



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible

Trabajo de graduación

Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp para el manejo de hongos causantes de mal del talluelo en tomate (*Solanum lycopersicom* L.)

AUTOR:

Ing. María del Rosario Chavarría Sánchez

ASESOR:

PhD. Arnulfo Monzón

Managua, Nicaragua
Diciembre 2016



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible

Trabajo de graduación

Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp
para el manejo de hongos causantes de mal del
talluelo en tomate (*Solanum lycopersicom* L.)

AUTOR:

Ing. María del Rosario Chavarría Sánchez

*Presentado a la consideración del Honorable Tribunal
Examinador como requisito para optar al grado de
Maestro en Ciencias en Agroecología y Desarrollo
Sostenible*

Managua, Nicaragua - 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar al título profesional de:

M.Sc. En Agroecología y Desarrollo Sostenible

Miembros del tribunal examinador

Presidente

Secretario

Vocal

Lugar y Fecha (mes año) _____

INDICE

SECCIÓN	PÁGINAS
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE DE CUADROS	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE ANEXOS	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. Obtención de las muestras de suelo	5
3.1.2. Procedimiento para aislar de <i>Trichoderma spp</i>	6
3.2. Caracterización de aislados nativos de <i>Trichoderma spp</i>	7
3.2. 1. Características macroscópicas	7
3.2 2.Caracterización microscópicas (morfométricas).....	7
3.2.3. Viabilidad de conidias.....	7
3.2.4. Ritmo de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma spp</i>	8
3.3. Competencia <i>in vitro</i> de los aislados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium spp</i>	8
3.3.1. Pruebas de competencia <i>in vitro</i>	9
3.3.2. Toma de datos.....	9
3.4. Efecto de aislados de <i>Trichoderma ssp</i> sobre mal del talluelo en cultivo de tomate10	
3.4.1. Preparación de suspensión de conidias de <i>Trichoderma spp</i>	10
3.4. 2. Inoculación del sustrato	10
3.4.3 Siembra de tomate.....	10
3.4.4 Toma de datos en microinvernadero	10
3.4.4.1 Porcentaje de semillas germinadas	10
3.4.4.2. Porcentaje de la incidencia de mal de talluelo	11
3.5. Variables evaluadas	11
3.6. Tratamientos evaluados.....	11

3.7. Análisis de los datos.....	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Caracterización de aislados de <i>Trichoderma</i> spp	13
4.1.1. Características macroscópicas.....	13
4.1.2. Características morfométricas	16
4.1.3 Viabilidad de conidias.....	17
4.1.4. Ritmo de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp	20
4.2. Competencia <i>in vitro</i> de los aislados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium</i> spp	23
4.2.1. Grados de micoparasitismo de aislados de <i>Trichoderma</i> spp sobre a <i>Fusarium</i> spp	24
4.3. Efectos de aislados de <i>Trichoderma</i> spp sobre mal del talluelo en cultivo de tomate	26
4.3.1. Porcentaje de semillas de tomate germinadas	26
4.3.2. Identificación de patógenos en plántulas de tomate.....	27
4.3.3. Porcentaje de incidencia mal del talluelo en tomate	27
V. CONCLUSIONES	29
VI. RECOMENDACIONES	30
VII. LITERATURA CITADA	31
VIII. ANEXOS.....	35

DEDICATORIA

Dedico a Dios con mucha alegría y satisfacción y con espíritu de reverencia, por haberme permitido llevar a cabo este trabajo.

Con el amor más grande y puro dedico este trabajo de tesis

A mis hijos

Bruno René Detrinidad Chavarría y Maren Johana Detrinidad Chavarría por darme mucha felicidad con sus vidas. Y por los momentos de alegría que me dan cada día. Son lo más importante de mi vida, gracias a ellos he conseguido descubrir una nueva forma de amar.

A mi esposo

René Salvador Detrinidad Ruiz por que junto con mis hijos, son la razón de mi vida.

A mis padres

Bruno Chavarría Granado, Juana Sánchez Velásquez porque los quiero mucho y están siempre pendiente de mí.

Ing. María del Rosario Chavarría Sánchez

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme culminar este trabajo y por haberme dotado de conocimientos y por la oportunidad de hacer, que este trabajo sea de utilidad para la Agricultura de Nicaragua.

A mi asesor Dr. Arnulfo Monzón por orientarme en la realización de este trabajo y por el apoyo brindado en cada etapa de este trabajo de investigación.

Al Programa de Maestría en Agroecología y Desarrollo Sostenible de la Universidad Nacional Agraria y o todo el equipo de docentes que fue parte de esta maestría.

Ing. María del Rosario Chavarría Sánchez

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Localidades de muestreo para la obtención de aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp durante el periodo Octubre 2009- Septiembre 2010.	6
2. Escala para evaluación del antagonismo o capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp (Royse y Ries, 1978).	10
3. Aislados de <i>Trichoderma</i> spp colectados en el presente estudio y agregadas al cepario de la Universidad Nacional Agraria Octubre 2009- Septiembre 2010.	13
4. Caracterización macroscópicas de aislados de <i>Trichoderma</i> spp en tres medios de cultivos PDA, SDA y EMA	14
5. Caracterización morfométrica en medio PDA de aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp obtenidos de suelos de diferentes regiones	17
6. Radios de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Fusarium</i> spp en pruebas de competencia a los 72 horas de incubación.	24

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Montaje en cámara húmeda para evaluación de viabilidad de conidias de <i>Trichoderma</i> spp	8
2. Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp en medio de cultivo PDA (1), SDA (2), EMA (3), a los 3 días de incubación. Vista frontal (a) y vista posterior (b).	15
3. Estructura morfológica de <i>Trichoderma</i> spp conidióforo (a), fialide (b), conidias (c), (40X).	16
4. Porcentaje de viabilidad de conidias en los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. Observación cada 12 horas (40X).	18
5. Dinámica de germinación de ocho aislados de <i>Trichoderma</i> spp. Observaciones cada 12 horas (40X).	19
6. Ritmo de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp en medio de cultivo PDA.	21
7. Ritmo de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp en medio de cultivo SDA.	22
8. Ritmo de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp en medio de cultivo EMA.	23
9. Confrontación de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium</i> spp. a) Cultivo dual de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> ; b) Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> spp en la colonia de <i>Fusarium</i> spp a los 8 días de crecimiento.	25
10. Grados de micoparasitismo de aislados de <i>Trichoderma</i> spp frente a <i>Fusarium</i> spp a los 8 días de crecimiento.	26
11. Porcentaje de germinación de plantas de tomate variedad Mariana. Tisma – Masaya Octubre 2010.	27
12. Porcentaje de incidencia de mal del talluelo en cultivo de tomate en condiciones de microinvernadero Tisma –Masaya Octubre 2010.	28

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Medición del radio de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp siguiendo la metodología descrita por (French y Hebert 1982)	35
2. Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidias de aislados <i>Trichoderma</i> spp.	35
3. Separación de medias según Tukey para fecha, del porcentaje de germinación de conidias.	36
4. Analisis de Regresión del porcentaje de viabilidad de conidias.	36
5. Separación de medias para tratamiento variable ritmo de crecimiento en PDA (Papa Dextrosa Agar)	36
6. Separación de medias para fecha variable ritmo de crecimiento en PDA (Papa Dextrosa Agar).	37
7. Separación de medias para tratamiento variable ritmo de crecimiento en SDA (Sabouraud Dextrosa Agar).	37
8. Separación de medias para fecha variable ritmo de crecimiento en SDA (Sabouraud Dextrosa Agar).	37
9. Separación de medias para tratamiento variable ritmo de crecimiento en EMA (Extracto de Malta Agar)	38
10. Separación de medias para fecha variable ritmo de crecimiento en EMA (Extracto de Malta Agar).	38
11. Separación de medias según Tukey del ritmo de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp en confrontación con <i>Fusarium</i> spp. A las 24 horas de incubación.	38
12. Separación de medias del ritmo de crecimiento del testigo de <i>Trichoderma</i> spp, en confrontacion con <i>Fusarium</i> spp. A las 24 horas de crecimiento.	39
13. Separación de medias según Tukey del ritmo de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp en confrontación con <i>Fusarium</i> spp. A las 48 horas de crecimiento.	39
14. Separación de medias según Tukey del ritmo de crecimiento del testigo de <i>Trichoderma</i> spp, en las pruebas de competencia con <i>Fusarium</i> spp. A las 48 horas de crecimiento.	40

15. Separación de medias según Tukey del radio de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp al estar en confrontación con <i>Fusarium</i> spp. A las 72 horas de crecimiento.	40
16. Separación de medias según Tukey para el ritmo de crecimiento de <i>Fusarium</i> spp en confrontación con <i>Trichoderma</i> spp a las 72 horas de crecimiento.	41
17. Separación de medias según Tukey del el radio de crecimiento del testigo de <i>Trichoderma</i> spp, en las pruebas de competencia con <i>Fusarium</i> spp. A las 72 horas de crecimiento.	41
18. Separación de medias para tratamientos del porcentaje de incidencia de mal del talluelo en plantas de tomate (Tisma – Masaya).	42
19. Separación de medias para Fechas para la variable porcentaje de incidencia mal del talluelo en plantas de tomate en micro invernadero (Tisma–Masaya).	42
20. Síntomas de mal del talluelo en cultivo de tomate (ensayo de microinvernadero Tisma-Masaya).	42

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue contribuir al desarrollo de opciones de control biológico mediante la caracterización y evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp para el control de patógenos causantes de mal del talluelo. Se colectaron muestras de suelo en diferentes localidades y fueron analizadas en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la UNA. El aislamiento de *Trichoderma* spp, se hizo mediante la técnica de dilución seriada y siembra Papa Dextrosa Agar (PDA). Se hizo caracterización macroscópica y microscópica, viabilidad de conidias y ritmo de crecimiento, competencia y antagonismo in vitro contra *Fusarium* spp, usando la técnica de cultivo dual. Se evaluó en condiciones de micro invernadero el efecto de los aislados sobre mal del talluelo en tomate. Los datos obtenidos fueron analizados descriptivamente y mediante la técnica de análisis de varianza y separación de medias según Tukey. Se obtuvieron ocho aislados nativos caracterizados como perteneciente a *Trichoderma* spp y se codificaron con base a su origen. La germinación de conidias de todos los aislados fue del 95 y 100% a las 72 horas. En PDA el tiempo de crecimiento de los aislados T0201 T0301, T0702, T0501 fue a las 48 horas con un radio de 33 mm, en los aislados T0704, T0703, T0705, T0701 fue a las 60 horas con un radio de 24 mm. En SDA el tiempo de crecimiento del aislado T0301 fue a las 48 horas con un radio de 33 mm, se observó variación en el tiempo de crecimiento para el resto de aislados entre las 72 a 84 horas con un radio de 37 mm. En EMA la mayoría de aislados alcanzaron su crecimiento entre las 60 y 72 horas, con un radio de 35 mm. Los aislados T1201, T0501H, T0704, T0703, T0301, T0701 mostraron un efecto de competencia significativa en la inhibición del radio de crecimiento de *Fusarium* spp a las 72 horas. El micoparasitismo de los aislados T0701, T0702, T0704, T0301, T0705, T0201 fue grado 1 el micelio de *Trichoderma* spp sobrecreció al de *Fusarium* spp en un 100%. Los aislados T0301 y T0501H presentaron mayor potencial controlador sobre mal del talluelo con el menor porcentaje de incidencia de 1.28 % y 1.35 %.

Palabras claves: Control biológico, antagonista, micoparasitismo

ABSTRACT

The objective of this work was to contribute to the development of biological control options through the characterization and evaluation of native isolates of *Trichoderma* spp for the control of pathogens causing stalk disease. Soil samples were collected in different localities and analyzed in the Laboratory of Entomopathogenic Mushrooms of the UNA. Isolation of *Trichoderma* spp was done using the serial dilution technique and seeding of Potato Dextrosa Agar (PDA). Macroscopic and microscopic characterization, conidia viability and growth rate, competition and in vitro antagonism against *Fusarium* spp were made using the dual culture technique. The effect of the isolates on tomato stalk was evaluated under micro greenhouse conditions. The data were analyzed descriptively and using the technique of analysis of variance and separation of means according to Tukey. Eight native isolates characterized as belonging to *Trichoderma* spp were obtained and were coded based on their origin. Germination of conidia from all isolates was 95% and 100% at 72 hours. In PDA the growth time of the isolates T0201 T0301, T0702, T0501 was at 48 hours with a radius of 33 mm, in the isolates T0704, T0703, T0705, T0701 was at 60 hours with a radius of 24 mm. In SDA the growth time of the T0301 isolate was at 48 hours with a radius of 33 mm, variation in growth time was observed for the rest of isolates between 72 and 84 hours with a radius of 37 mm. In EMA the majority of isolates reached their growth between 60 and 72 hours, with a radius of 35 mm. The T1201, T0501H, T0704, T0703, T0301, T0701, T0701 isolates showed a significant competition effect on the inhibition of *Fusarium* spp growth radius at 72 hours. The myopathy of the isolates T0701, T0702, T0704, T0301, T0705, T0201 was grade 1 the mycelium of *Trichoderma* spp overgrowth of *Fusarium* spp in 100%. The T0301 and T0501H isolates presented greater control potential on stem disease with the lowest incidence rate of 1.28% and 1.35%.

Key words: Biological control, antagonist, mycoparasitism

I. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L), es una de las hortalizas más populares del mundo; es cultivado tanto en huertos caseros, como en áreas comerciales y está catalogado como una importante fuente de vitaminas A y C. (INTA, 2004). Además de contener licopeno fotoquímico importante en la prevención de muchas enfermedades. (Cruz *et al.*, 2013. Estudios médicos en humano han evidenciado el papel que tiene el licopeno en la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y el cáncer. (Shardell *et al.*, 2011).

En Nicaragua las mejores condiciones para el cultivo de tomate se presentan tanto en la zona del pacifico como en la zona central. De acuerdo a estadísticas del CENAGRO (2011), en Nicaragua se siembran alrededor de 2469 hectáreas de tomate, con un rendimiento promedio según MAGFOR (2012) de 25.20 t ha⁻¹.

Es producido principalmente por pequeños y medianos productores, en los departamentos de Matagalpa y Jinotega, particularmente en los Valles de Sébaco y Tomatoya. También, se produce en zonas de Estelí, Malacatoya, Tisma y Nandaime, aunque en menor escala. Existen además otras zonas con potencial, como el Valle de Jalapa, la meseta de Carazo y algunas zonas de los departamentos de Boaco y Chontales (MIFIC, 2007).

Las plagas insectiles, enfermedades y malezas constituyen un factor limitante en la producción de tomate, las enfermedades pueden ser causadas por hongos, bacterias, y transmitidas por insectos vectores (Jones y Jones, 2001). La incidencia de enfermedades varía de acuerdo a la etapa fenológica del cultivo, pero durante todas ellas pueden presentarse diferentes enfermedades (CIDEA, 2004).

Durante la etapa de semillero, la enfermedad más común es el mal del talluelo, la que puede ser causada por un complejo de patógenos del suelo, tales como: *Rhizoctonia solani*, Kuhn, *Pythium* spp, *Fusarium* spp, *Phytophthora parasítica* Dast, *P.cinnamomi* Rands, *Sclerotium rolfsii* Sacc y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) (González *et al.*, 2008). Esta enfermedad puede ser pre-emergente, cuando el ataque es temprano, ocasionando que las plantas no alcanzan a emerger del suelo o post-emergente donde los tallos a nivel del suelo presentan un adelgazamiento y necrosis de los tejidos y se doblan, en semilleros la enfermedad presenta una distribución en pequeños parches (Solano y Brenes, 2011).

Otra de las enfermedades en el cultivo de tomate es el marchitamiento causado por *Fusarium*, esta enfermedad es más prevalente siempre que el tomate se cultive intensivamente. Las condiciones favorables para que la enfermedad aparezca son climas cálidos, y en suelos cálidos y arenosos de las regiones templadas. Cuando las plantas son infectadas en la etapa de plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno (Agrios, 2009).

Tradicionalmente el manejo de plagas tanto para la etapa de semillero y plantación se ha hecho con fungicidas sintéticos, incluyendo productos fumigantes usados en tratamiento del semillero. Alternativamente se han utilizado otros métodos de manejo preventivo, tales como el uso de agua hirviendo, la aplicación de cal, así como el manejo cultural orientado al establecimiento de

semilleros a densidades que no provoquen ambientes adecuados para el desarrollo del mal de talluelo, siembra de semilla sana, uso de variedades resistentes y rotación de cultivos (INTA, 2004).

El uso intensivo de productos químicos ha traído como consecuencia efectos nocivos sobre el ambiente debido a su residualidad, lo que provoca que se acumulen en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales, todo esto repercute en la salud humana, además que se generan altos costos de producción y sin resultados satisfactorios debido a que los plaguicidas no permiten un control efectivo de muchas enfermedades producidas por fitopatógenos del suelo por no ser selectivos (Michel, 2001).

Estudios realizados en Nicaragua en el 2000 sobre la incidencia de intoxicaciones revelan el porcentaje de Intoxicaciones agudas causados por algunos plaguicidas como el metamidofós que presentó un porcentaje de intoxicaciones del 26%, malatión (14%), metomil (10%), fosfuro de aluminio (10%) y clorpirifós (7%). En menor grado se reportan deltametrina, cipermetrina, paraquat, propoxur y metilparation (Corriols *et al.*, 2001).

Las enfermedades Renal Crónicas de trabajadores de las zonas de León y Chinandega sean relacionado especialmente con el uso de plaguicidas, en cultivos como: la caña de azúcar, banano y otros, en una investigación reciente para encontrar la relación entre enfermedad y el lugar de trabajo, se evaluó a 220 casos de pacientes con (ERC) que trabajan exclusivamente en el cultivo de caña, encontrando en los estudios clínicos que 95,5% presentó niveles de creatinina por encima de los valores normales (1,4 mg/dl), con valores medios de 1,9 mg/dl. El valor medio del hematocrito fue del 37,77%, y hemoglobina de 12,37 mg/dl. El valor mínimo de hematocrito encontrado fue del 25%, El 60,5% de los pacientes evaluados se encontraron en el estadio 3 de la ERC (National National Kidney Foundation, 2002) y presentaron disminución del hematocrito y magnesio y aumento de presión arterial, el 98% manifestó disminución bilateral del grosor cortical renal (Penalba, 2015).

En un estudio realizado en Costa Rica sobre aplicaciones aéreas de mancozeb y concentraciones urinarias de etilentiourea (ETU) en mujeres embarazadas: se encontró que la concentraciones urinarias de ETU de las mujeres que vivían a menos de 50 metros de alguna plantación bananera, fueron un 45% (intervalo de confianza del 95% mayor en comparación con las concentraciones de las que vivían a más de 600 metros de distancia. Comparadas con mujeres, que habían lavado ropa de trabajo agrícola el día antes de tomar la muestra de orina se encontró concentraciones elevadas de (11%) para las que habían realizado algún trabajo agrícola durante el embarazo (19%), y, por último, para las mujeres in migrantes (6%) (Wendel *et al.*, 2015).

El Banco Mundial indica que, de acuerdo con la OMS, 355 000 personas mueren por año a nivel mundial, de forma no intencional, por exposición a plaguicidas. Dos terceras partes de estas intoxicaciones corresponden a habitantes de países en desarrollo, que no cuentan con buenos sistemas para la regulación de plaguicidas peligrosos (Berrocal, 2015).

Por todos estos efectos antes mencionados a causa de los plaguicidas químicos, nace la necesidad de la búsqueda de agentes de control biológico, como una alternativa viable al uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura, por lo que el manejo se dirige a la búsqueda de microorganismos

que pueden ser usados como agentes de control biológico, como es el caso de *Trichoderma*, que puede ser utilizado para el control de patógenos fúngicos de suelo (Stefanova *et al.*, 1999).

Trichoderma es un hongo que se encuentra presente en forma natural, en casi todos los suelos. Este hongo pertenece a la clase *Sordariomycetes*, orden: Hipocreales, familia: *Hypocreaceae*. Las especies más importantes como agentes de control de enfermedades son: *Trichoderma* spp Rifai, *T. viride* Pers., *T. polysporum* Link fr, *T. reesei* EG Simmons, *T. virens*, *T. longibrachatum* Rifai, *T. parceromosum*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. lignorum* y *T. citroviride* (Villegas, 2008).

De estos, una de las especies más importante es *Trichoderma harzianum*, que parasita el micelio de los hongos *Rhizoctonia* y *Sclerotium*, e inhibe el crecimiento de otros, como *Pythium*, *Fusarium* y *Botrytis*, reduciendo la incidencia de las enfermedades causadas por la mayoría de estos patógenos (Berkeley, 1994).

Según Hjeljord y Transmo (1998), Howell (2003) y Harman *et al.* (2004) los mecanismos de acción de *Trichoderma* descritos actualmente son cinco (1) micoparasitismo, (2) antibiosis, (3) competencia, (4) promoción del crecimiento y/o (5) inducción de resistencia en la planta hospedera. Harman *et al.*, (1981), sugieren que el micoparasitismo es el principal mecanismo de acción de *Trichoderma*, este agente de control biológico envuelve al hongo y penetra sus células causándole un daño extensivo, tales como: alteración de la pared celular, incluyendo la degradación de ésta, retracción de la membrana plasmática de la pared celular, desorganización del citoplasma, también actúa sobre la replicación celular al inhibir la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo del patógeno.

El uso de *Trichoderma spp* como agente controlador de algunos patógenos del suelo, así como de otros patógenos que causan enfermedades foliares tanto en tomate como en otras plantas, ha sido estudiado en diversos países. Por ejemplo, se ha evaluado *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control biológico de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Ezziyyani, 2004); Biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por Trichozam (*Trichoderma harzianum*) y Mycoral (micorriza vesículo arbuscular) en el cultivo de tomate (Córdova, 2003); Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma spp* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez de la maracuyá (Suarez *et al.*, 2008); Uso de *Trichoderma harzianum* para el manejo de la pudrición de plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.) (Roni, 2006); Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Solanum lycopersicum* Mill (Michael *et al.*, 2008).

En Nicaragua no se tienen antecedentes del efecto que puedan ejercer cepas nativas de *Trichoderma* sobre los hongos causantes de mal del talluelo; solamente se ha hecho uso de cepas comerciales introducidas de otros países, para el manejo de patógenos de suelo en cultivos como: hortalizas, semillero de café, en plantaciones de caña de azúcar, arroz etc. Sin embargo el uso de cepas comerciales presenta dificultades con su persistencia en el suelo, debido a factores como la genética de los aislados y las condiciones del medio ambiente (González *et al.*, 1999). La selección de aislados nativos es importante porque permite una mejor adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona específica donde serán utilizados (Guigón y González, 2004). Por lo tanto, es importante obtener, y evaluar aislados nativos de *Trichoderma* ya sea tanto en condiciones *in vitro* de invernadero y campo, para seleccionar aislados efectivos en el manejo de patógenos de suelo.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Contribuir al desarrollo de opciones de control biológico de hongos fitopatógenos causantes de mal de talluelo en tomate y en diversos cultivos de importancia económica.

2.2. Objetivos específicos

Identificar aislados nativos de *Trichoderma* a nivel de género mediante características macroscópicas, morfométricas, de viabilidad y crecimiento.

Evaluar la acción antagónica y de competencia *in vitro* de aislados nativos de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp como causante de mal del talluelo en plántulas de tomate.

Determinar la efectividad de los aislados de *Trichoderma* spp sobre la incidencia natural de mal del talluelo en tomate, bajo condiciones de microinvernadero.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el periodo comprendido entre diciembre 2009 y octubre 2010 en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, y en la zona de Tisma Masaya en la finca del productor. René López ubicada en las coordenadas 12° 5'19. 00" latitud N, y 86° 1'14. 80" latitud oeste. El cultivo más producido en esta finca es el tomate, la etapa de semillero se hace microinvernaderos por lo tanto el problema más serio de plagas, en esta etapa, es la enfermedad mal del talluelo.

El estudio consistió en la evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp como agente de control microbial de patógenos causantes del mal del talluelo en tomate. El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la colecta de muestras de suelo para el aislamiento y caracterización de los aislados y la segunda etapa consistió en la evaluación de los aislados en condiciones *in vitro*, y microinvernadero.

3.1. Obtención de las muestras de suelo

Las muestras de suelo fueron colectadas de parcelas de cultivos hortícolas, caña de azúcar, café, maíz, en las que nunca antes se había utilizado productos microbiológicos a base de *Trichoderma*. Para la colecta de muestras de suelo se seleccionaron 8 fincas de diferentes partes del país. La información sobre los lugares muestreados se presenta en el (Cuadro 1).

Por cada finca se tomaron 3 muestras de suelo, a una profundidad de 15 cm en el surco del cultivo. Cada muestra consistió de 1 kg de suelo y se obtuvo a partir de 5 sub-muestras, colectadas en el área adyacente a las plantas. Las muestras se colectaron con una pala de mano (palín), el que era desinfectado superficialmente con alcohol 70% después de colectar cada muestra. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas y fueron debidamente rotuladas, con información del lugar, fecha de colecta. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria (UNA), Managua, para realizar el proceso de aislamiento de *Trichoderma*.

Cuadro 1. Localidades de muestreo para la obtención de aislados nativos de *Trichoderma* spp, durante el periodo Octubre 2009 - Septiembre 2010

Localidades	Municipio	Departamento	Cultivo presente	Fecha
Tomatoya	Jinotega	Jinotega	<i>Allium cepa</i> , <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Lactuca sativa</i>	Ene 2010
Ingenio Monte Rosa	El Viejo	Chinandega	<i>Saccharum officinarum</i>	Dic 2009
Chaguite Grande	Jinotega	Jinotega	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mar 2010
Miraflor	Estelí	Estelí	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Oct 2009
Finca Chelol	Jinotepe	Carazo	<i>Coffea arábica</i>	May 2010
Centro experimental INTA-Sébaco	Sébaco	Matagalpa	<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Capsicum annum</i>	Mar 2010
Las Latas	Jinotega	Jinotega	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Ene 2010
Campos- UNA	Managua	Managua	<i>Zea mays</i>	Sep 2010

3.1.2. Procedimiento para aislar de *Trichoderma* spp

Cada muestra de suelo fue homogenizada y tamizada en un tamiz de 2 mm mesh, para eliminar piedras y partículas grandes de suelo o material vegetal, posteriormente se pesó 100 g de suelo el cual se homogenizó para tomar 1 g de suelo y realizar el proceso de aislamiento de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de *Trichoderma* spp se utilizó la técnica de dilución seriada descrita por (Lecuona, 1996). En un erlenmeyer con 99 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween-80, se depositó 1 g de suelo. La mezcla fue colocada en un agitador orbital por 24 horas para garantizar su homogenización. Se preparó diluciones 10^{-2} 10^{-3} y 10^{-4} y se pipeteó 1ml en platos petri conteniendo medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA Merck KGaA: 39g L^{-1}), esterilizado previamente a 1 bar de presión y 121°C por 20 minutos. Los platos Petri inoculados se mantuvieron en incubación a temperatura entre 23°C y 25°C por un periodo de 6 a 8 días. Las colonias que presentaron las características típicas de *Trichoderma* spp fueron re-aisladas en medio cultivo PDA; a partir de estos cultivos puros se prepararon montajes para observaciones en el microscopio con el fin de identificar *Trichoderma* a nivel de género.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp obtenidos a partir de las muestras fueron codificados con base a su origen. Estos aislamientos fueron caracterizados macroscópicamente y morfológicamente, utilizando las claves descritas por Samuels *et al.*, (2007).

3.2. Caracterización de aislados nativos de *Trichoderma* spp

La caracterización de los aislados de *Trichoderma* spp se hizo con base a las características macroscópicas y microscópicas (morfométricas) dentro las características macroscópicas de *Trichoderma* se determinó (aspecto de la colonia, y ritmo de crecimiento) así como con base a la viabilidad de las conidias y medida del ritmo de crecimiento de los aislados

3.2. 1. Características macroscópicas

Para la caracterización macroscópica de *Trichoderma* se prepararon medios de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) y EMA (Extracto de Malta Agar) en platos Petri. Por cada aislado se preparan 15 platos Petri con medios de cultivo, 5 con PDA, 5 con SDA y 5 con EMA. Estos fueron incubados a temperatura de 24°C a 25°C, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A partir de tercer día de incubación se hicieron observaciones visuales y se registró, Aspecto de la colonia (esporulante, polvoriento, producción de burbujas), crecimiento vertical, crecimiento circular, color de la colonia al iniciar y finalizar el crecimiento, color de la colonia por la parte superior del plato Petri y por la parte inferior.

3.2.2. Caracterización microscópicas (morfométricas)

Las estructuras reproductivas (conidias, conidióforos y fiálides,) de cada aislado de *Trichoderma* spp fueron observadas en el microscopio a partir de montajes de los aislados del hongo, determinando forma y tamaño de las estructuras reproductivas. Para determinar el tamaño de las estructuras se hicieron mediciones micrométricas, siguiendo la metodología descrita por (French y Hebert, 1982).

3.2.3. Viabilidad de conidias

La viabilidad de conidias se determinó mediante la evaluación de la germinación de las conidias, evaluando el tiempo medio de germinación de conidias, usando el método de medida de viabilidad de conidias descrito por (Monzón, 2001).

Se preparó un medio de cultivo agar-agua, estéril y se prepararon diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} de *Trichoderma* spp, posteriormente con una micropipeta se depositó una alícuota del medio en uno de los extremos de un porta objeto, seguidamente se depositó sobre cada alícuota del medio, una alícuota de la dilución 10^{-4} de los aislados de *Trichoderma* spp, finalmente este montaje se colocó en una cámara húmeda, la cual consistió en un plato petri con papel filtro humedecido y se mantuvo en un cuarto de crecimiento (Figura 1).

La observación de conidias germinadas se realizó a las 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas, utilizando el objetivo de 40x, observando como mínimo 200 conidias por cada aislado. Las variables que se midieron fueron: número de conidias germinadas, número de conidias no germinadas y el total de conidias.

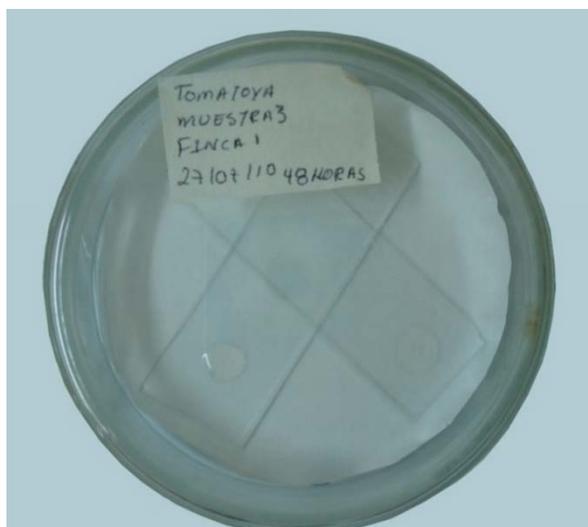


Figura 1. Montaje en cámara húmeda para la evaluación de la viabilidad de conidias de aislados de *Trichoderma* spp.

3.2.4. Ritmo de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp

Se midió el ritmo de crecimiento de cada aislado de *Trichoderma* spp en tres tipos de medios de cultivos, Papa Dextrosa Agar, Sabouraud Dextrosa Agar y Extracto de Malta Agar, en platos Petri de 90 mm. En el centro del plato petri se colocó el inóculo de *Trichoderma* spp, y se dejó en incubación a temperatura de 24°C a 25°C. La toma de datos del crecimiento radial se realizó cada 12 horas transcurrido este tiempo después de la inoculación se realizó la primera toma de datos del crecimiento radial, utilizando una regla milimetrada.

Las mediciones se realizaron siguiendo la metodología descrita por French y Hebert (1982) (Anexo 1). Esta metodología consiste en dibujar una cruz en la cara posterior del plato petri, indicando cuatro radios de 45 mm, a los cuales se les nombró con letras minúsculas (a, b, c y d) y sobre los que se midió el avance o crecimiento del hongo a intervalos de tiempo iguales. El centro de la cruz se nombró con la letra mayúscula "A", el cual representa el punto de inoculación del hongo a evaluar. Las mediciones se dejaban de realizar en cada plato, cuando el crecimiento del hongo alcanzaba el borde del plato petri, en al menos uno de los cuatro radios.

La variable que se midió fue ritmo de crecimiento promedio de *Trichoderma* spp en mm h⁻¹ y se calculó dividiendo el crecimiento total en milímetros entre el tiempo transcurrido en horas. Se utilizaron 5 repeticiones, considerando cada plato petri como en una repetición.

3.3. Competencia *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* sobre *Fusarium* spp

Este estudio consistió en evaluar la competencia de 10 aislados de *Trichoderma* sobre *Fusarium* sp. El patógeno *Fusarium* spp fue obtenido de muestras de tejido de tomate, aislado en el laboratorio de Micología de la Universidad Nacional Agraria, donde también se obtuvo el cultivo puro.

3.3.1. Pruebas de competencia *in vitro*

Cada uno de los aislados de *Trichoderma* spp fue evaluado contra *Fusarium* spp, Se establecieron cinco repeticiones tomando un plato Petri como unidad experimental en un diseño completamente al azar, los factores estudiados fueron: factor patógeno (*Fusarium* spp), factor antagonista (aislados de *Trichoderma* spp) y el factor tiempo

Se utilizó la técnica de cultivo dual descrita por (Howell, 2003) en un plato Petri con PDA se colocó en un extremo un disco de 4 mm de diámetro con micelio de *Fusarium* sp, el cual se dejó en crecimiento 72 horas antes que *Trichoderma*, como un periodo de acondicionamiento. Transcurrido éste periodo se sembró al lado opuesto, a una distancia de 5 cm entre ambos, un disco de 4 mm de diámetro con micelio de *Trichoderma* spp.

Como testigo se sembró individualmente en platos petri un inóculo de cada aislado de *Trichoderma* spp y un inóculo de *Fusarium* sp ambos hongos en platos petri separados. Se incubaron a temperatura de 24°C a 26°C, hasta que el crecimiento del antagonista o del patógeno cubriera toda la superficie del medio de cultivo.

3.3.2. Toma de datos

Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas. Los datos de competencia de los aislados de *Trichoderma* spp se obtuvieron midiendo el avance del radio de crecimiento micelial del patógeno, del antagonista y el testigo, para obtener una medida de radio de crecimiento en mm/h. La toma de datos en cultivo dual se dejó de tomar a las 72 horas, mientras que para el testigo de *Fusarium* se realizó hasta los 11 días.

También se clasificó el grado de micoparasitismo de los aislados de acuerdo a la escala propuesta por Royse y Ries (1978) (Cuadro 2). Cada 24 horas se realizaban observaciones, para determinar el tiempo en que los dos hongos entran en contacto entre sí, a los ocho días se aplicó la escala para determinar grado de micoparasitismo de los aislados.

Cuadro 2. Escala para clasificar el grado de micoparasitismo de aislados de *Trichoderma* spp (Royse y Ries, 1978).

Grado	Descripción del micoparasitismo	Cubrimiento de la superficie del medio por el antagonista (%)
1	El antagonista cubre totalmente el micelio del fitopatógeno	100%
2	El antagonista cubre 75% del micelio del fitopatógeno	75%
3	El Antagonista cubre 50% el micelio del fitopatógeno	50%
4	El Antagonista cubre 25% el micelio del fitopatógeno	25%

3.4. Efecto de aislados de *Trichoderma* spp sobre mal del talluelo en cultivo de tomate

En la finca donde se estableció el ensayo, se dio a conocer, que la incidencia de mal del talluelo siempre estaba presente en cualquier periodo de siembra, afectando en un porcentaje alto, la etapa de plántulas de tomate en condiciones de microinvernadero. El sustrato de siembra, que se usó para el ensayo fue el que el productor siempre había utilizado, por lo tanto se esperaba la ocurrencia natural de la enfermedad mal del talluelo.

Para determinar la efectividad de los aislados nativos de *Trichoderma* sobre la incidencia natural de mal del talluelo en tomate, se estableció un ensayo en condiciones de microinvernadero en el Municipio de Tisma-Masaya en el periodo comprendido Octubre – Noviembre 2010. Cada aislado de *Trichoderma* spp fue inoculado en un sustrato compuesto de suelo, abono orgánico compost piedra pómez, y ceniza de cascarilla de arroz. La descripción de los tratamientos evaluados se encuentra en el inciso 3.6. Como testigo relativo se utilizó Mancozeb 20 g por litro de agua y como testigo absoluto agua.

3.4.1. Preparación de suspensión de conidias de *Trichoderma* spp

Para preparar la suspensión con esporas de *Trichoderma* spp se tomó cultivo puro de 15 días de siembra en medio de cultivo PDA, mantenidos en platos Petri. La concentración de conidias se calculó usando la metodología descrita por (Monzón, 2000). Se utilizó la cámara Neubauer para el conteo de conidias y la suspensión se preparó a una concentración de 6.2×10^7 conidias por ml de agua, en 2000 ml, para ser aplicadas en 2.7 kilos de sustrato necesario para establecer cada tratamiento.

3.4. 2. Inoculación del sustrato

Para la aplicación de la suspensión de conidias de *Trichoderma* spp en el sustrato, se utilizaron 3 bombas de mochila de 20 ml, para aplicar los tratamientos biológicos, químico sintético (Mancozeb) y el testigo solo agua. Para la siembra de la semilla de tomate se hizo uso de bandejas plásticas de 96 depósitos con 53 cm de largo, 32 cm de ancho y 7 cm de alto.

3.4.3 Siembra de tomate

Para cada tratamiento se utilizó 5 bandejas, que se consideraron como repeticiones. En cada depósito se sembró 2 semillas de tomate variedad Mariana esta variedad de tomate fue seleccionada por el productor por presentar características de resistente a virosis. La fertilización se realizó a los 15 días después de la emergencia.

3.4.4 Toma de datos en microinvernadero

3.4.4.1 Porcentaje de semillas germinadas

A los 8 días, se contó el número de semillas germinadas por cada repetición. Para obtener el porcentaje de emergencia de plántulas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Emergencia de plántulas (\%)} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas sembradas}} \times 100$$

3.4.4.2. Porcentaje de la incidencia de mal de talluelo

La toma de datos de incidencia se realizó a los 8 días después de la emergencia de las plántulas, continuando a los 15, 24 y 36 días después de la emergencia (DDE). Contando el número de plantas enfermas con mal del talluelo, considerando como plantas enfermas aquellas que presentaron los síntomas característicos de mal de talluelo. Para obtener el porcentaje de incidencia de la enfermedad se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Inciencia (\%)} = \frac{\text{Número de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas evaluadas}} \times 100$$

Aislamiento de patógenos. Se tomó muestras del tejido enfermo con mal del talluelo y se realizó el análisis en el Laboratorio de Micología. Del material vegetativo se hicieron cortes de tejido enfermo, se lavaron con agua potable y después se sumergieron en alcohol etílico al 100% por 30 segundos, posteriormente fueron lavados con agua destilada estéril y se dejaron en papel absorbente a secar por 15 minutos. Los cortes de tejido fueron depositados en platos petri con medio de cultivo PDA, los que se colocaron en incubación a temperatura de 24 a 26°C.

A partir de los 5 días de incubación se realizaron montajes de las estructuras de los hongos, para observaciones en el microscopio para identificar los agentes causales de mal del talluelo. Para la identificación de los patógenos se utilizó las claves taxonómicas de (Barnett y Hunter 1998).

3.5. Variables evaluadas

Color y forma de las colonias de los aislados de *Trichoderma* spp
 Tamaño y forma de estructuras de reproductivas de *Trichoderma* spp
 Ritmo de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp
 Porcentaje de germinación de conidias de *Trichoderma* spp
 Ritmo de crecimiento del antagonista (RCA)
 Ritmo de crecimiento del patógeno (RCP)
 Grados de micoparasitismo de *Trichoderma* spp
 Porcentaje de semillas germinadas
 Porcentaje incidencia de mal del talluelo

3.6. Tratamientos evaluados

Los tratamientos evaluados tanto en condiciones *in vitro* y microinvernadero pertenecen a los aislados de *Trichoderma* spp. La cantidad de aislados evaluados fueron diez, ocho de ellos pertenecen a los aislados identificados y codificados en base a su origen, en el presente estudio, estos aislados son: T0701, T0702, T0703, T0704, T0301. T0705, T0501, T0201, dos aislados de *Trichoderma* pertenecen a la colección de cepas del Laboratorio de hongos entomopatogenos de la UNA los cuales son: T0501H, T1201. En condiciones de microinvernadero se utilizaron dos

testigos, como testigo relativo se utilizó Mancozeb y como testigo absoluto agua. La información de los aislados identificados en este estudio se detalla en el (cuadro 3) de los resultados.

3.7. Análisis de los datos

Se realizó análisis descriptivos para grados de micoparasitismo, para las características macroscópicas y morfométricas de tamaño y forma de estructuras reproductivas de los aislados de *Trichoderma* spp se utilizaron las claves taxonómicas de Samuels *et al.*, (2007).

Las variables, porcentaje de germinación de conidias, ritmo de crecimiento del antagonista (RCA), ritmo de crecimiento del patógeno (RCP), porcentaje de plantas germinadas, e incidencia de mal del talluelo fueron analizadas mediante análisis de varianza. Previamente las variables ritmo de crecimiento y porcentaje de germinación de conidias fueron transformadas mediante $\sqrt{(y + 0.5)}$ y Arcseno (\sqrt{y}) respectivamente. Al porcentaje de germinación de conidias se le hizo además análisis de Regresión lineal simple, para determinar a qué factores estaba relacionado el porcentaje de germinación. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.1. El Análisis de Varianza se hizo considerando un arreglo de parcela dividida y separación de medias según Tukey (α : 0.05).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hongo *Trichoderma* spp fue aislado de la mayoría de muestras colectadas, de las ocho localidades muestreadas. Únicamente de las localidades Sébaco (Matagalpa), Las Latas (Jinotega) y en campos de la Universidad Nacional Agraria (Managua) no se obtuvieron aislados. Se obtuvieron ocho aislados los cuales fueron considerados como aislados nativos, debido a que no existía ninguna aplicación de productos a base de *Trichoderma* en los lugares muestreados.

La localidad Tomatoya fue de donde se obtuvo la mayor cantidad de aislados, las parcelas muestreadas presentaban siembra en policultivos, lo que pudo haber favorecido la estabilidad del suelo y la riqueza de la microfauna en especial la presencia de *Trichoderma*, en un estudio realizado para determinar la diversidad de hongos endófitos y la población de nematodos, en seis sistemas de producción de banano y plátano orgánico y convencional en sistema monocultivo y policultivo se encontró mayor riqueza de hongos endófitos, en el sistema policultivo, que en el sistemas en monocultivo (Meneses *et al.*, 2003).

Cuadro 3. Aislados de *Trichoderma* spp colectados en el presente estudio y agregadas al cepario del laboratorio de hongos entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria Octubre 2009 – Septiembre 2010

Código	Localidad	Departamento	Cultivo	Fecha de colecta
T0701	Tomatoya	Jinotega	Allium cepa, Brassica oleracea var. Capitata, phaseolus vulgaris, Lactuca sativa	Ene 2010
T0702				
T0703				
T0704				
T0301	El Viejo	Chinandega	Saccharum officinarum	Dic 2009
T0705	Chagüite grande	Jinotega	Solanum lycopersicum	Mar 2010
T0501	Miraflor	Estelí	Brassica oleracea var. capitata	Oct 2009
T0201	Jinotepe	Carazo	Coffea arábica	May 2010

4.1. Caracterización de aislados de *Trichoderma* spp

4.1.1. Características macroscópicas

Las características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* spp, en tres medios de cultivo PDA, SDA y EMA se describen en el (cuadro 4).

Las características de la colonia de *Trichoderma* spp en medio de cultivo PDA, coinciden con las descritas por Rodríguez (2002), León (2012), Páez (2006) y Suárez *et al.* (2008), quienes

observaron en sus aislados, colonias con bordes regulares, de crecimiento rápido, inicialmente de color blanco, tornándose verdes posteriormente, hasta finalmente adoptar verde oscuro con micelio con halo de color blanco.

Las características más importantes de estos aislados de *Trichoderma*, para el uso en producción masiva, fueron el crecimiento totalmente en la superficie del medio, con abundante esporulación, y facilidad para ser desprendida del medio, estas características fueron observadas en PDA.

Cuadro 4. Características macroscópicas de aislados de *Trichoderma* spp en tres medios de cultivo PDA, SDA y EMA

Características	PDA	SDA	EMA
Color inicial (3 días de crecimiento)	Blanco, posteriormente de color verde	Blanco algodonoso, posteriormente verde intenso	Amarillo con aspecto algodonoso, posteriormente verde amarillo
Esporulación	Abundante	Abundante	Poca esporulación
Masa micelial	Aspecto húmedo, con facilidad para desprenderse	Húmeda moderadamente suelta en la superficie del medio	Aspecto húmedo, adherido al medio, colonias menos densas en comparación con PDA y SDA
Color de la colonia vista frontal del crecimiento	Verde con micelio blanco	Verde intenso con micelio blanco	Verde claro y amarillo en el centro micelio blanco hacia borde
Color de la colonia vista posterior del crecimiento	Verde amarillo claro	Verde claro en el centro y amarillo hacia los bordes Figura	Verde claro con micelio blanco hacia los bordes
Crecimiento	Circular concéntrico	Vertical que cubre todo el plato	Circular

Las características correspondientes al aspecto de la masa micelial, color de las colonias, tanto en vista frontal y posterior, en los medios de cultivos PDA, SDA Y EMA pueden apreciarse en la figura. (Figura 2).

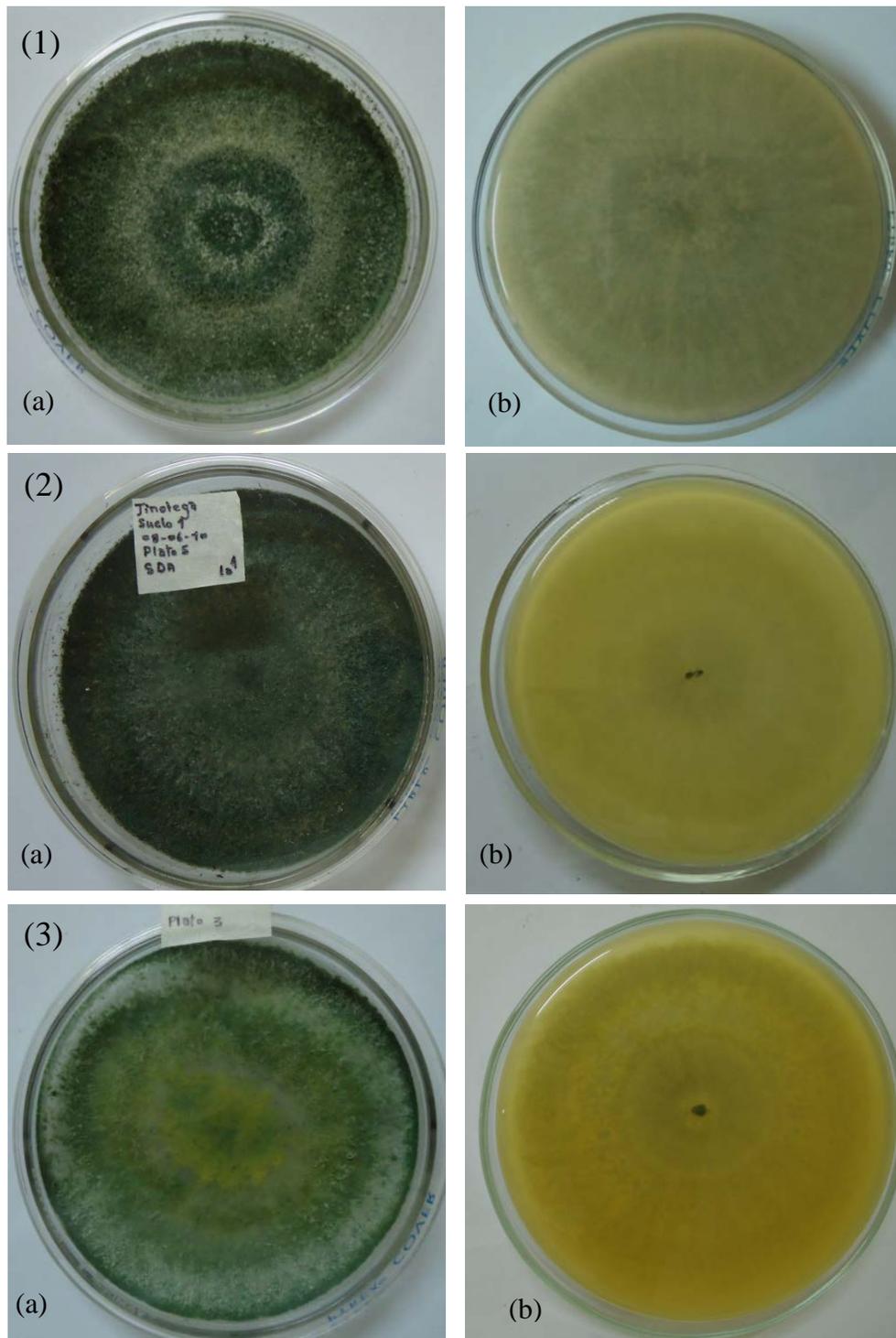


Figura 2. Crecimiento y color de la colonia de *Trichoderma* spp en medios de cultivo PDA (1), SDA (2) y EMA (3), a los 3 días de incubación. Vista frontal del crecimiento (a) y vista posterior (b).

4.1.2. Características morfométricas

Las características morfométricas de todos los aislados de *Trichoderma* spp obtenidos, se corresponden con las detalladas en las claves taxonómicas descritas por Samuels *et al.*, (2007).

Los Conidióforos observados son hialinos, con paredes lisas, rectos o doblados, muy ramificados; las primeras ramificaciones nacen formando ángulos rectos o doblados un poco hacia el ápice. Típicamente en forma de ramas alternas o pareadas, los conidióforos tienen entre 150- 150.5 μm de largo (Figura 3 a).

Las fiálides son subglobosas, delgadas en la base, hinchadas en la parte media y estrecha en el ápice. Las dimensiones oscilaron entre 6 -7-7.5 a 3.5 μm de largo y 2.5 μm de ancho en la base, formando grupos de 3 a 2 fialides, aunque también se encontraron solitarias y ubicadas en la parte terminal sosteniendo grupos de conidias o pegadas en la base, de la hifa. (Figura 3 b).

La forma de las **conidias** fue de sub-globosas a globosas y de color verde, con un tamaño de 2.5, 3, 3.3 a μm de largo y 2.5, 3, 2.7 μm de ancho, ubicadas en la punta de la fiálide solas o agrupadas (Figura 3 c).

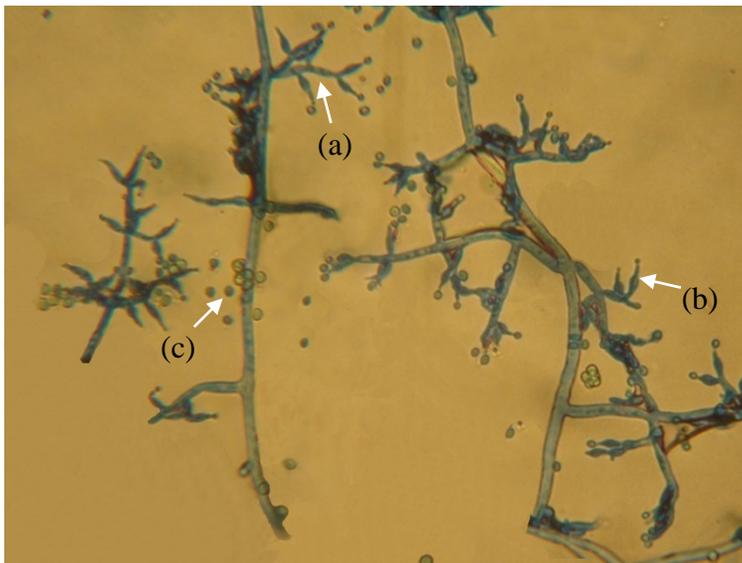


Figura 3. Características morfológica de *Trichoderma* spp. Conidióforo (a), Fiálides (b), Conidias, (c). (40X).

Cuadro 5. Caracterización morfométrica en medio PDA de aislados nativos de *Trichoderma* spp obtenidos de suelos de diferentes regiones.

Cepa	Color de las colonias	Tiempo de crecimiento (Hrs)	Forma de conidias	Tamaño de estructuras (µm)		
				Conidias (largo x ancho)	Fiálides (largo x ancho en la base)	Conidióforos (Largo)
T0701	Verde claro algodonoso	60	Subglobosas a globosas	2.5 x 2.5	7.5 x 2.5	150
T0703						152
T0704				150		
T0705				161		
T0702		48		153		
T0301				150		
T0501				151		
T0201				151		

Color de colonias: Todas las cepas presentaron colonias verde claro, de aspecto algodonoso.

Tiempo de crecimiento: El crecimiento hasta cubrir toda la superficie del plato (90 mm) fue de 60 horas para los aislados T0701, T0703, T0704 y T0705. En cambio para las cepas T0702, T0301, T0501 y T0201 fue de 48 horas. La forma de las conidias en todos los aislados fue globosa a subglobosa. Se encontró diferencias morfológicas entre los aislados en el tamaño de las conidias, fialides y conidióforos

4.1.3 Viabilidad de conidias

El inicio de la germinación se observó a partir de las 24 horas en el aislado T0501, mientras que en el resto de aislados se observó a las 36 horas. Hubo diferencia significativa entre fecha ($P=0.0001$) (Anexo 2). A las 72 horas los aislados T0701, T0703, T0704, T0705, T0501, T0201 alcanzaron entre el 95 a 100% de germinación de conidias (Figura 4).

En promedio la mayor germinación de conidias se observó entre las 48 a 72 horas, lo que nos indica que estos aislados en poco tiempo pueden alcanzar el 100% de germinación de conidias.

Según Monzón (2000) la viabilidad de conidias debe ser cercana al 100%, ya que la efectividad del hongo en el campo depende de la capacidad que este tiene de colonizar un sustrato y de infectar al patógeno, lo que a su vez está determinado por su viabilidad. Conocer el tiempo y el porcentaje de germinación de un aislado es importante para obtener la concentración efectiva del hongo a partir de la cual se preparan las dosis a utilizar en el campo.

La germinación a las 24 horas del aislado T0501 se consideró una germinación temprana en comparación con los demás aislados que iniciaron a las 36 horas, esta característica puede ser considerada como de importancia en la virulencia de la cepa, los microorganismos con rápida

multiplicación dentro del hospedante son generalmente más virulentos que los de multiplicación lenta Lecuona y Alves (1996).

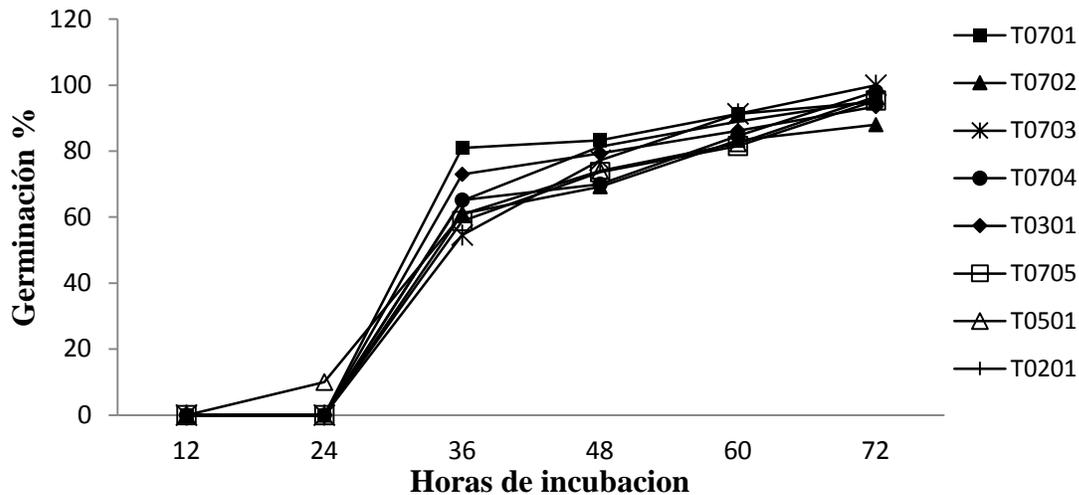


Figura 4. Porcentaje de viabilidad de conidias de los aislados de *Trichoderma* spp. Observaciones cada 12 horas (40X).

En todos los aislados de *Trichoderma* se observó que la germinación de las conidias aumentó a medida que transcurrió el tiempo de incubación, lo que nos indica que la germinación de conidias estuvo más relacionada con el tiempo de incubación, en la mayoría de los aislados. El análisis de regresión lineal simple, indica que una vez que inició la germinación, esta se incrementó a una velocidad que oscila entre 19.89 y 22.77 % por cada hora transcurrida (Figura 5).

La mayor velocidad de germinación se observó en el aislado T0703 con 22.77%, la menor velocidad de germinación se observó en el aislado T0702 con 19,89% (Figura 5). Aunque el aislado T0501 inició a las 24 horas la germinación con un porcentaje del 16.7%, su velocidad de germinación a las 72 horas fue similar a los demás aislados.

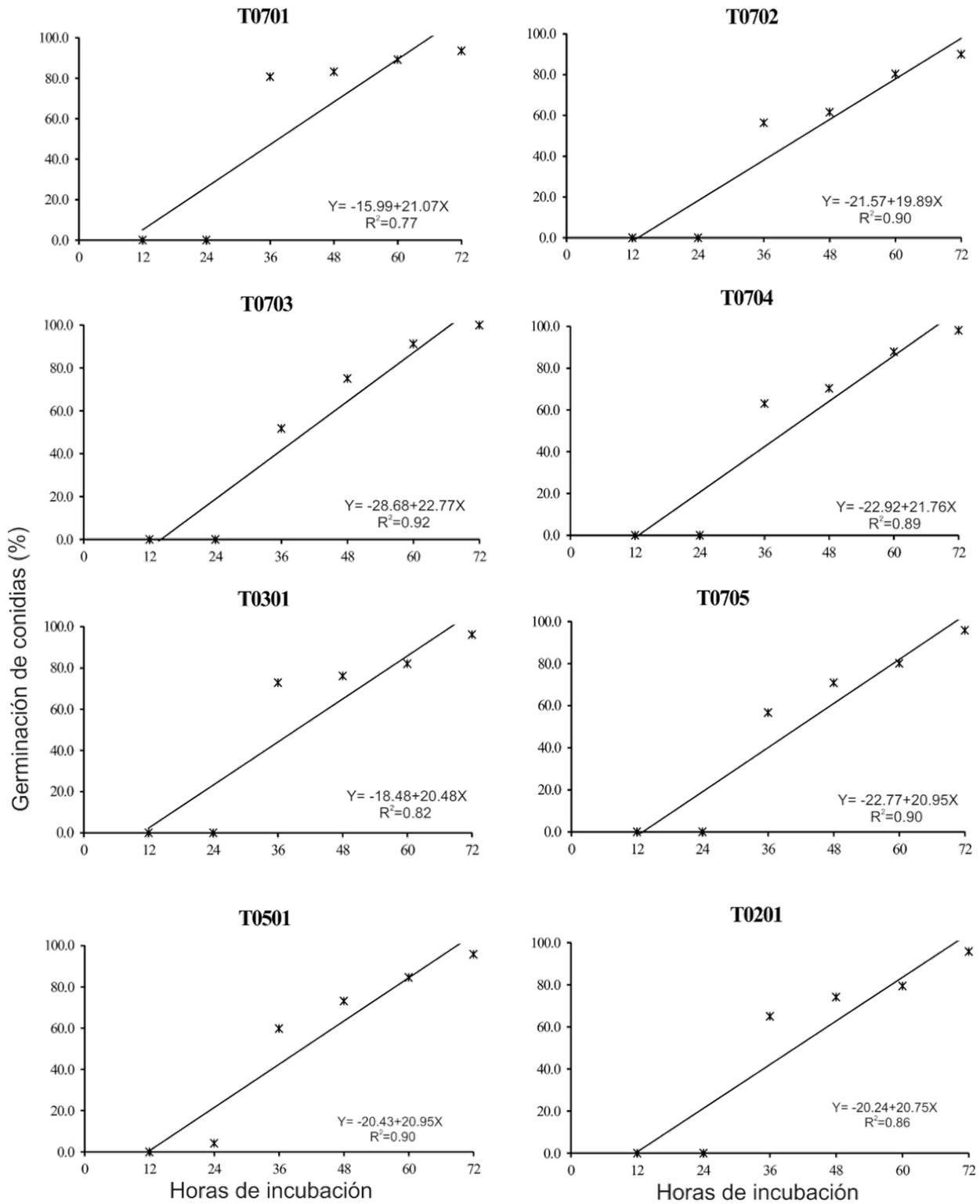


Figura 5. Dinámica de germinación de ocho aislados de *Trichoderma* spp. Observaciones cada 12 horas (40X).

4.1.4. Ritmo de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp

Al analizar el ritmo de crecimiento en medio de cultivo, PDA, SDA y EMA se encontró que hay diferencias significativas entre horas de incubación ($P= 0.0001$) y entre aislados ($P= 0.0001$); sin embargo se encontró que la interacción entre ambos factores resultó significativa ($P= 0.0001$), lo que indica que los aislados presentaron ritmo de crecimiento diferente durante algunas de las horas evaluadas. (Anexo. 5, 7, 9).

En medio de cultivo PDA el aislado T0201 desarrolló un radio de crecimiento promedio de 0.69 mm/h a las 48 horas, este aislado se caracterizó por presentar crecimiento uniforme en los cuatro radios, lo que le permitió sobresalir con mayor promedio de crecimiento, en comparación con los aislados T0301, T0702, T0501 que tuvieron un crecimiento promedio de 0,65, 0.57, 0.52 mm/h a las 48 horas, estos aislados se caracterizaron por presentar ritmo de crecimiento diferente sobre los cuatro radios, pero se consideró que el tiempo promedio de crecimiento fue a las 48 horas, porque al menos, uno de los cuatro radios completó su crecimiento de 45mm a esa hora.

Los aislados T0704, T0703, T0705, T0701 sus radios de crecimientos fueron similares entre sí a las 60 horas alcanzando un promedio de 0.61, 0.57, 0.65, 0.60 mm/h (Figura 6). Estos aislados son originarios de una misma localidad por lo tanto esta característica pudiera estar ligada a su origen.

En relación al tiempo promedio de crecimiento definimos que en medio de cultivo PDA los aislados T0201, T0301, T0702, T0501 tienen un tiempo promedio crecimiento de 48 horas con un radio de crecimiento promedio de 33 mm. Los aislados T0704, T0703, T0705, T0701 tienen un crecimiento promedio de 24 mm a las 60 horas, estas características coinciden con las claves taxonómicas descritas por Samuels *et al.*, (2007) quien describe que el género *Trichoderma* tiene un periodo de crecimiento en PDA de 60 a 72 horas.

Estos resultados nos permiten seleccionar el medio de cultivo PDA para aquellos aislados en donde el tiempo de crecimiento promedio está entre las 40 a 60 horas con radios de crecimiento entre los 24 a 33 mm de crecimiento.

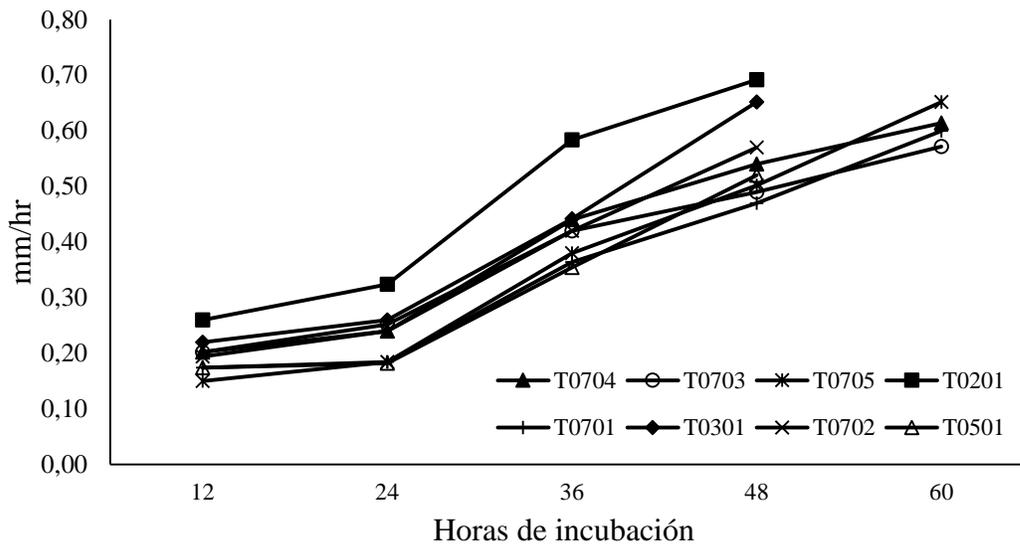


Figura 6. Ritmo de crecimientos de aislados de *Trichoderma* spp en medio de cultivo PDA

En medio de cultivo SDA el aislado T0301 desarrolló un radio de crecimiento promedio de 0.73 mm/h este aislado se caracterizó por presentar crecimiento uniforme en los cuatro radios superando con mayor radio de crecimiento en menor tiempo al resto de aislados. Los aislados T0703, T0704, T0201 su tiempo promedio de crecimiento fue de 60 horas desarrollando en este periodo radios de crecimientos entre 0.59, 0.67 mm/h.

Los aislados T0701, T0702, T0705 su crecimiento promedio fue en 72 horas con radios de crecimiento promedio de 0.51, 0.72, 0.61 mm/h. Siendo el aislado T0501 que tardó 84 horas para alcanzar su máximo crecimiento (Figura 7). En medio de cultivo SDA el ritmo de crecimiento de los distintos aislados varió en cuanto al tiempo requerido para alcanzar su máximo crecimiento, lo que nos confirma que cada aislado tiene características propias de crecimiento y preferencias por determinado medio de cultivo.

El tiempo de crecimiento promedio del aislado T0301 en SDA fue a las 48 horas con un radio de crecimiento promedio de 33 mm. Los aislados T0701 T0702, T0703, T0704, T0705, T0201, su tiempo de crecimiento promedio estuvo entre las 60 a 72 horas con radios de crecimiento promedio de 37 mm. Estos aislados se caracterizaron por presentar crecimiento en tiempos iguales en PDA y SDA, concluyendo que esta característica pudo haberse debido a su lugar de origen exceptuando al aislado T0201 que tiene otro origen.

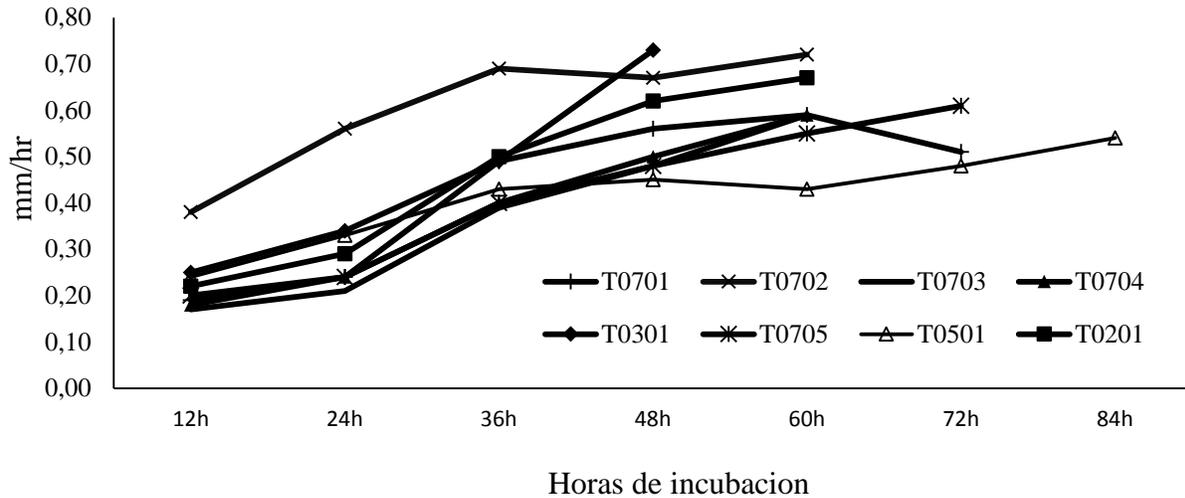


Figura 7. Ritmo de crecimientos de aislados de *Trichoderma* spp en medio de cultivo SDA

En medio de cultivo EMA, el ritmo de crecimiento en todos los aislados fue observable a partir de las 24 horas. El aislado T0702 fue el que creció en menor tiempo alcanzando su máximo crecimiento a las 48 horas, este aislado tuvo un crecimiento de radio mayor a las 24 horas y le permitió superar a los demás aislados alcanzando su crecimiento total a un ritmo promedio de 0.52 mm/h a las 48 horas.

Los aislados T0701, T0703, T0704, T0301, T0705, presentaron un crecimiento similar desde las 36 horas completando su máximo crecimiento a las 60 horas, con radios de crecimiento de 0.52, 0.57, 0.54, 0.75, 0.70, 0.59 mm/h. Los aislados T0501 y T0201 su crecimiento fue más lento en este tipo de medio, alcanzando su máximo crecimiento a las 72 horas con radio de crecimiento promedio de 0.59 mm/h para ambos (Figura 8).

Todos los aislados desarrollaron radios de crecimiento menores en las primeras 12 horas, en los medios de cultivo SDA y PDA; incrementando su ritmo de crecimiento a partir de las 24 a las 48 horas, en tal grado que algunos de los aislados completaron su máximo crecimiento en este periodo de tiempo.

Se observó que en medio de cultivo EMA los aislados no presentaron crecimiento radial a las 12 horas, y que solamente el aislado T0702 fue el que tuvo crecimiento más rápido en este medio, con un periodo de crecimiento de 48 horas. Se pudo observar que en el medio EMA la mayoría de aislados alcanzaron su máximo crecimiento entre las 60 y 72 horas, caso contrario sucedió en el medio de cultivo PDA donde encontramos que cuatro de los ocho aislados finalizaron su crecimiento a las 48 horas.

Las características del ritmo de crecimiento encontradas en los diferentes aislados se fundamentan con lo expresado con otros autores en que *Trichoderma* es de fácil aislamiento y de crecimiento

rápido en muchos medios de cultivos y sustratos (Well, 1989). La tasa de crecimiento es una de las características principales a tomar en cuenta, para evaluar un agente de control biológico, el crecimiento rápido de un aislado es una característica importante al momento de realizar una reproducción masiva del hongo en sustratos sólidos y para la obtención de un producto formulado, con intenciones de uso en programas de control biológico de hongos fitopatógenos.

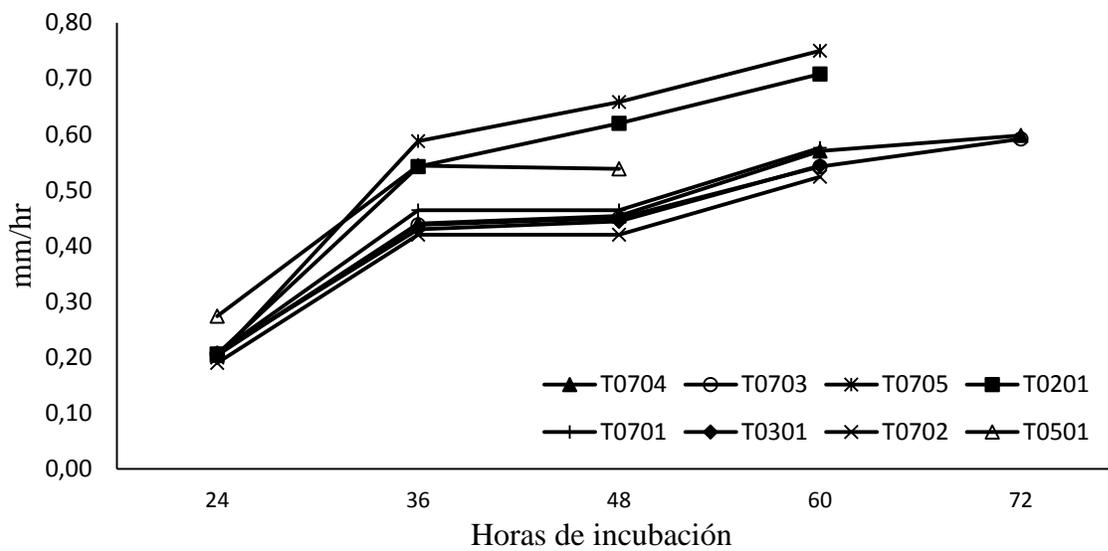


Figura 8. Ritmo de crecimientos de aislados de *Trichoderma* spp en medio de cultivo EMA

4.2. Competencia *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* sobre *Fusarium* spp

En las pruebas de competencia mediante la técnica de cultivo dual se encontró diferencias significativas para el ritmo de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp ($P= 0.0001$) a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento. (Anexo. 12, 13, 15). Para el patógeno *Fusarium* spp se encontró diferencia significativa en su ritmo de crecimiento ($P=0.0001$) a las 72 horas. (Anexo. 16)

Todos los aislados de *Trichoderma* spp presentaron radios de crecimiento superiores a los de *Fusarium* spp a las 24, 48 y 72 horas, pero solo se observa diferencia en la disminución del radio de crecimiento de *Fusarium* spp a las 72 siendo en este periodo donde se observó total inhibición del crecimiento *Fusarium* spp por los aislados T1201, T0501H, T0704, T0703, T0301, T0701, en estos aislados se observó una acción de competencia significativa lo que provocó, la reducción del ritmo de crecimiento de *Fusarium* spp a cero, en cambio el testigo mantuvo su ritmo de crecimiento de 0.38 mm/h completando su crecimiento total de 45mm sobre sus radios hasta los 11 días (Cuadro. 5).

Suarez (2008) encontró radios de crecimientos superiores en los aislados de *Trichoderma* al confrontarlos con *Fusarium solani* y encontró diferencias significativas a los 10 día de evaluación. *Trichoderma* se caracteriza por tener un rápido crecimiento, esta característica fue evidente en los

aislados T1201, T0501H, T0704, T0703, T0301, T0701 que mostraron su capacidad de competencia frente a *Fusarium* spp. Borrero y Silva (2005) califican a la velocidad crecimiento de *Trichoderma* spp como una importante cualidad de antagonismo, compitiendo eficientemente por el sustrato. Benítez *et al.* (2004) expresa que la competencia más común de *Trichoderma* spp es por nutrientes, oxígeno o espacio y, por último, la desactivación de las enzimas de los patógenos.

Cuadro 6. Radios de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp y *Fusarium* spp en pruebas de competencia a las 72 horas de incubación

Aislados	Radio de crecimiento (mm h)			
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	Testigo de <i>Trichoderma</i> spp.	Testigo de <i>Fusarium</i> spp
T1201	0.65 a	0.00 b	1.04 b	0.38 a
T0501H	0.62 a b	0.00 b	1.06 b	0.38 a
T0704	0.61 a b	0.00 b	1.04 b	0.38 a
T0703	0.61 a b	0.00 b	1.25 a	0.38 a
T0301	0.60 a b	0.00 b	1.25 a	0.38 a
T0501	0.59 a b	0.32 b	1.25 a	0.38 a
T0201	0.59 a b	0.32 b	1.25 a	0.38 a
T0702	0.58 a b	0.32 b	1.25 a	0.38 a
T0705	0.56 b	0.33 a	1.25 a	0.38 a
T0701	0.56 c	0.00 b	1.25 a	0.38 a

Medias con igual letra en la misma columna no difieren significativamente, según Tukey ($\alpha = 0.05$)

4.2.1. Grados de micoparasitismo de aislados de *Trichoderma* spp sobre a *Fusarium* spp

A los tres días de crecimiento los aislados de *Trichoderma* spp T1201, T0501H, T0704, T0703, T0301, T0701 entraron en contacto con la colonia de *Fusarium* spp. Los aislados T0701, T0702, T0704, T0301, T0705, T0201 sobrecubrieron la colonia de *Fusarium* spp a los 8 días de crecimiento, tiempo en que el antagonista cubrió por completo el micelio del fitopatógeno (Figura 9 b) lo que corresponde al grado 1, de la escala para evaluación del antagonismo descrita por Royse y Ries (1978).

Los aislados T0501, T0703, T0501H, T1201 presentaron grado de micoparasitismo 2; (Figura 10) estos aislados no sobrecrecieron por completo a *Fusarium* spp. Michel (2001) encontró sobrecrecimiento de las colonias de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *F. oxysporum* a los 3 a 6 días y también encontró contacto sobre *F. subglutinans* a los 3 a 10 días; mientras que Solano (2004) encontró contacto con *F. oxysporum* a los 3 a 4 días y con *F. subglutinans* a los 2 a 3 días. Michel (2001) indica que entre menor sean los días al contacto, es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagonico y menor la resistencia del fitopatógeno.

Los aislados T0501H, T1201, T0501, T0703, fueron los primeros que entraron en contacto con la colonia de *Fusarium* spp con radios de crecimientos mayores, pero presentaron grado de micoparasitismo 2. Estos resultados coinciden con estudios hecho por Hoyos (2008), quien

encontró aislado de *Trichoderma*, con grado de antagonismo más bajo, que otros, siendo esta, una característica que, puede variar de un aislado a otro dentro de la misma especie, por tanto, no se puede generalizar al definir, que determinadas especies de *Trichoderma* son buenas antagonistas, ya que esto depende del aislamiento en particular y su capacidad de atacar de forma concreta a cepas determinadas de hongos fitopatógenos.

Trichoderma es un organismo antagonista de hongos fitopatógenos por su acción de micoparásito, la cual es definida como el uso del patógeno como alimento por el antagonista, en el que generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que rompen o digieren las paredes de los hongos patógenos; la capacidad de producción de antibióticos (viridina, gliotoxina, gliovirina y peptaiboles) y sustancias tóxicas para otros organismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 mg L^{-1}); (Harman, 2000, Howell, 2006;).

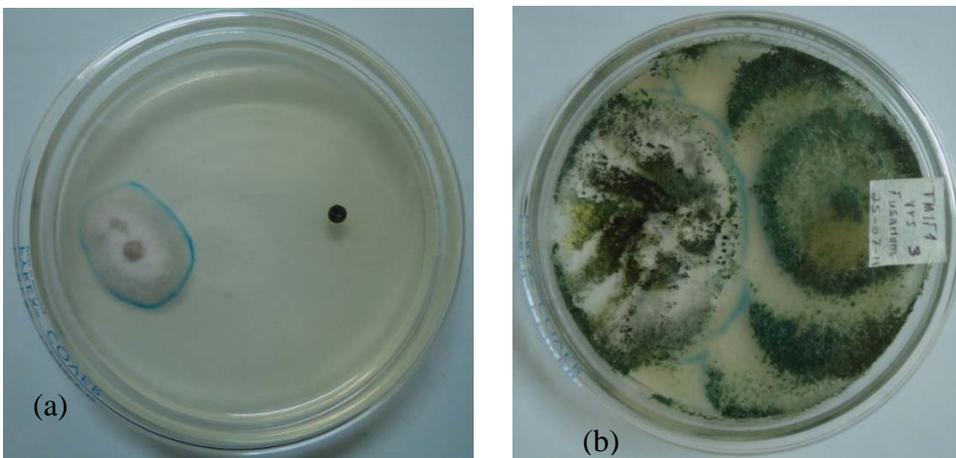


Figura 9. Confrontación de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* spp. a) Cultivo dual de *Trichoderma* y *Fusarium*; b) Sobrecrecimiento de *Trichoderma* spp en la colonia de *Fusarium* spp a los 8 días de crecimiento.

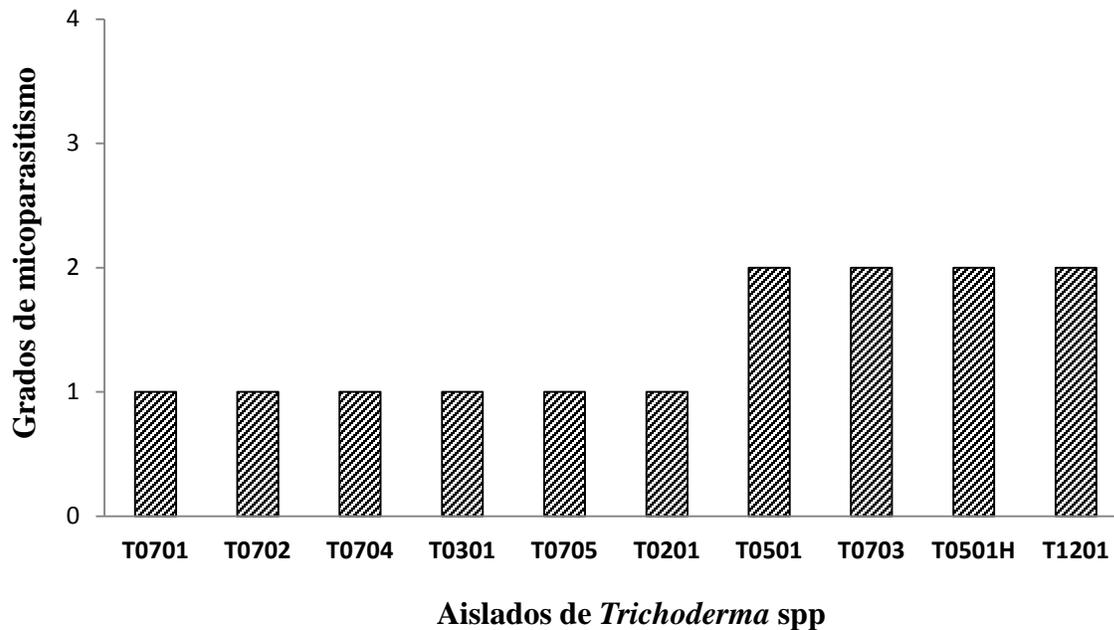


Figura 10. Grados de Micoparasitismo de aislados de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* spp a los 8 días de crecimiento

4.3. Efectos de aislados de *Trichoderma* spp sobre mal del talluelo en cultivo de tomate

4.3.1. Porcentaje de semillas de tomate germinadas

Al evaluar el porcentaje de germinación de las semillas de tomate se encontró que el porcentaje de germinación de semillas de tomate varió entre el 70 y 86% en todos los tratamientos. Durante el periodo de germinación las plántulas no presentaron síntomas de mal del talluelo. Se observó que la baja germinación se debió a características propias de la variedad y a la permanencia de las bandejas en cuarto oscuro por más de 4 días.

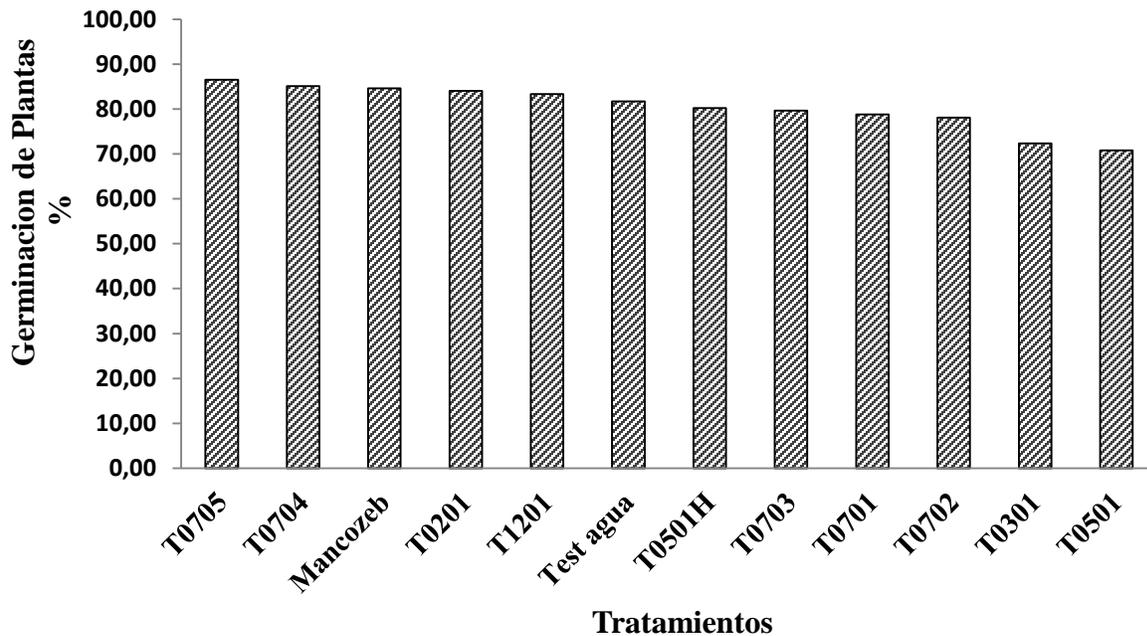


Figura 11. Porcentaje de germinación de plantas de tomate Variedad Mariana Tisma – Masaya Octubre 2010.

4.3.2. Identificación de patógenos en plántulas de tomate

EL aislamiento de patógenos realizado a partir, de las muestras de tejido con síntomas de mal del talluelo en las plántulas del cultivo de tomate, dieron como resultado el crecimiento de los hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Sclerotium*, estos resultados coinciden con los descritos por Gonzales *et al.*, (2013) que reportó a *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* como los causantes de los síntomas del mal del talluelo en plántulas de tomate.

4.3.3. Porcentaje de incidencia mal del talluelo en tomate

Hubo diferencias significativa entre fechas ($P= 0.0009$) y entre tratamientos ($P= 0.0005$). Los aislados T0301 y T0501H, fueron los que presentaron el menor porcentaje de incidencia de mal del talluelo con un 1.28 % y 1.35 % en promedio (Figura 12). En las tres fechas de muestro ambos tratamientos tuvieron un porcentaje de incidencia similar. El tratamiento T0703 presentó el mayor porcentaje de incidencia con 4%. En los tratamientos T0702, el testigo (agua), T1201, T0701, T0501, T0705, T0704, y Mancozeb, el porcentaje de incidencia varió de 3.57 a 1.60% en promedio.

La acción controladora de los aislados T0301 y T0501H fue efectiva sobre la incidencia natural de mal del talluelo, el porcentaje de incidencia disminuyó en un 1.6 % y 1.2 % más, al compararlos con el efecto de Mancozeb. El principal síntoma de mal del talluelo que presentaron las plantas fue estrangulamiento en la base del tallo (Anexo 20). *Trichoderma* spp ha demostrado su eficiencia en

el control de fitopatógenos que atacan partes aéreas y de la raíz de las plantas Nelson, (1991). El género *Trichoderma* está catalogado entre los agentes de control biológico más eficientes debido al amplio espectro antagonista que presentan; las enzimas extracelulares que producen con actividad antibiótica, el micoparasitismo y la por la habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas, entre otros mecanismos de acción (Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Benítez *et al.*, 2004).

Uno de los principios del control biológico es el empleo del agente de control en los momentos en que los niveles poblacionales de la plaga no sean elevados (Rodríguez, 2001). Al igual que otros agentes biológicos de control, *Trichoderma* puede ser abrumado por una fuerte presión de la enfermedad, por lo tanto, estos antagonistas deberán utilizarse estrictamente como una medida preventiva (Harman, 2000). En sistemas de producción protegida, el uso de *Trichoderma* en la obtención de plantas, es una práctica usada en diferentes países, garantizando plantas de alta calidad (Martínez, 2013).

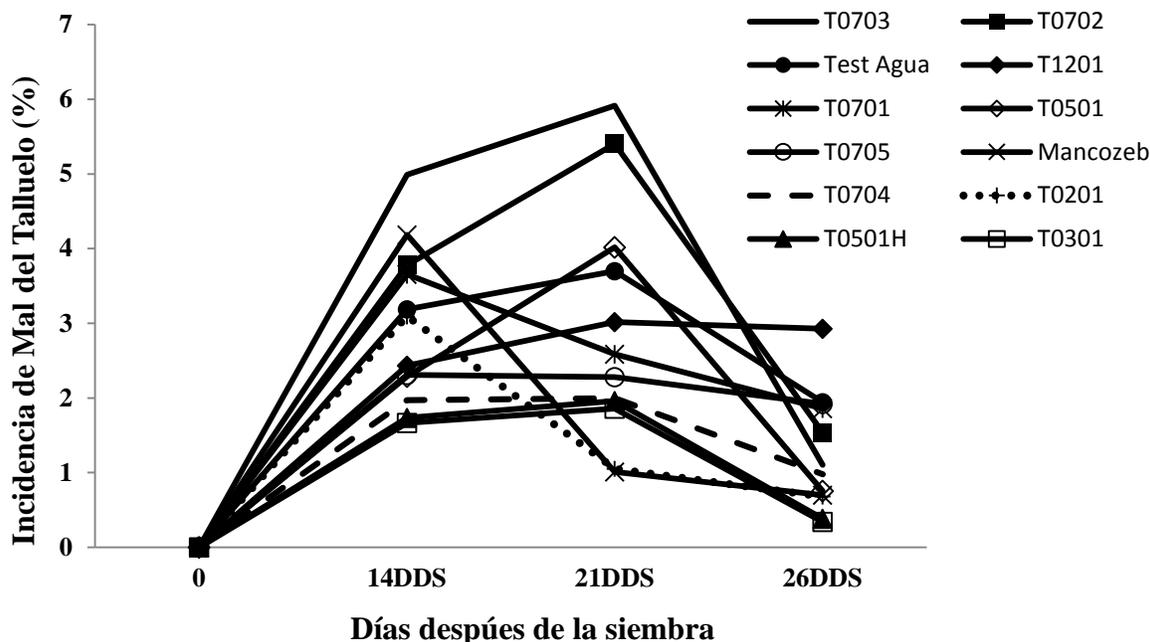


Figura 12. Porcentaje de incidencia mal del talluelo en cultivo de tomate en condiciones de microinvernadero Tisma – Masaya Octubre 2010.

V. CONCLUSIONES

Se obtuvieron ocho aislados nativos de *Trichoderma* spp, provenientes de muestras de suelo de Tomatoya Jinotega, Miraflores Estelí, El Viejo Chinandega y Jinotepe Carazo.

Los aislados *Trichoderma* spp tuvieron un periodo de tiempo de germinación entre las 24 a 36 horas de incubación, completando su máximo porcentaje de germinación del 95 al 100% a las 72 horas.

Todos los aislados de *Trichoderma* tuvieron el menor tiempo de crecimiento en el medio de cultivo PDA entre las 48 a 60 horas.

Se comprobó que algunos de los aislados de *Trichoderma* spp tienen capacidad de competencia y antagonismo *in vitro* frente a *Fusarium* spp.

El efecto de los aislados de *Trichoderma* spp sobre la incidencia de mal del talluelo fue efectiva, sobresaliendo con mayor potencial controlador los aislados T0301 y T0501H en estos aislados se presentó el menor porcentaje de incidencia de 1.28 % y 1.35 % en promedio.

Los aislados que resultaron con mayor potencial controlador de mal del talluelo, serán utilizados en producción masiva, en el laboratorio de control biológico de la UNA, para su uso como bioplaguicidas en el campo.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de los aislados T0301 y T0501H en el manejo de hongos causantes del mal del talluelo ya que resultaron ser las más promisorias en la disminución de la incidencia de dicha enfermedad.

Realizar estudios de identificación con pruebas moleculares de los diferentes aislados obtenidos, para llegar a la caracterización a nivel de especie.

Realizar pruebas de antagonismo *in vitro* con patógenos de suelo, para seleccionar aislados específicos a determinados patógenos.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2009. Fitopatología, 2ª Ed. Limusa, México. pp. 273 – 530.
- Berkeley, MJ. 1994. Control biológico. In Principios Básicos de Fitopatología. 2 ed. Honduras. Zamorano. Pag 270-287.
- Benítez, T; Rincón, A M; Limón, M C; Codon, A C. 2004. Biocontrol of Trichoderma strains. Int. Microbiol. 7(4): 249-260.
- Borrero, CA; Silva, HMR. 2005. Efectos de Trichoderma (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del pie de monte llanero (en línea). Orinoquia. 9(2): 6-14.
- Berrocal M, SE. 2015. Importación de plaguicidas y peligros en salud en América Central durante el periodo 2005-2009. Uniciencia 29 (2): 84-106.
- CENAGRO. 2011. Manual de usuario base de datos. Instituto Nacional de información de desarrollo INIDE. Consultado 30 ene. 2013. Disponible en <http://www.inide.gob.ni/Cenagro/BaseIVCenagro/Manual%20BD%20IV%20CENAGRO.pdf>
- CIDEA (Centro de Inversión, Desarrollo y Explotación de Agronegocios. 2004. Manual del cultivo de Tomate. San Salvador. 30p.
- Córdova, MI. 2003. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* fsplycopersici por Trichozam® *Trichoderma harzianum* y Micoral® micorriza vesículoar buscular en el cultivo de tomate. Tesis Ing. Agr. Zamorano Honduras. 43p.
- Corriols, M; Silva, D; Marin, J; Berroterán, J; Lozano, LM; Martínez, J. 2001. Incidencia de intoxicaciones agudas por plaguicidas y estimación del subregistro en Nicaragua. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 56p.
- Cruz G, RM; González G, J; Sánchez, C P. 2013. Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. Nutricion hospitalaria. 28 (1): 6-15.
- Ezziyyani, M; Pérez, C; Sánchez, A; Requêta, ME; Candela, ME. 2004. Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthoracapsici en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Departamento de Biología vegetal, Facultad de Biología Universidad de Murcia España. 38p.
- French, ER; Hebert, TT. 1982. Metodología de investigación fitopatología. ed. M de la Cruz. Sn José, CR. IICA. 290p.
- González S, CH; Rodriguez, LL; Arjona, C; Puertas, A; Fonseca, M. 1999. Efecto de la aplicación de Trichoderma harzianum R. Sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y

actinomicetos de la rizósfera de la Solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. Investigación agraria producción y protección vegetal. no 14: 297-306.

González R, M; Castellano, L; Fernández, MR; Pérez G, G: 2008. Efecto antagónico “*in vitro*” de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. Sobre agentes patógenos de semilla y suelo en el cultivo de frijol. Centro Agrícola 35(1): 5-10.

González A, A; Mateos R, RA; López M, M; Hernández S, M; González C, A. 2013. Alternativas para el manejo de Damping off en plántulas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (L, 1753) (Solanales: Solanaceae). Revista Científica Biológico 1(1): 1-10.

Guigón, C; González, PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista mexicana de fitopatología. 22(1): 117-124.

Harman, G; Chet, I; Baker, R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. Phytopathology. no. 71:569-572.

Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease. no 84: 377-393.

Harman, G; Howell, C R; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. no. 2:43-56.

Hjeljord, L; Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma and Gliocladium* (vol 2). Harman, G E; Kubicek, C D. (eds) Taylor y Francis, Londres, Reino Unido. Pp 131-153.

Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis. no 87: 4-10

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2004. Cultivo de Tomate: Guía MIP. Managua, NI. La prensa. 66p.

Lecuona, R. 1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. In *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas*. Buenos Aires, Talleres gráfico. p. 143-150.

Leucona, R; Alves, S. 1996. Epizootiología. In *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas*. Buenos Aires, Talleres gráfico. p. 17-34.

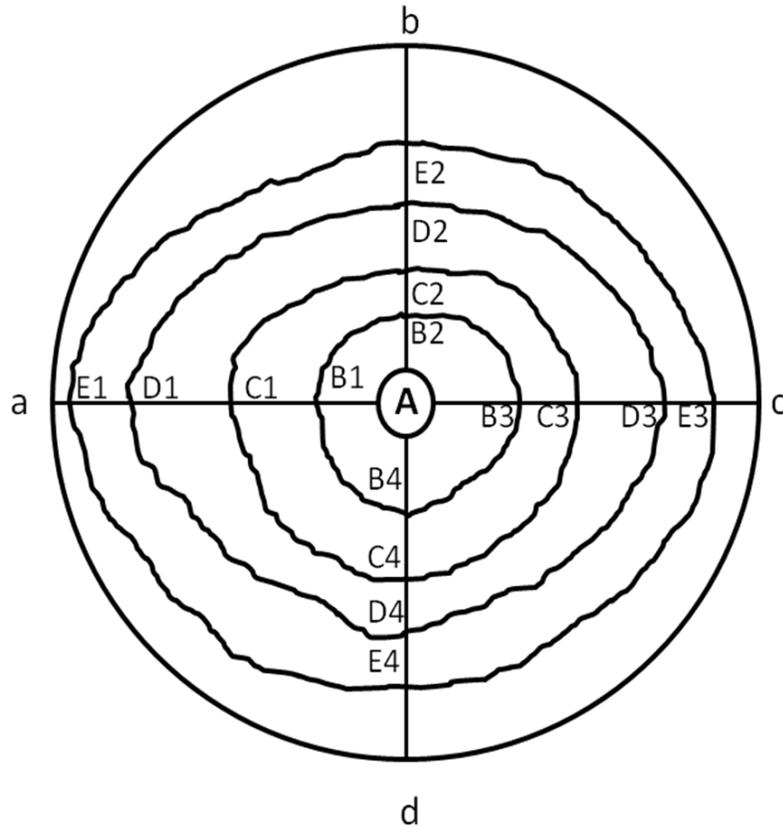
Martínez, B; Infante, D; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de protección vegetal. 28 (1): 1-11.

- Meneses, A; Pocasangre, LE; Somarriba, E; Rivera, A; Rosales, FE. 2003. Diversidad de hongos endofíticos y abundancia de nematodos en plantaciones de banano y plátano de la parte baja de los territorios indígenas de Talamanca 10 (37-38): 59-62.
- Michael A, AC; Otero, MA; Martínez, RD; Ariza, R; Barrios, A; Rebolledo, A. 2008. Control biológico In Vitro de enfermedades fungosas en tomate *Solanum Lycopersicum* Mill. Avances en Investigación Agropecuaria 12(3):55.68.
- Michel A, AC. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp., (Euascomicetes: Hypocreales), su Antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F.oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 162 p.
- MAGFOR (Ministerio Agropecuario Forestal). 2012, Informe de Producción Agropecuaria Acumulado a Agosto 2011, Managua, NI. 34 p.
- Monzón, A. 2000. Producción y uso de hongos Entomopatógenos. Managua, NI. 63p.
- _____ A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica 63: 95-103.
- MIFIC (Ministerio de Fomento, Industria y Comercio (en línea). 2007. Ficha del Tomate. Managua, NI. Consultado 19 Agost. 2009. Disponible en [http://www.mific.gob.ni/docushare/dsweb/Get/Document 3939/Ficha%20Tomate%202007.pdf](http://www.mific.gob.ni/docushare/dsweb/Get/Document%203939/Ficha%20Tomate%202007.pdf)
- Nelson, E.B. 1991. Current limits to biological control of fungal phytopathogens. In: Handbook of Applied Micology. Volumen 1: Soil and Plants. Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G.; Knudsen, G.R. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 327-355.
- Penalba R, D. 2015. Atención a pacientes con enfermedad renal en clínicas de los trabajadores del centro de investigación en salud trabajo y ambiente. SALTRA 12: 7
- Páez, O. 2006. Uso Agrícola del *Trichoderma* (en línea). Consultado 19 Abril. 2013. Disponible en <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>
- Roni, CC; Soluchana, KK. 2006. Management of seedling rot of chilli (*Capsicum anuum* L.) using *Trichodermas* pp and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Tropical Agriculture 44(1-2): 78-82.
- Royse, DJ; Ries, SM. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cinct*. Phytopathol. 68, 603-607.

- Rodríguez L, VJ. 2002. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (Damping off) en plantas de tomate”. Tesis Mag Sc. Lima, Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 105p.
- Samuels, GJ; Chaverri, P; Farr, DF; McCray, EB. 2007. *Trichoderma* (en línea). Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. ARS, USDA. Consultado 02 sep. 2009. Disponible en <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- Solano P, LY. 2004. Control biológico de la escoba de bruja del mango con *Trichoderma* spp. Tesis de Licenciatura. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Centro de Estudios Profesionales. Cocula, Guerrero, México. 82 p.
- Solano B, M; Brenes C, D: 2011. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención de mal del talluelo. Revista Forestal Mesoamericana Kukú 22(9): 63-65.
- Suárez, CL; Fernández, RJ; Valero, NO; Gámez RM; Páez, AR. 2008. Antagonismo In vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc, asociado a la marchitez de la maracuyá. Rev. Colomb. Biotecnol 10(2): 35-43.
- Stefanova, M; Leiva, A; Larrinaga, L; Coronado, MF. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Fac. Agron. (Luz). no 16: 509-516.
- Shardell, M; Alley, D; Hicks, G; El-Kamary, S; Miller, R; Semba, R; Ferucci, R. 2011. Low serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). Nutrition Research. 31: 178-189.
- Villegas, A. 2008. *Trichoderma*. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotecnología. Colombia. 2p.
- Wendel D, BV; Mora, AM; Cordoba, L; Cano, JC; Quesada, R; Fanibad, M; Wesseling, C; Reupert, C; Oberg, M; Eskenazi, B; Mergler, D; Lindh, CH. 2015. Aplicación aérea de Mancozeb y concentraciones urinarias de etilentiourea (ETU) en mujeres embarazadas. SALTRA 12: 1-2.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Metodología de medición del radio de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp. Siguiendo la metodología descrita por (French y Hebert 1982).



Anexo 2. Análisis de varianza del porcentaje de germinación de conidias de aislados de *Trichoderma* spp.

Fuente de variación	de gl	SC	CM	F	P
Trat	7	1327.483131	189.640447	1.79	0.1351
Trat*Rep	24	2538.1884	105.7579	1.19	0.261
Fec	5	283872.0193	56774.4039	641.15	0.0001
Trat*Fec	35	3141.563	89.7589	1.01	0.4604
Error	120	10626.169	88.5514		
Total	191	301505.4229			
R ² =0.964756		CV=17.82031			

Anexo 3. Separación de medias para fecha en la variable germinación de conidias

Fechas	Medias	Grupo
6	95.636	A
5	84.343	B
4	73.059	C
3	63.277	D
2	0.521	E
1	0	E

Anexo 4. Analisis de Regresión Lineal Simple porcentaje de viabilidad de conidias.

Cepas	Ecuación (modelo $Y=a+bx$)	R ²	CV
T0701	-15.99+21.07x	0.768635	41.86527
T0702	-21.57+19.89x	0.902430	28.46995
T0703	-26.68+22.77x	0.9279	25.02
T0704	-22.92+21.76x	0.893637	29.49
T0301	-18.48+20.84x	0.824613	36.91264
T0705	-22.77+20.95x	0.906204	27.88533
T0501	-20.43+20.95x	0.907330	26.47383
T0201	-20.24+20.75x	0.862848	33.03525

Anexo 5. Separación de medias del Ritmo de Crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp en PDA (Papa Dextrosa Agar).

Tratamientos	Medias	Grupo
T0704	0.41	A
T0703	0.3872	A
T0705	0.3752	B A
T0201	0.372	B A
T0701	0.3584	B A
T0301	0.3164	B C
T0702	0.288	D C
T0501	0.246	D

Anexo 6. Separación de medias para fecha en la variable Ritmo de Crecimiento en PDA (Papa Dextrosa Agar).

Fechas	Medias	Grupo
4	0.55625	A
3	0.4265	B
5	0.30475	C
2	0.235	D
1	0.19825	D

Anexo 7. Separación de medias para tratamiento en la variable Ritmo de Crecimiento en SDA (Sabouraud Dextrosa Agar).

Tratamientos	Medias	Grupo
T0702	0.46057	A
T0501	0.41857	B
T0701	0.37429	C
T0705	0.35886	D C
T0201	0.33	D
T0704	0.27571	E
T0703	0.26657	E
T0301	0.25914	E

Anexo 8. Separación de medias para fecha en la variable Ritmo de Crecimiento en SDA (Sabouraud Dextrosa Agar).

Fechas	Medias	Grupo
4	0.5685	A
5	0.51475	B
3	0.46	C
6	0.2935	D
2	0.28825	D
1	0.20825	E
7	0.0675	F

Anexo 9. Separación de medias para tratamiento en la variable Ritmo de Crecimiento en EMA (Extracto de Malta Agar).

Tratamientos	Medias	Grupo
T0201	0.3777	A
T0501	0.37133	A
T0301	0.366	A
T0705	0.346	A
T0703	0.28533	B
T0704	0.271	B
T0701	0.259	BC
T0702	0.226	C

Anexo 10. Separación de medias para fecha en la variable Ritmo de Crecimiento en EMA (Extracto de Malta Agar).

Fechas	Medias	Grupo
5	0.52675	A
4	0.506	A B
3	0.48325	B
2	0.212	C
6	0.14875	D
1	0	E

Anexo 11. Separación de medias del ritmo de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp en confrontación con *Fusarium* spp. A las 24 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T1201	0.62	A
T0501H	0.62	AB
T0704	0.58	ABC
T0701	0.57	ABC
T0301	0.51	ABCD
T0702	0.51	ABCD
T0201	0.48	ABCD
T0705	0.48	BCD
T0501	0.43	CD
T0703	0.38	D

Anexo 12. Separación de medias del ritmo de crecimiento del testigo de *Trichoderma* spp, en confrontación con *Fusarium* spp. A las 24 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T0704	0.62	A
T0501H	0.61	A
T1201	0.61	A
T0301	0.60	AB
T0501	0.57	ABC
T0701	0.52	BCD
T0705	0.51	BCD
T0702	0.51	BCD
T0703	0.50	CD
T0201	0.43	D

Anexo 13. Separación de medias según Tukey del ritmo de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp en confrontación con *Fusarium* spp. A las 48 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T0501H	0.86	A
T1201	0.86	A
T0705	0.82	A
T0501	0.81	A
T0301	0.80	A
T0201	0.79	A
T0702	0.73	A
T0704	0.58	B
T0701	0.47	BC
T0703	0.38	C

Anexo 14. Separación de medias según Tukey del ritmo de crecimiento del testigo de *Trichoderma* spp, en las pruebas de competencia con *Fusarium* spp. A las 48 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T0501	1.00	AB
T0703	0.96	AB
T0702	0.95	AB
T0704	0.95	AB
T0301	0.95	AB
T1201	0.93	AB
T0501H	0.93	AB
T0705	0.91	AB
T0201	0.89	B
T0701	0.55	C

Anexo 15. Separación de medias según Tukey del radio de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp al estar en confrontación con *Fusarium* spp. A las 72 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T1201	0.65	A
T0501H	0.62	AB
T0704	0.61	AB
T0703	0.61	AB
T0301	0.60	AB
T0501	0.59	AB
T0201	0.59	AB
T0702	0.58	AB
T0705	0.56	B
T0701	0.56	C

Anexo 16. Separación de medias según tukey para el ritmo de crecimiento de *Fusarium spp* en confrontación con *Trichoderma sp* a las 72 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T0705	0.33	A
T0201	0.32	A
T0702	0.32	A
T0501	0.32	A
T0701	0.00	B
T0301	0.00	B
T0703	0.00	B
T0704	0.00	B
T0501H	0.00	B
T1201	0.00	B

Anexo 17. Separación de medias según Tukey del el radio de crecimiento del testigo de *Trichoderma spp*, en las pruebas de competencia con *Fusarium spp*. A las 72 horas de crecimiento.

Tratamientos	Medias	Grupo
T0701	1.25	A
T0702	1.25	A
T0703	1.25	A
T0201	1.25	A
T0301	1.25	A
T0705	1.25	A
T0501	1.25	A
T0501H	1.06	B
T1201	1.04	B
T0704	1.04	B

Anexo 18. Separación de medias para tratamientos del porcentaje de incidencia de mal del talluelo en plantas de tomate (Tisma – Masaya).

Tratamientos	Medias	Grupo
T0703	4	A
T0702	3.57	AB
Testigo agua	2.94	ABC
T1201	2.79	ABC
T0701	2.69	ABC
T0501	2.35	ABC
T0705	2.17	ABC
Mancozeb	1.96	ABC
T0704	1.64	BC
T0201	1.6	BC
T0501H	1.35	C
T0301	1.28	C

Anexo 19. Separación de medias para Fechas para la variable porcentaje de incidencia Mal del Talluelo en plantas de tomate en micro invernadero (Tisma – Masaya).

Fechas	Medias	Grupo
1	2.94	A
2	2.89	A
3	1.25	B

Anexo 20. Síntomas de mal del talluelo en cultivo de tomate (ensayo de microinvernadero Tisma-Masaya).

