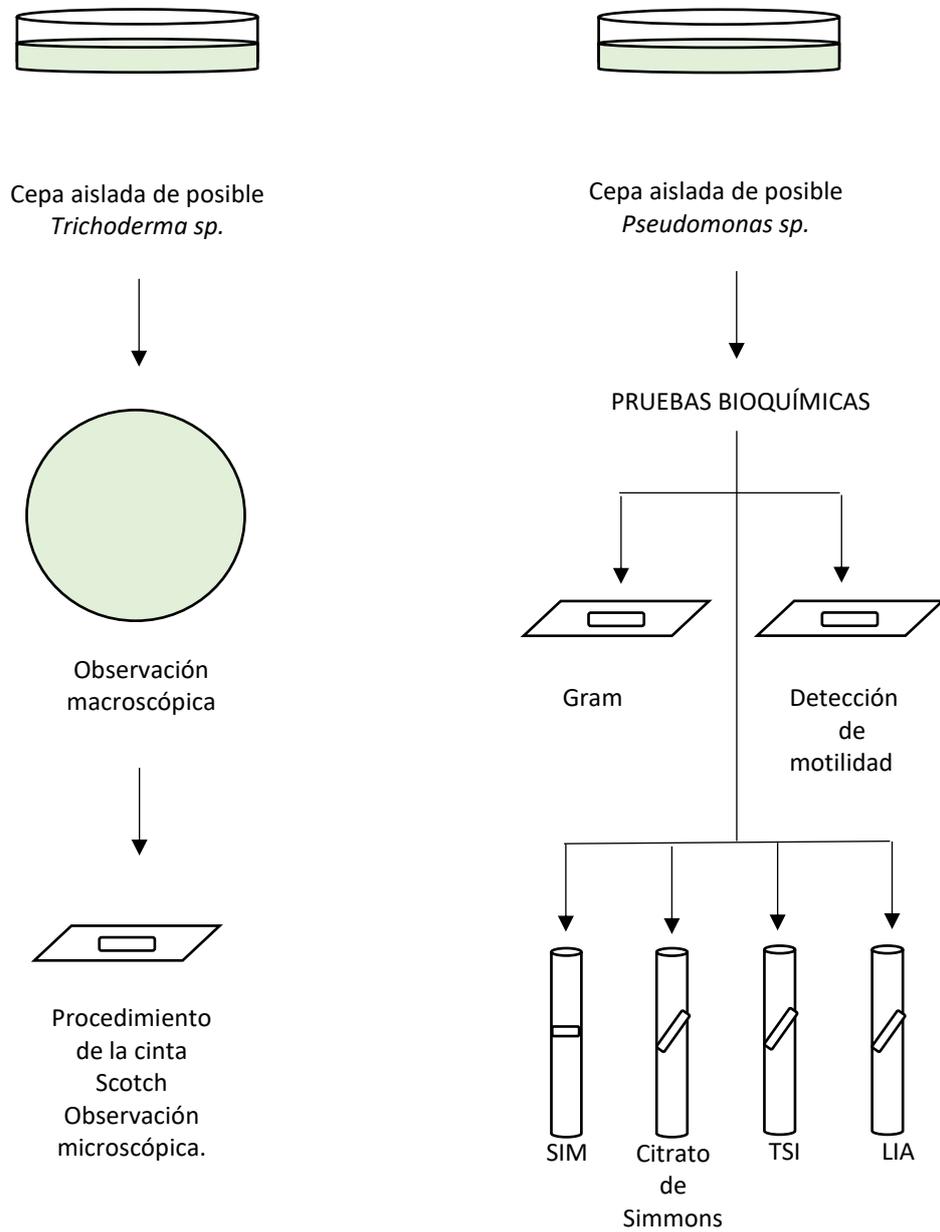


Figura 9. Flujograma para la identificación de cepas de *Trichoderma* y *Pseudomonas*.

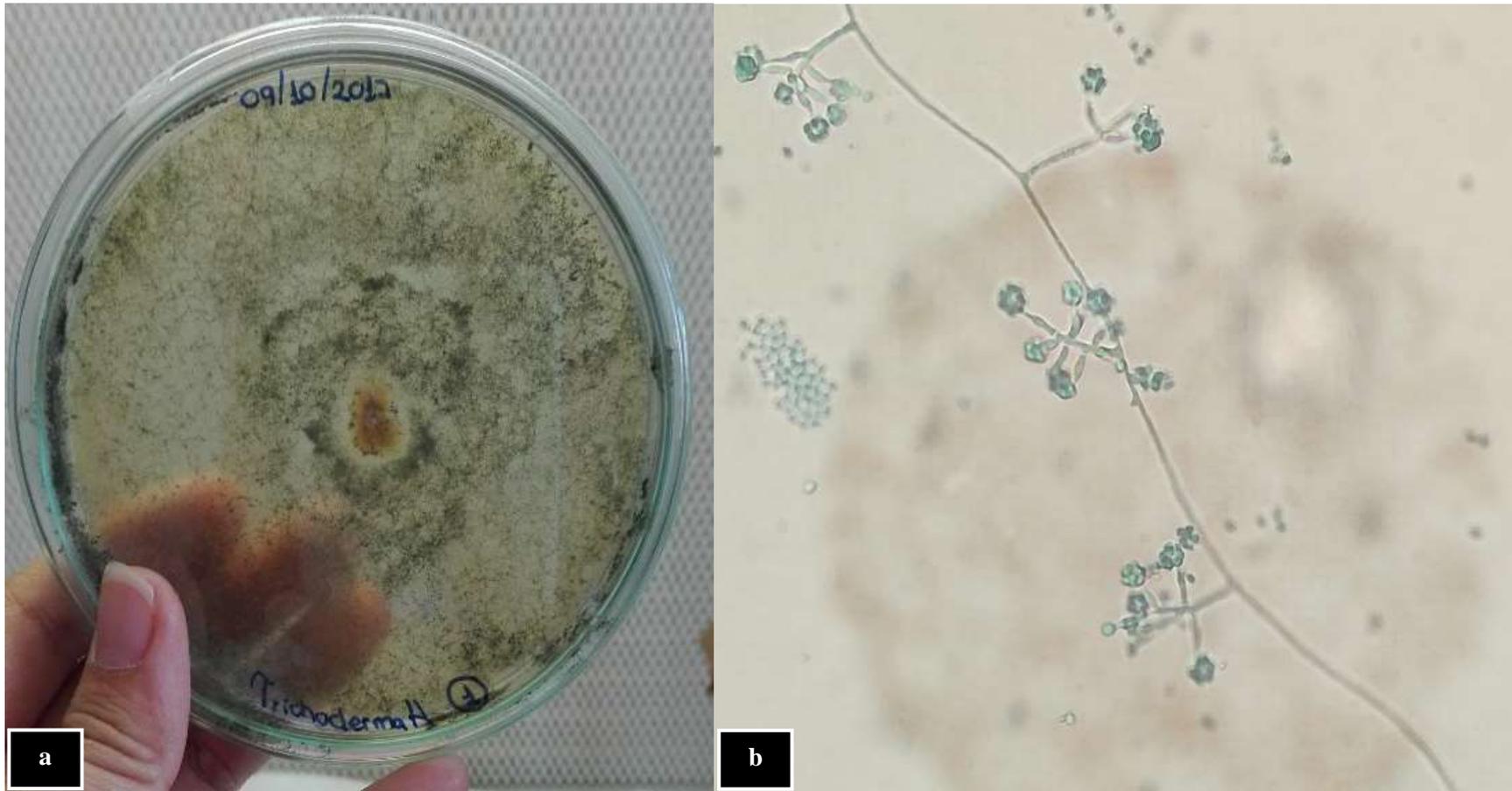


Figura 10. Cepa de *Trichoderma sp* : **a.** Observación macroscópica, **b.** Observación microscópica a 400x

FICHA N° 02

TOMA DE MUESTRA DE SUELO AGRÍCOLA PARA EL AISLAMIENTO DE
Pseudomonas sp.

DATOS RECOLECTADOS

MUESTRA N°

FECHA DE MUESTREO:

DEPARTAMENTO:

DISTRITO:

LUGAR:

TIPO DE CULTIVO:

NOMBRE DEL MUESTREADOR:

OBSERVACIONES ADICIONALES:

Figura 11. Ficha de toma de muestra de suelo agrícola para el aislamiento de *Pseudomonas sp.*



Figura 12. Cepa de *Pseudomonas sp.*: **a.** Características macroscópica, **b.** Características microscópica bacilos gran negativos 1000x.

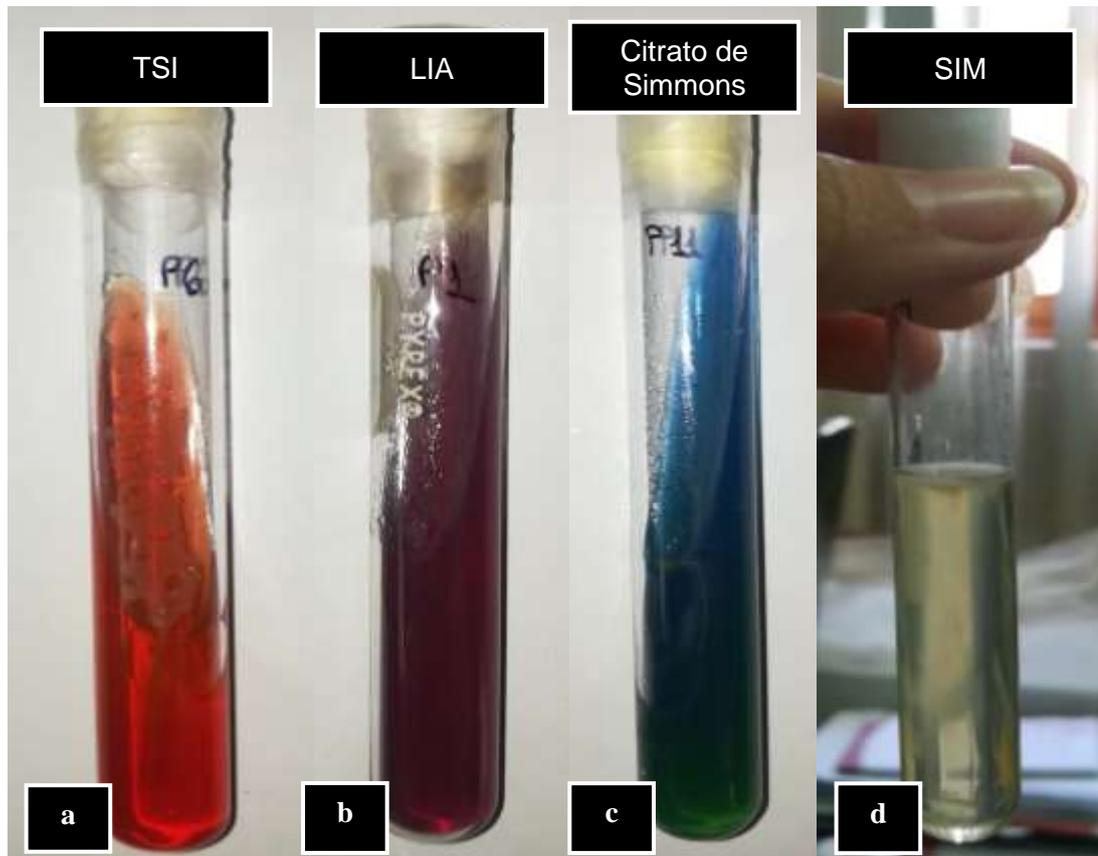


Figura 13. Pruebas bioquímicas realizadas a cepas de *Pseudomonas sp.*:

- a. TSI:** No fermentativo, **b. LIA:** Lisina descarboxilasa negativo,
c. Citrato de Simmons: Degradación de citrato, **d. SIM:** Movilidad.

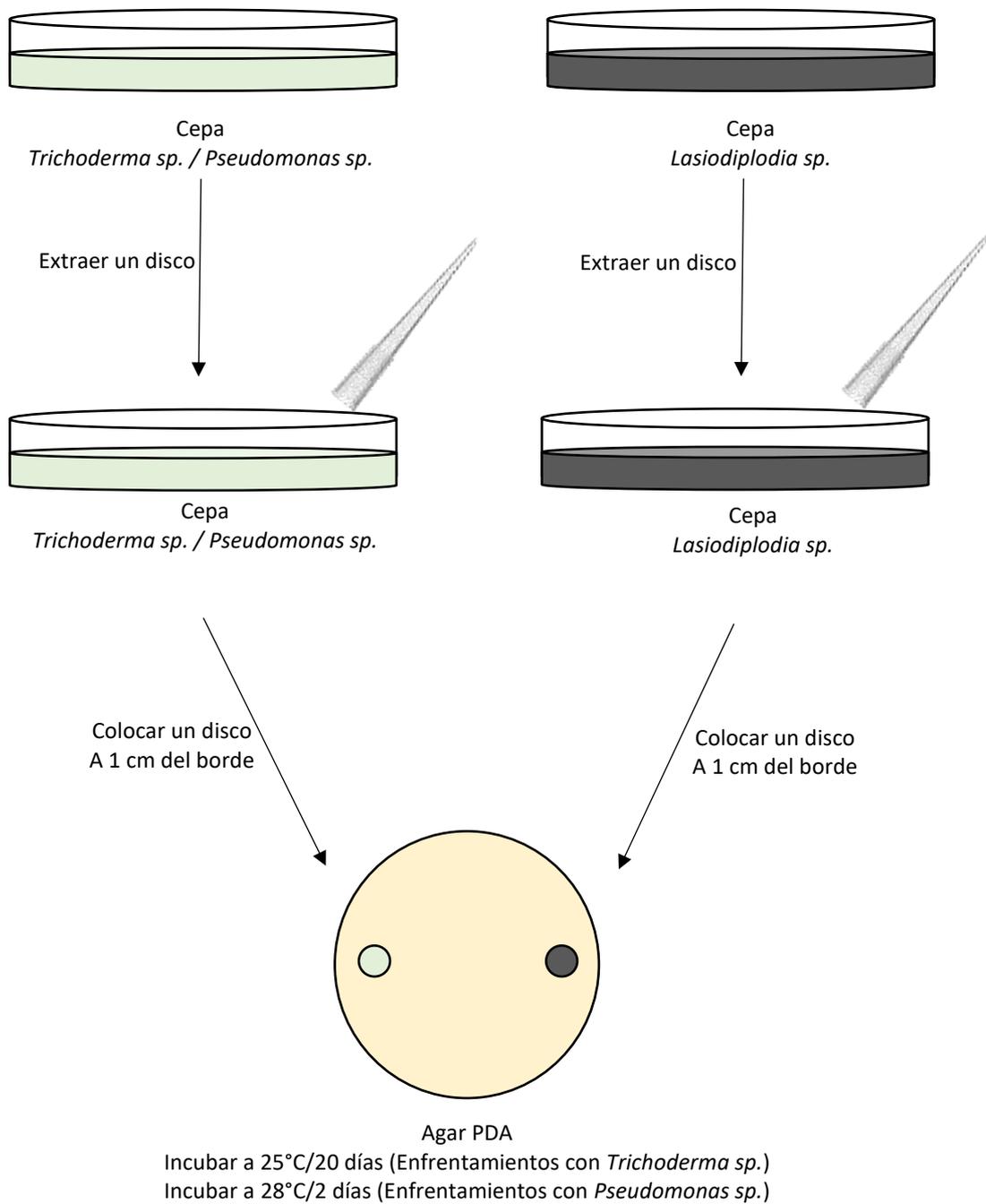


Figura 14. Flujograma de los dos primeros ensayos correspondientes a los enfrentamientos antagonísticos de *Trichoderma sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.*



Figura 15. Extracción de discos miceliales del patógenos *Lasiodiplodia sp.* para enfrentamiento antagónico.



Figura 16. Procedimiento de monitoreo, medición de radio de la colonia.

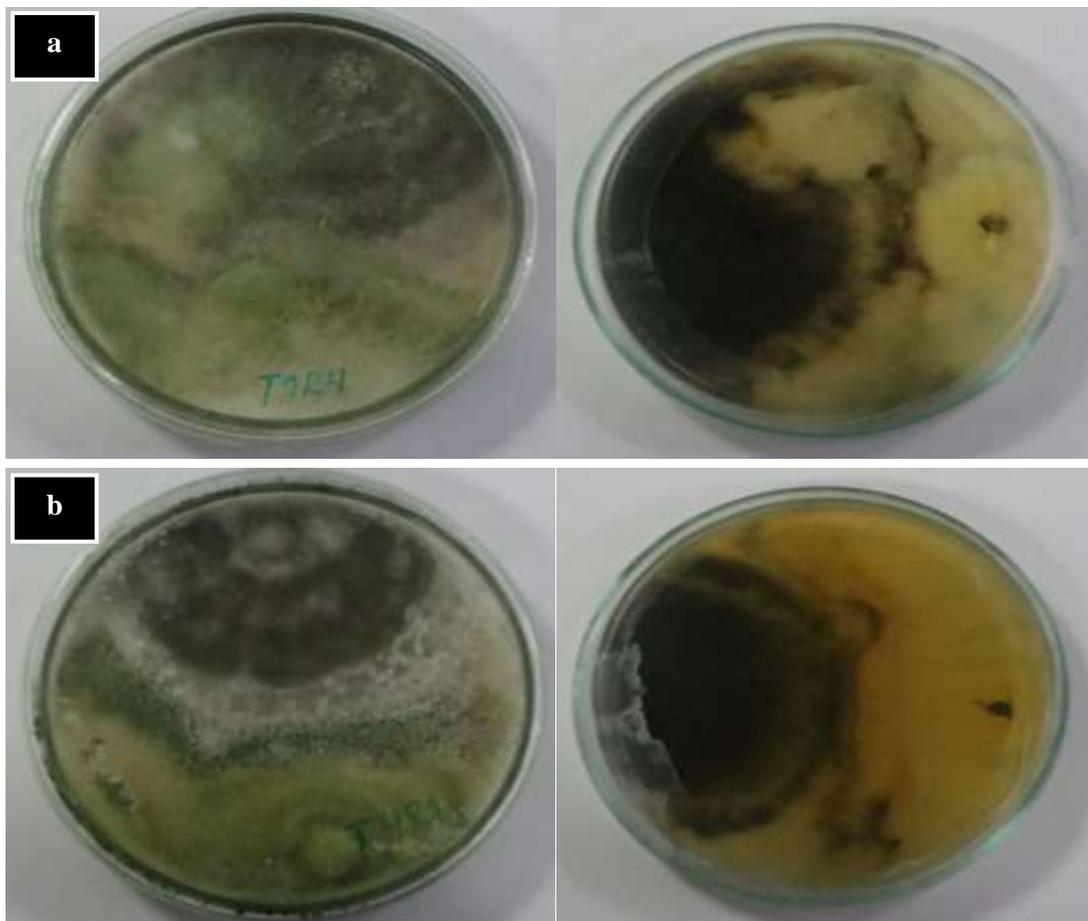


Figura 17. Ensayo 1 de cultivo dual con cepas de Trichoderma frente a *Lasiodiplodia sp.* **a.** Cepa T1, **b.** Cepa T4.

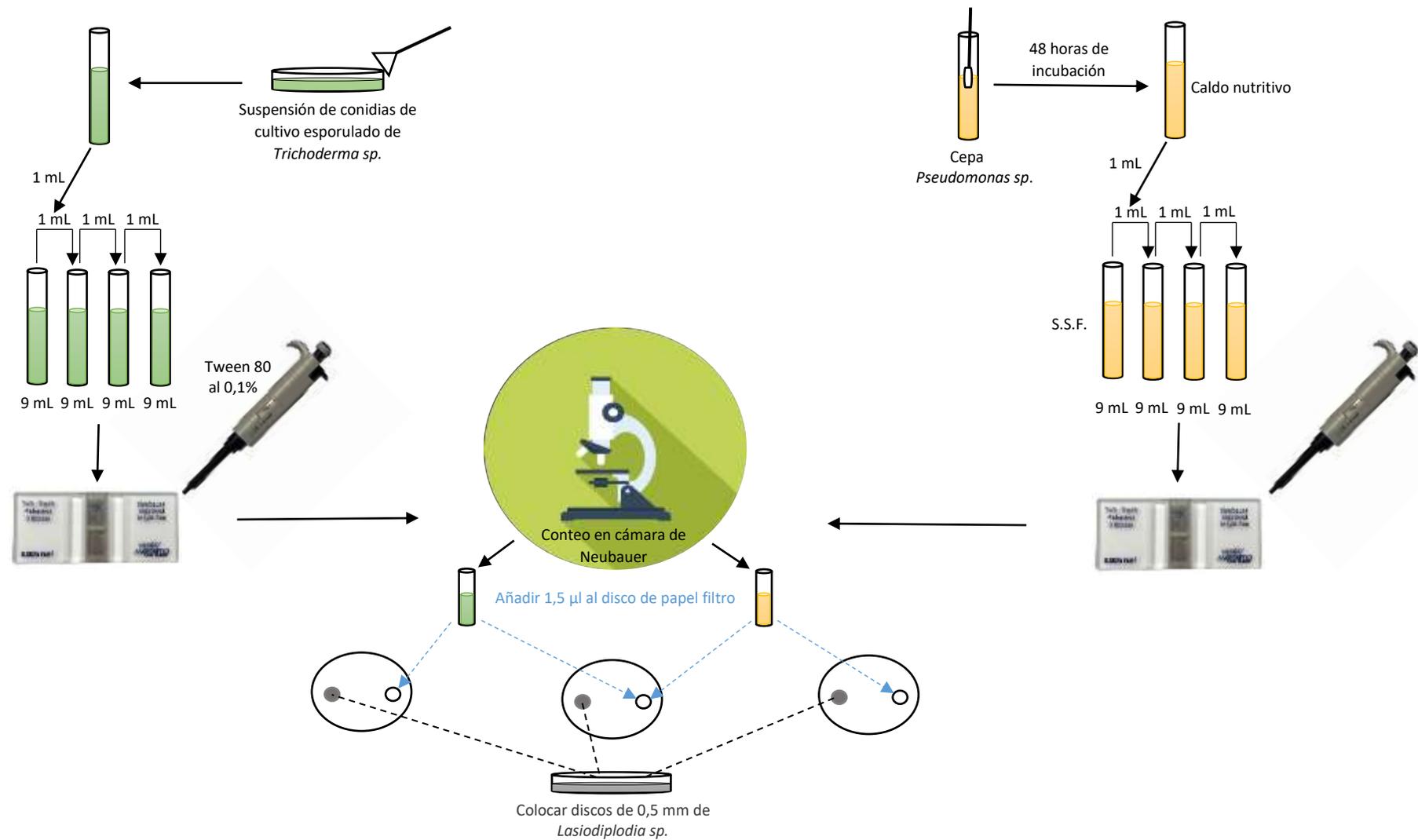


Figura 18. Flujograma del tercer ensayo correspondiente al enfrentamiento conjunto de *Trichoderma sp.* y *Pseudomonas sp.* frente a *Lasiodiplodia sp.*

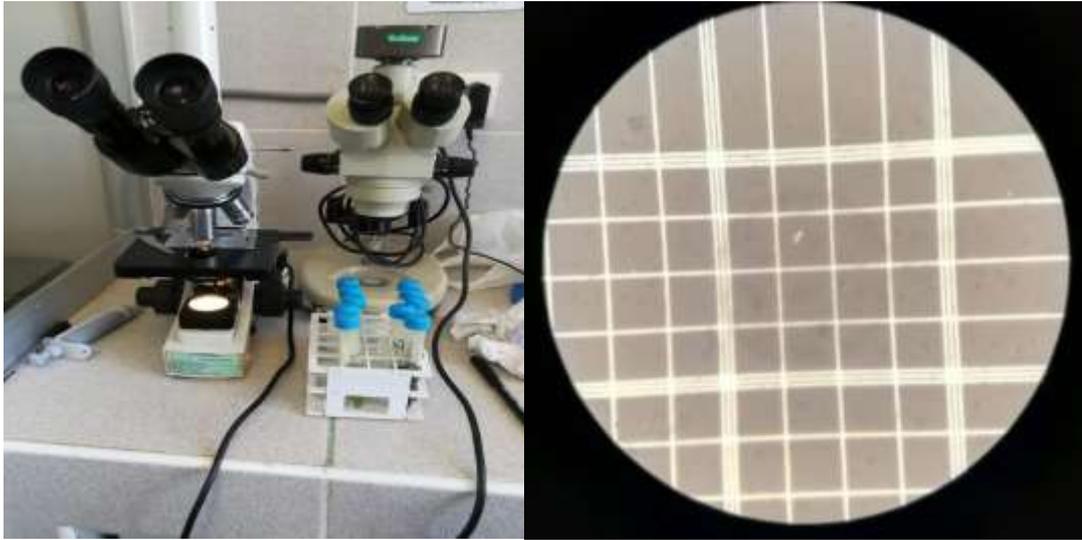


Figura 19. Conteo de conidias en cámara de Neubauer bajo el microscopio compuesto.

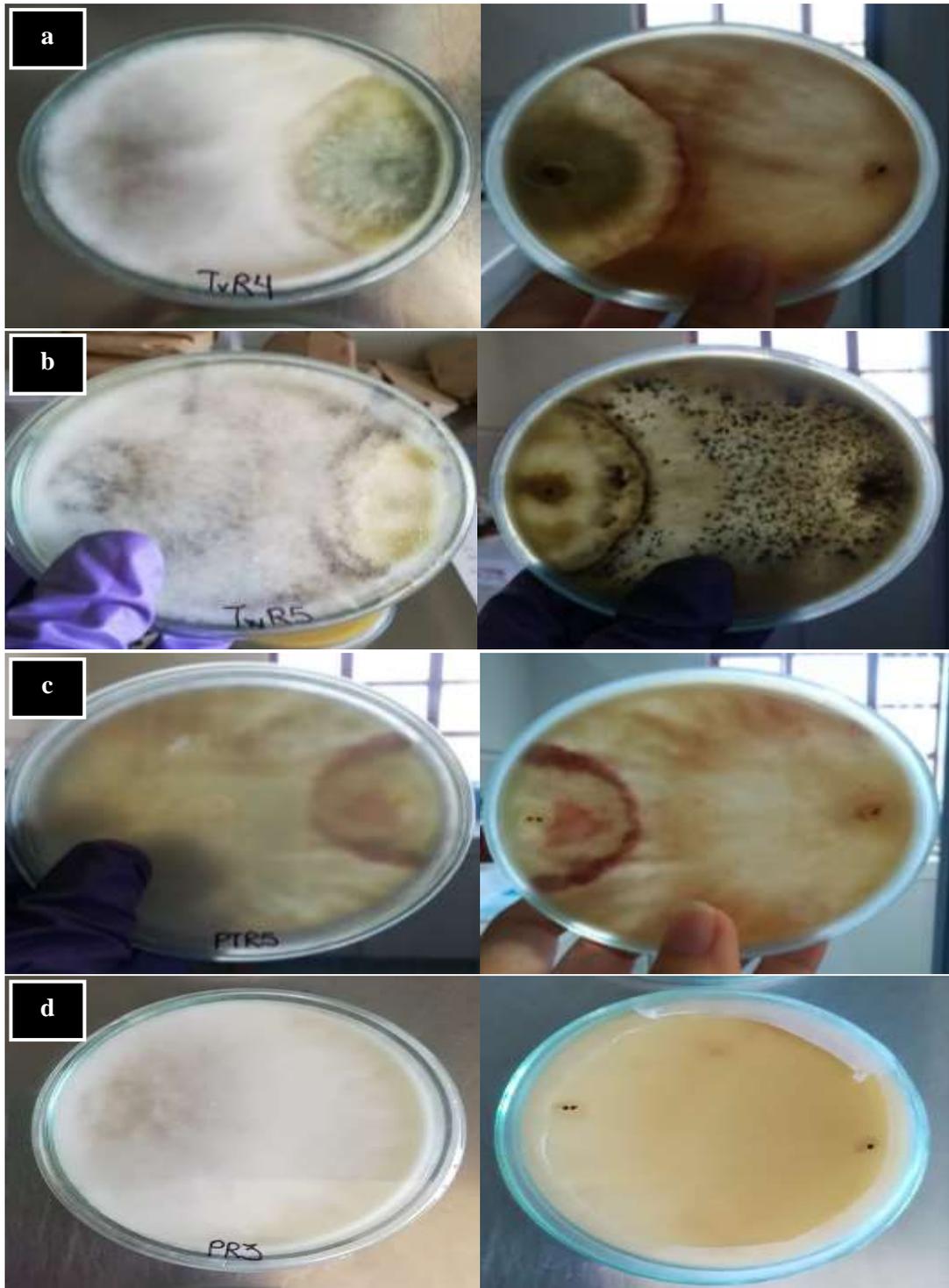


Figura 20. Enfrentamiento de cepas antagonistas frente a *Lasiodiplodia sp.* en el tercer ensayo a los 5 días de evaluación. **a.** *Trichoderma viride* (C+), **b.** *Trichoderma sp.* (T1), **c.** *Trichoderma sp.* (T1) más *Pseudomonas sp.* (P2) (T1P2), **d.** *Pseudomonas sp.* (P2).

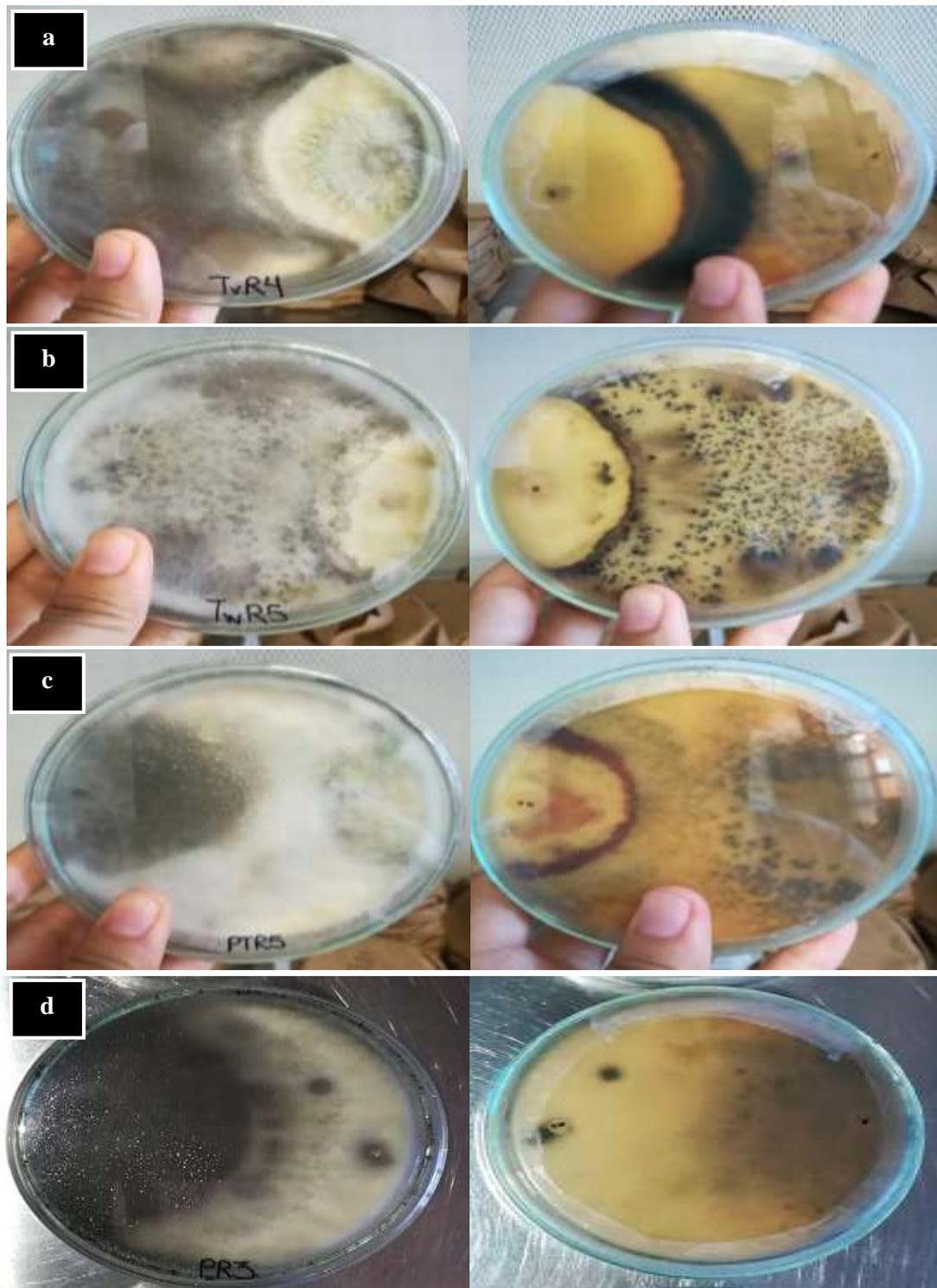


Figura 21. Enfrentamiento de cepas antagonistas frente a *Lasiodiplodia sp.* en el tercer ensayo a los 20 días de evaluación. **a.** *Trichoderma viride* (C+), **b.** *Trichoderma sp.* (T1), **c.** *Trichoderma sp.* (T1) + *Pseudomonas sp.* (P2), **d.** *Pseudomonas sp.* (P2).