



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

**Capacidad antifúngica *in vitro* de Quitosano y
Trichoderma spp sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp,
agentes causales del complejo de manchado del
grano de arroz (*Oryza sativa* L.)**

Autores

Br. Heyzer Adán Mendoza García
Br. Marvin Gabriel Sánchez Reyes

Asesores

MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez
MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Managua, Nicaragua
Octubre, 2022



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

**Capacidad antifúngica *in vitro* de Quitosano y
Trichoderma spp sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp,
agentes causales del complejo de manchado del
grano de arroz (*Oryza sativa* L.)**

Autores

Br. Heyzer Adán Mendoza García
Br. Marvin Gabriel Sánchez Reyes

Asesores

MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez
MSc. Isaías Ezequiel Sánchez Gómez

Presentado a la consideración del Comité Evaluador como
requisito final para optar al grado de Ingeniero en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua
Octubre, 2022

Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero en Sanidad Vegetal

Miembros del Comité Evaluador

Presidente (MSc. Markelyn
Rodríguez Zamora)

Secretario (MSc. Trinidad
Castillo Arévalo)

Vocal (PhD. Víctor Aguilar Bustamante)

Lugar y fecha _____

DEDICATORIA

Dedico el esfuerzo y realización de este trabajo de investigación a Dios y a la Virgen Santísima, por darme sabiduría, guiarme, iluminarme y protegerme para alcanzar mis metas propuestas un día, hasta culminar mis estudios universitarios.

Gracias Dios por estar siempre conmigo. He alcanzado uno de mis más anhelados logros en mi vida, con mucho esfuerzo y sacrificio, pero sobre todo con la ayuda y bendición de nuestro señor, Dios.

A mi madre Gregoria García Castillo, quien fue la persona que me demostró que en la vida uno debe de ser valiente, tener espíritu de superación y vencer todo obstáculo que se atravesase en mi vida para cumplir mi meta y por darme amor, comprensión, confianza y el apoyo tanto económico como moral brindada a lo largo de mi formación profesional, gracias por ser un ejemplo madre y siempre poner mis pasos en las manos de Dios. Es por eso que agradezco a Dios por habérmela dado, porque yo no hubiese sido nadie, gracias a su esfuerzo, amor tan grande y sacrificio soy una profesional.

*“Dad gracias en todo, porque es la voluntad de Dios para con vosotros en cristo Jesús”
1 tesalonicenses 5:18*

Br. Heyzer Adán Mendoza García

DEDICATORIA

Este trabajo investigativo se lo dedico primordialmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para avanzar en este proceso de obtener una de mis metas más deseadas.

A mis padres por su amor y sacrificio en todos estos años, ya que gracias a ellos he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que un día soñé. A mi abuela Floriselva Reyes que desde el cielo está muy orgullosa de mí.

A mis hermanas y sobrino por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo incondicional, que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

Br. Marvin Gabriel Sánchez Reyes

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por regalarme muchas bendiciones y colocarme ángeles en mi camino y en mi trabajo de investigación, regalándome salud y sabiduría.

A mi Madre, quien con mucho amor, sacrificio y comprensión ha sabido guiarme por el camino de él bien y lograr que me convirtiera en un profesional.

En especial agradezco a mis asesores de Tesis, MSc. Eliézer Hazael Lanuza Rodríguez, MSc Isaías Ezequiel Sánchez Gómez; por su esfuerzo, dedicación, conocimientos, orientaciones, paciencia y motivación que han sido fundamentales para mi formación como investigador; por confiar y brindarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo investigativo.

A la Universidad Nacional Agraria por brindarme los medios necesarios durante los cinco años de estudios universitarios que junto con los docentes impartieron sus enseñanzas y conocimiento.

A todos los Docentes y Técnicos de los laboratorios del Departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF), en especial al Ing. Rudy Javier Cáceres Murillo, MSc. Markelyn José Rodríguez Zamora y MSc. Danessa Josed Ramirez por su cariño, apoyo y su disponibilidad a mi preparación durante los cinco años de estudio y mi trabajo de investigativo.

Sé que mi paso por la Universidad Nacional Agraria ha finalizado pero mis conocimientos, recuerdos y agradecimientos serán eternos y estoy seguro de que la amistad y el apoyo brindado fueron sinceros y de gran ayuda para ser cada día mejor persona capaz de cumplir mis metas y retos venideros.

Expreso mis más sinceras muestras de aprecio y agradecimiento a todas aquellas personas que sin saberlo se involucraron de manera indirecta e incondicional en mi trabajo investigativo.

Br. Heyzer Adán Mendoza García

AGRADECIMIENTO

Le Agradezco a Dios, porque nunca me dejó de su mano, a mi Padre Marvin Francisco Sánchez Navas y mi Madre Novia Yamileth Reyes ya que gracias a ellos he llegado hasta esta etapa muy importante de mi vida, ya que me brindaron todo el apoyo que necesite moral y económicamente.

Agradezco a mi Asesores MSc Eliezer Hazael Lanuza Rodríguez, MSc Isaías Ezequiel Sánchez Gómez ya que gracias a sus consejos y tiempo dedicado he llegado hasta aquí.

A cada uno de los integrantes del laboratorio de microbiología agrícola como el Ing. Rudy Cáceres y MSc Danessa Ramírez, que fueron primordiales en la formación para este trabajo investigativo ya que me brindaron su conocimiento.

A mi compañero de tesis Heyzer Adán Mendoza ya que entre los dos se pudo hacer posible esta investigación he igual por cada consejo que me regalo.

A la Universidad Nacional Agraria ya que fue mi segunda casa abriéndome las puertas para poder ser lo que soy, gracias a cada uno de mis amigos y familiares que estuvieron ahí constantemente apoyándome.

Br. Marvin Gabriel Sánchez Reyes

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Complejo del manchado del grano	4
3.2 Importancia del “complejo del manchado del grano”	4
3.3 Condiciones de desarrollo del “complejo del manchado del grano”	4
3.4 Sintomatología	5
3.5 Incidencia y severidad del manchado del grano	5
3.5.1 Incidencia	5
3.5.2 Severidad	5
3.6 Tolerancia del arroz al manchado del grano	6
3.7 Manejo de la enfermedad	6
3.7.1 Prácticas culturales	6
3.7.2 Manejo Biológico	6
3.7.3 Manejo químico	7
3.8 Mejoramiento genético del arroz	8
3.9 Experiencias investigativas	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1 Ubicación del estudio	10
4.2 Diseño metodológico	10
4.3 Características morfológicas	11
4.4 Evaluación del grado de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre los patógenos	11
4.5 Porcentaje de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Bipolaris</i> sp y <i>Curvularia</i> sp	12
4.6 Ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de Quitosano sobre <i>Bipolaris</i> sp y <i>Curvularia</i> sp	13
4.7 Variables evaluadas	14
4.8 Análisis de datos	14
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1 Característica morfológica de los aislados de <i>Bipolaris</i> sp y <i>Curvularia</i> sp	15
5.1.1 <i>Bipolaris</i> sp	15
5.1.2 <i>Curvularia</i> sp	15
5.2 Evaluación del grado de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre los patógenos	17
5.3 Porcentaje de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre los patógenos	18
5.4 Porcentaje de inhibición de Quitosano sobre <i>Bipolaris</i> sp	19
5.5 Porcentaje de inhibición de Quitosano sobre <i>Curvularia</i> sp	19

VI. CONCLUSIONES	21
VII. RECOMENDACIONES	22
VIII. LITERATURA CITADA	23
IX. ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Escala de cinco clases utilizada para medir el grado de antagonismo (control biológico) ejercido por los aislados de <i>Trichoderma</i> sp sobre los patógenos de manchado de grano (<i>Bipolaris</i> sp, <i>Curvularia</i> sp)	12
2.	Descripción de los tratamientos en la técnica de envenenamiento	13

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Esquema de enfrentamiento patógeno vs antagonista	11
2.	Conidios libres de <i>Bipolaris</i> sp vistos a 40 X (A), Hifas septadas de <i>Bipolaris</i> sp (B)	15
3.	Conidios libres de <i>Curvularia</i> sp vistos a 40 X (A), Hifas septadas de <i>Curvularia</i> sp (B)	16
4.	Enfrentamiento de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sp frente a <i>Bipolaris</i> sp a las 216 horas (A), antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> y <i>Curvularia</i> sp a las 216 horas (B)	17
5.	Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Curvularia</i> sp y <i>Bipolaris</i> sp	18
6.	Inhibición de Quitosano comercial sobre <i>Bipolaris</i> sp	19
7.	Inhibición de Quitosano comercial sobre <i>Curvularia</i> sp	20

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Panículas de arroz con grano manchado	26
2.	Cámaras húmedas con granos de arroz manchado	26
3.	Cultivos puros de <i>Bipolaris</i> sp y <i>Trichoderma</i> spp	27
4.	Prueba de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp vs <i>Bipolaris</i> sp y <i>Trichoderma</i> spp vs <i>Curvularia</i> sp	27
5.	Crecimiento de <i>Bipolaris</i> sp en medio con Quitosano	27
6.	Hoja de recolección para datos	28

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, aunque es el más importante del mundo si se considera la extensión de la superficie en la que se cultiva y la población que depende de su cosecha. El manchado del grano constituye un factor limitante en el cultivo de arroz debido a la reducción que ocasiona tanto en el rendimiento como en la calidad del grano. El objetivo de este estudio fue determinar el potencial de control de patógenos del complejo de manchado del grano en arroz usando productos biológicos. El diseño metodológico utilizado fue un DCA y se determinaron parámetros morfométricos, el grado de antagonismo y porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sobre los patógenos y a la vez un ensayo de sensibilidad *in vitro* con Quitosano sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp. Para el grado de antagonismo en *Trichoderma* spp/*Curvularia* sp se observó que a las 216 horas y a temperatura de 25°C el antagonista sobrecrece más de dos terceras partes de la placa. El mayor porcentaje de inhibición a las 216 horas y a temperatura de 25°C, lo presentó el antagonista sobre *Bipolaris* sp encontrándose en la totalidad de la placa. Se observó que el mayor efecto de inhibición del crecimiento radial se presentó a las 72 y 144 horas en el T3 (0.5 g/l). La menor inhibición de crecimiento radial se obtuvo en el tratamiento T4 (0.7 g/l). La aplicación de las formulaciones a base de Quitosano en el ensayo de sensibilidad a bajas concentraciones T2 (0.3 m/l) presentó mayor efecto de inhibición desde las 24 a las 120 horas.

Palabras clave: Inhibición, antagonista, concentraciones, envenenamiento, cultivo dual.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is the staple food for more than half of the world's population, although it is the most important in the world if the extension of the surface in which it is cultivated is considered and the number of people who depend on their harvest. Grain staining is a limiting factor in rice cultivation due to the reduction it causes in both yield and grain quality. The objective of this study was to determine the pathogen control potential of the grain staining complex in rice using biological products. The methodological design used was a DCA. Morphometric parameters, the degree of antagonism and percentage of inhibition of *Trichoderma* on the pathogens were determined, as well as an in vitro sensitivity test with Chitosan on *Bipolaris* sp and *Curvularia* sp. In the confrontation of *Curvularia* sp / *Trichoderma* spp, it was observed that at 216 hours and at a temperature of 25°C, the antagonist overgrows more than two thirds of the plate. The highest percentage of inhibition at 216 hours and at a temperature of 25°C was presented by the antagonist on *Bipolaris* sp, being found in the entire plate. It was observed that the greatest effect of inhibition of radial growth occurred at 72 and 144 hours in T3 (0.5 g/l). The least inhibition of radial growth was obtained in treatment T4 (0.7 g/l). The application of Chitosan-based formulations in the sensitivity test at low T2 concentrations (0.3 g/l) showed a greater inhibition effect from 24 to 120 hours.

Keywords: Inhibition, antagonist, concentrations, poisoning, dual culture.

I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L) es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, aunque es el más importante del mundo si se considera la extensión de la superficie en la que se cultiva y la cantidad de gente que depende de su cosecha. A nivel mundial, el arroz ocupa el segundo lugar después del trigo si se considera el área cosechada, y de acuerdo a su importancia como cultivo alimenticio, más del 40% de la población mundial depende del arroz y este conforma el 80% de su dieta, además proporciona el 20% del consumo de calorías per cápita en todo el mundo (García y Maradiaga, 2015).

Centroamérica produce el 0.45% de la producción mundial de arroz (alrededor de 2.7 millones de toneladas en el 2005), este nivel ha sido estable desde 1996. Los principales productores son Costa Rica (27% de la producción de la región), Nicaragua (29.4%) y Panamá (31.0%) (García y Maradiaga, 2015).

El arroz pertenece a la familia de las Poáceas cuyo cultivo comenzó en Asia hace 10,000 años, siendo la India la región de siembra específica debido a la abundancia en arroces silvestres que presentaba (Ruiz *et al.* , 2009).

Es una poácea anual, de tallos redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es en panícula. El tamaño de la planta varía de 0,4 m hasta más de 7,0 m (Ruiz *et al.*, 2009).

El manchado del grano constituye un factor limitante en el cultivo de arroz debido a la reducción que ocasiona tanto en el rendimiento como en la calidad del grano. Es importante hacer notar que en muchas áreas arroceras se han incrementado en los últimos años. Está comprobado que las aplicaciones de fungicidas en la etapa de llenado de grano disminuyen la proporción de granos manchados hasta en 40% (Pichardo *et al.* , 2006).

Existen diversidad de hongos que han sido reportados como agentes causales del manchado de grano entre los que se pueden mencionar: *Sarocladium* sp, *Helminthosporium* sp, *Curvularia* sp, *Alternaria* sp, *Bipolaris* sp, *Rhizoctonia* sp, *Pyricularia* sp, *Fusarium* sp entre otros (Pichardo *et al.*, 2006).

Parte del manejo de manchado de grano se ha utilizado distintos principios activos, entre ellos estrobilurinas y triazoles. Para el cultivo de arroz, hasta el momento, están registrados Azoxystrobina para el control del complejo de hongos de manchado de granos, y Kasugamicina, Mancozeb® y Tiabendazol para “*Pyricularia*” (Intriago *et al.*, 1991).

En ese sentido se trabaja en la búsqueda de productos bioactivos para el control del manchado del grano, que sean biodegradables, no tóxicos para el hombre y animales, tengan elevada efectividad, bajo costo y no contaminen el ambiente. Diferentes estudios indican que la Quitosano tiene la potencialidad de inhibir el crecimiento micelial de numerosos hongos fitopatógenos y de estimular los mecanismos de defensa de las plantas (Cruz *et al.* , 2005).

Para el control del manchado de grano se usan métodos como la siembra de variedades resistentes y la aplicación de fungicidas químicos convencionales, pero debido a los efectos negativos residuales de los productos convencionales, actualmente se investiga en la aplicación de Quitosano, que es un producto biológico biodegradable y antimicrobiano (Rodríguez *et al.* , 2015).

Este trabajo busca generar información sobre el comportamiento *in vitro* del producto biológico Quitosano para manejar los patógenos que ocasionan el manchado de grano en el cultivo de arroz. De tal manera que esto sirva de base para futuras investigaciones y a la vez sea una tecnología que esté a disposición de los productores.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el potencial de control de patógenos del complejo de manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.) usando productos de origen natural.

2.2 Objetivos específicos

Identificar las características macroscópicas y microscópicas de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp.

Evaluar el efecto de *Trichoderma* spp sobre de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp mediante la técnica de cultivo dual.

Evaluar el efecto *in vitro* de cinco dosis de Quitosano comercial sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Complejo del manchado del grano

El complejo del manchado del grano en arroz es una enfermedad ampliamente distribuida en las regiones productoras de arroz, reportando como agentes causales *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Bipolaris* sp, *Cladosporium* sp y *Curvularia* sp, *Fusarium* sp. Esta enfermedad afecta componentes del rendimiento al causar vaneamiento y disminución de la germinación entre un 26 y 41%; vigor y tamaño de las plántulas; número de granos por panícula; peso de los granos hasta un 40%; llenado de los granos en un 30%. Por otra parte, desmerece la calidad de la semilla, pues reduce el número de granos enteros e incrementa tanto los granos quebradizos en el proceso de molino como los granos yesosos y de coloración anormal (Rivero *et al.*, 2012).

3.2 Importancia del “complejo del manchado del grano”

Al referirse a la importancia del complejo del manchado de grano se puede decir que:

A partir de 1980 en Brasil y Uruguay hubo un incremento en el problema del "manchado del grano", el cual ha estado causando grandes pérdidas a los agricultores, no sólo mediante la disminución en los rendimientos sino, en la calidad del grano. El complejo de manchado del grano en la panoja ha comenzado a cobrar importancia ya que va aumentando en proporciones cada vez más alarmantes en la economía de Argentina ya que este complejo baja los rendimientos esperados (Sisterna *et al.* , 1994, p. 3).

3.3 Condiciones de desarrollo del “complejo del manchado del grano”

Las lluvias, alta humedad relativa y temperatura son las condiciones que exponen a la planta frente a una posible entrada del complejo de manchado en el grano causando vaneamiento y bajos rendimientos a los productores. Otros factores que posibilitan las condiciones para la entrada del patógeno son lesiones por viento, insectos y pájaros (Esparza, 2019).

3.4 Sintomatología

El manchado del grano se caracteriza por manchas en las glumas que varían desde pequeños puntos oscuros a extensas áreas que pueden alcanzar hasta el 100% de su superficie del grano. La decoloración puede profundizar afectando el endospermo y a veces el embrión (Batalla, 2014).

Esta enfermedad impide la germinación del grano, afecta el aspecto de este, lo que conlleva a la reducción de la viabilidad y reducción de la calidad. Muchos de los granos manchados tienen aspecto yesoso y se requiebran en el proceso de molienda. El complejo del manchado del grano incide de forma negativa sobre componentes del rendimiento al producir alto porcentaje de vaneos, afectar la germinación entre el 26 y el 41%, así como el vigor y tamaño de las plántulas; disminuye el número de granos por panícula y el peso de los granos hasta el 40 %, y el llenado en el 30 % (Sisterna *et al.*, 1994).

3.5 Incidencia y severidad del manchado del grano

3.5.1 Incidencia

El manchado del grano se ha incrementado en nuestro medio con efectos nocivos sobre la calidad fisiológica de la semilla, lo cual se atribuye al ataque de varios patógenos, entre ellos los hongos, virus, insectos chupadores y ácaros. El control de este problema mundial, que no solo reduce la producción, sino que desmejora significativamente el valor del grano cosechado ha sido con la obtención de variedades resistentes y el uso de fungicidas, lo que no ha sido suficiente debido a las numerosas colonias patogénicas presentes; la inadecuada fertilización y la falta de un correcto control de insectos que se asocian con su presencia en los arrozales (Sauhing, 2017).

3.5.2 Severidad

El “complejo del manchado del grano” en arroz, provoca altos porcentajes de vaneos, disminución en el poder germinativo de las semillas, plántulas menos vigorosas, disminución del número de granos por panícula, granos quebradizos, coloraciones anormales y granos yesosos. Además, estas afectaciones tienen influencia en las siembras futuras, pues estos hongos pueden transmitirse y diseminarse por las semillas hacia otras zonas arroceras (Sauhing, 2017).

3.6 Tolerancia del arroz al manchado del grano

Este término proviene de latín tolerancia, lo cual quiere decir “cualidad de quien puede soportar o aguantar”. Refiriéndose a la acción y efecto de tolerar.

De los 10 a 15 días posteriores a la inoculación de los patógenos en las plantas de arroz, estos causan marchitez y amarillamiento en las hojas, además, manchado de marchitez de la panícula, además está asociado al oscurecimiento y manchado de los granos recién formados en la panícula estos patógenos de las semillas puede causar oscurecimiento del grano, clorosis y manchas en hojas, entre otros signos (Rivera y Gómez, 2012, p. 4).

3.7 Manejo de la enfermedad

3.7.1 Prácticas culturales

Mediante el uso de material genético resistente al complejo del manchado del grano, evitando el uso de semillas contaminadas o de material vegetal infectado, eliminación de maleza hospedante del patógeno, son prácticas culturales que ayudan a evitar la presencia y afectaciones en cultivo de arroz (Cuevas, 2009).

3.7.2 Manejo Biológico

La importancia y manejo de enfermedades con control biológico ha incrementado al grado que en la actualidad ha generado un incremento comercial. Sin embargo, la producción y la comercialización de productos biológicos esta encimada en el fortalecimiento de sistemas de producción sostenibles. Esto ha generado gran demanda de productos biológicos ya que las aplicaciones de pesticidas están contaminando el medio ambiente y la salud humana (Solís, 2016).

Entre las estrategias seguidas para el control del complejo del manchado del grano en arroz se encuentran, el control cultural, biológico y químico, siendo este último el más utilizado en el mundo, a pesar de ser perjudicial para el hombre y el ambiente. Se ha intensificado la búsqueda de nuevos productos que sean económicamente viables y menos agresivos al ambiente. En este sentido, el Quitosano, es un polímero no tóxico y biodegradable, representa una posible alternativa como agente de control de patógenos de manchado (Cruz *et al.*, 2005, p. 15).

Trichoderma spp, es un hongo saprofito que ha sido aislado comúnmente del suelo en diferentes países del mundo, también se ha encontrado sobre la superficie de las raíces de las plantas, sobre cortezas en descomposición, en el interior de troncos, y sobre otros hongos. La temperatura óptima para su crecimiento en agar y producción de micelio está entre 20 y 28 °C, aunque crece bien entre 6 a 32 °C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5 μ de diámetro son liberadas en un gran número. También se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar. Además, se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar a los que inducen mecanismos de defensa fisiológico y bioquímico como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia) (Infante *et al.*, 2002).

Quitosano (poli-N-Acetil-Glucosamina), es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. Se encuentra en el caparazón de todos los crustáceos (camarones). El Quitosano o Quitosana es un biopolímero natural que se obtiene de la Quitina por métodos químicos, electroquímicos o enzimáticos. Químicamente es una Poli (D-glucosamina), por ello se considera un polisacárido Biodegradable. El tamaño molecular depende de la especie y de la edad de los individuos dado que se obtienen desde un polímero biosintético (Cruz *et al.*, 2005, p. 16)

3.7.3 Manejo químico

Las medidas técnicas de manejo del cultivo del arroz, incluyendo aplicaciones de foliares sintéticos en las distintas fases fisiológica de la planta y tratamiento químico a la semilla. Es por esto que se trabaja en nuevas alternativas de manejo para el manchado del grano por lo que la principal causa de los daños por esta enfermedad son las condiciones climáticas y las tecnologías de siembra. (Rivero *et al.*, 2009).

Para reducir la incidencia del “manchado del grano” o factores de riesgo cualquier medida que sea efectiva es una buena toma de decisión y en caso que favorezcan las condiciones climáticas se han ensayado investigaciones con aplicaciones de funguicidas como dithiocarbamato, Metil-2-benzimidazol para combatir patógenos causante de esta enfermedad (Esparza, 2019).

3.8 Mejoramiento genético del arroz

El mejoramiento genético pretende dar una mejor respuesta a las necesidades de los pequeños, medianos y grandes productores por lo que los daños y bajos rendimientos se debe al ataque por patógenos. Esto obliga a mejorar, variedades o líneas que tengan adaptación a la sequía, exceso de calor o de frío y a la humedad ambiental ya que esto es fundamental para el desarrollo de patógenos e insectos plagas (Martínez *et al.*, 1998).

3.9 Experiencias investigativas

Refiriéndose a las experiencias obtenidas en las diferentes investigaciones se puede observar que:

Se evaluó nuevas líneas promisorias de arroz en condiciones bajo riego durante la época lluviosa en la zona de Santa Lucia Ecuador y el tratamiento que obtuvo mayor rendimiento de arroz paddy fue el T6=Ar-ITAV-06 con un rendimiento de 7221,99 kg/ha⁻¹. Reportando menor porcentaje de granos manchados (Mendoza, 2014, p. 51).

Según Torres (2016) “Se determinó que el mejor control de manchado de grano fue con las dosis aplicadas en el tratamiento Mancozeb[®] + oxiclورو de cobre, aunque su rendimiento no fue el mejor comparado con el testigo” (p. 55).

Galarza en el 2015, “Evaluó cuatro fungicidas para el control de manchado de grano. Con tratamiento Mancozeb[®], con una dosis de 300 cc/ha⁻¹, presentó menor presencia de granos vanos y manchados. El tratamiento testigo, no presentó diferencias con respecto a los otros tratamientos” (p. 28).

El Quitosano Sigma tuvo especificidad en la actividad inhibitoria sobre el crecimiento y esporulación de los hongos patógenos del grano de arroz y se alcanzó la máxima inhibición (100 %) del crecimiento y la esporulación de los hongos a la concentración de 1000 mg/L (Rivero *et al.*, 2009, p. 7).

Los mejores resultados fueron alcanzados a las concentraciones de 750 y 1000 mgL^{-1} , las cuales inhibieron completamente la germinación de los conidios del hongo. Mientras que en los tratamientos de menores concentraciones de Q-63 (300 y 500 mg.L^{-1}), el porcentaje de germinación fue de 18 y 16 % respectivamente, lo cual demuestra las potencialidades del preparado sobre la germinación conidial del hongo *Sarocladium oryzae* (Cruz *et al.*, 2005, p. 5).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología vegetal de la Universidad Nacional Agraria ubicada en el kilómetro 12 ½ de la carretera norte en el departamento de Managua. En el periodo comprendido de octubre del 2021 a mayo del 2022.

Se tomó en cuenta la Cooperativa Mario Dávila S.A, que comprende un área total de 113 ha⁻¹ las cuales están dedicadas exclusivamente a la producción de arroz durante dos ciclos en el año en sistema de monocultivo. Esta finca está ubicada a 116 km de la capital Managua, en el municipio de San Isidro departamento de Matagalpa dentro de las coordenadas 12° 54' 24" Norte y 86° 09' 37" Oeste, a una altitud de 460 msnm.

A partir de recorridos que se realizaron en las áreas antes mencionadas se identificaron plantas con síntomas de manchado de grano a nivel de la panícula se tomó unas muestras posteriormente se depositaron en bolsas plásticas transparentes para su traslado al laboratorio.

4.2 Diseño metodológico

El estudio se realizó en condiciones de laboratorio, bajo un diseño completamente al aza (DCA), con seis tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento para un total de 30 unidades experimentales. Cada unidad experimental estará representada por un plato de Petri.

Para la observación de características morfológicas, grado de antagonismo, porcentaje de inhibición y sensibilidad *in vitro* se utilizó el medio de cultivo PDA, a razón de 39 g por 1000 ml de agua destilada y 20 ml del medio por placa Petri. Los niveles para cada tratamiento estuvieron conformados por cinco dosis (Cuadro 2).

Para el aislamiento de los patógenos se trabajó una muestra de 400 granos de arroz con síntomas aparente de manchado de grano. Se utilizó la técnica de Cámara húmeda y siembra en medio de cultivo PDA (Agrios, 2020). La cepa de *Trichoderma* spp –T306 fue suministrada por el laboratorio de Microbiología Vegetal de la Universidad Nacional Agraria.

4.3 Características morfológicas

A partir de aislados puros de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp se determinaron parámetros morfológicos es decir características microscópicas y macroscópicas. Para la medición de las características microscópicas se utilizó un microscopio óptico en lente de 40X y con ayuda de un micrómetro objetivo y un ocular se calibró el microscopio para posteriormente medir el tamaño y observar la forma de los conidios además el tipo de hifas presente. Estas mediciones se realizaron para cada uno de los aislados sometido a los tratamientos y se observaron cuatro campos por lámina. Posteriormente se obtuvo el promedio de longitud, ancho de hifas y conidios. Las características microscópicas se identificaron con ayuda de la clave ilustrada de hongos imperfectos de Barnett & Hunter (1998).

Para las características macroscópicas se realizaron observaciones de color, forma, elevación y textura del micelio de los hongos patógenos.

4.4 Evaluación del grado de antagonismo de *Trichoderma* spp sobre los patógenos

Se realizó una prueba de antagonismo con los patógenos pertenecientes al complejo de manchado de grano (*Bipolaris* sp y *Curvularia* sp) utilizando *Trichoderma* spp como hongo antagonista y el medio general Papa Dextrosa Agar (PDA).

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en platos Petri, que contenían 20 ml de medios de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), mas ácido láctico al 25 %. Se colocó en un extremo del plato un disco de 8 mm con micelio de los patógeno *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp y en el otro extremo un disco de 8 mm con micelio del hongo antagonista *Trichoderma* sp. (Figura 1).

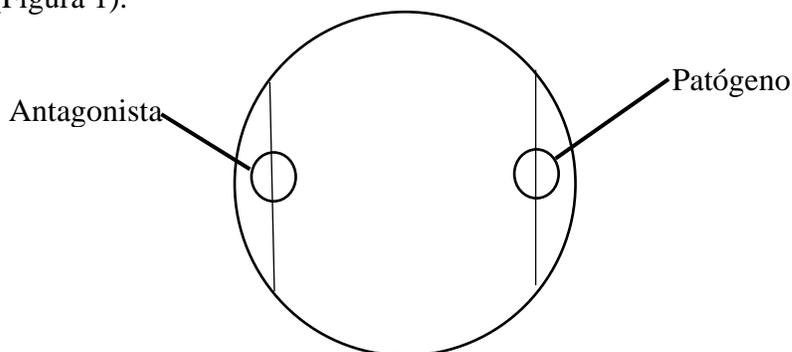


Figura 1. Esquema de enfrentamiento patógeno vs antagonista

Los testigos consistían en platos Petri con disco de los patógenos aislados y el antagonista, incubados a temperatura de 25°C. Las lecturas se realizaron cada 24 horas y se comparan con la escala de porcentaje de inhibición de crecimiento radial propuesta por (Bell *et al.*, 1982).

Cuadro 1. Escala de cinco clases utilizada para medir el grado de antagonismo (control biológico) ejercido por los aislados de *Trichoderma* sp sobre los patógenos de manchado de grano (*Bipolaris* sp, *Curvularia* sp).

Clase	Descripción
1	El antagonista crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre toda la superficie del medio de cultivo.
2	El antagonista cubre al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
3	El antagonista y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
4	El patógeno cubre al menos dos terceras parte del medio de cultivo limitando el crecimiento del antagonista.
5	El Patógeno crece sobre la colonia del antagonista y cubre toda la superficie del medio de cultivo

Se consideró a *Trichoderma* como altamente antagonista si el valor promedio de una comparación determinada era ≤ 2 y no era considerado altamente antagonista si el valor promedio era ≥ 3 (Bell *et al.*, 1982).

4.5 Porcentaje de antagonismo de *Trichoderma* spp sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp

Las evaluaciones del antagonismo de *Trichoderma* spp sobre crecimiento radial de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp se realizaron manualmente con una regla milimetrada, cada 24 h por 7 días y se compararon con el crecimiento del antagonista, con el objetivo de calcular el porcentaje de inhibición del antagonista sobre los hongos a enfrentar mediante la siguiente formula:

$$(\%) = [(T_c - T_t) / T_c] \times 100$$

Dónde:

T_c = Radio promedio de la colonia control.

T_t = Radio de la colonia en medio con el antagonista.

4.6 Ensayo de sensibilidad *in vitro* de Quitosano sobre *Bipolaris sp* y *Curvularia sp*

Se utilizaron cinco dosis de Quitosano (formulado) y se prepararon alícuotas de 100 ml de medios de PDA y a cada una se le agregó de forma independiente soluciones de trabajo 0.1 g, 0.3 g, 0.5 g, 0.7 g y 1 g, a una concentración del 90 %. La medición de las dosis es decir el peso en gramos del producto se realizó utilizando una balanza analítica.

Posteriormente se colocó en el centro del plato un disco del hongo patógeno con tamaño de 8 mm obtenido a partir de aislados previamente purificados y se incubó a una temperatura de 25 °C, durante siete días para lograr su crecimiento y esporulación.

Las evaluaciones de inhibición de crecimiento radial se realizaron manualmente con una regla milimetrada, cada 24 h por 7 días y se compararon con el crecimiento del hongo en el medio control (sin Quitosano), con el objetivo de calcular el crecimiento radial y el porcentaje de inhibición sobre la colonia mediante la siguiente fórmula

$$(\%) = [(Tc - Tt) / Tc] \times 100$$

Dónde:

Tc = Radio promedio de la colonia control.

Tt = Radio de la colonia en medio con Quitosano.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos en la técnica de envenenamiento

Tratamiento	Tipo de producto	Dosis
T1	Quitosano	0.1 g/l
T2	Quitosano	0.3 g/l
T3	Quitosano	0.5 g/l
T4	Quitosano	0.7 g/l
T5	Quitosano	1 g/l
T6	Control o Testigo	0

4.7 Variables evaluadas

- Características morfológicas de los aislados *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp.
- Efecto de *Trichoderma* spp sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp mediante la técnica de cultivo dual.
- Porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

4.8 Análisis de datos

Todas las variables y sus componentes se organizaron en una hoja de cálculo del software Excel versión 19.0. Las variables parámetros morfométricos de los aislados, cultivo dual y porcentaje de inhibición de crecimiento radial se analizaron de forma descriptiva y se expresaron mediante figuras.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Característica morfológica de los aislados de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp

5.1.1 *Bipolaris* sp

En este estudio se observaron hifas septadas de coloración café claro, conidióforos simples color café oscuro con una longitud de 65 μm , de cinco a nueve conidias en los ápices, las cuales eran alargadas, rectas, compuesta por al menos de cuatro septos en promedio y con una longitud de 21 μm y un ancho de 10 μm , micelio algodonoso tiene una coloración marrón oscuro, con un borde de la colonia blanco que cambia de color a medida que va esporulando y creciendo.

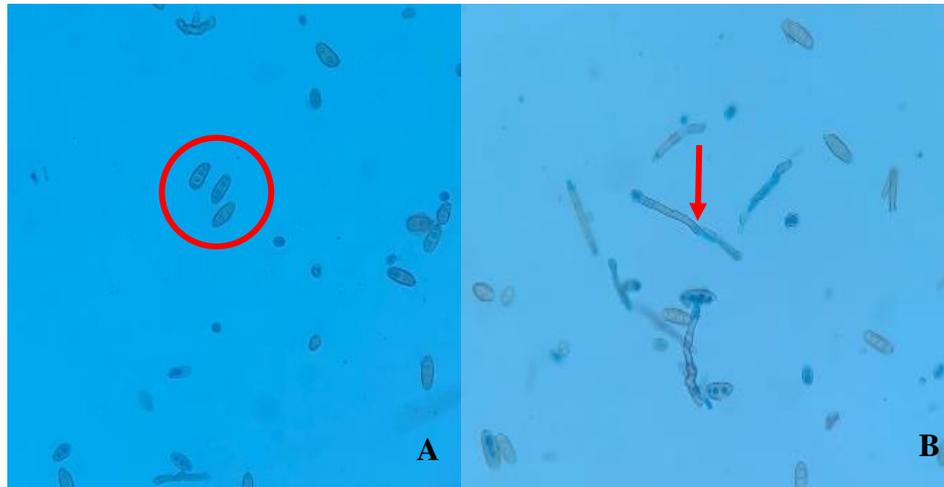


Figura 2. Conidios libres de *Bipolaris* sp vistos a 40 X (A), Hifas septadas de *Bipolaris* sp (B)

Según Villalobos (2021), los conidióforos son individuales o en grupos rectos o flexibles algunas veces geniculados, café pálido a café oliváceo, brillantes en el ápice, septados, más de 600 μm de longitud y de 4 a 8 micras de ancho. Los conidios son fusoides o clavados, algunas veces casi cilíndricos, generalmente curvados, de color café brillante a café dorado, de 6 a 14 septos y de 63-153 *14-22 μm , en medio de cultivo son de color gris a oliva o blanco (p.3).

5.1.2 *Curvularia* sp

Curvularia sp presentó hifas septadas de coloración café- marrón, con una longitud promedio de 140 μm , conidióforos cortos con un promedio de 10 a más conidias las cuales tienen forma globosa ligeramente curvadas, en algunos casos teniendo apariencia de boomerang, las conidias

tienen un promedio de tres septos de los cuales uno de estos es notoriamente más grande, y se encuentra ubicado en el centro de la misma con un largo promedio de 22 μm y un ancho de 12 μm . Es una colonia algodonosa, inicialmente de coloración blanca tornándose de una coloración marrón oscuro, conformación de anillos concéntrico a medida que va desarrollando.

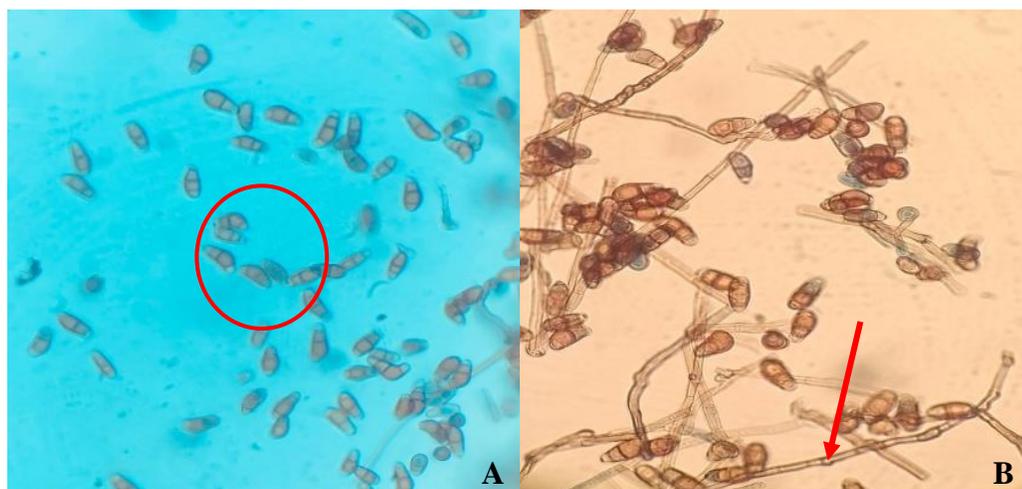


Figura 3. Conidios libres de *Curvularia* sp vistos a 40 X (A), Hifas septadas de *Curvularia* sp (B).

A nivel microscópico, *Curvularia* sp desarrolla hifas vegetativas tabicadas, ramificadas, subhialinas a pardas, lisas a asperuladas, con un tamaño aproximado de 1.5 a 5 μm de ancho. Conidioforos (39-430 μm de largo, 4-9 μm de ancho en la base y 2.5-6 μm de ancho hacia el centro) septados, simples o ramificados, a menudo con una base bulbosa y geniculados o doblados en el ápice, de color marrón claro a oscuro, con paredes celulares más gruesas que las de las hifas vegetativas (Villalobos, 2018. p.2).

El estudio de las características macroscópicas de los hongos *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp en el presente estudio resulta de mucha relevancia puesto que a través de esto se puede realizar comparaciones de la forma, elevación, textura y color del micelio, de esta manera tener certeza si se está trabajando con el patógeno deseado. Y los patógenos reportados en el complejo de manchado de grano. Encontrando similitud de crecimiento respecto a las características macroscópicas de los hongos, sin embargo, a nivel microscópico difiere de lo que reporta las literaturas de Villalobos.

5.2 Evaluación del grado de antagonismo de *Trichoderma* spp sobre los patógenos

En el enfrentamiento de *Bipolaris* sp con *Trichoderma* sp a las 216 horas y a temperatura de 25°C, se observó que el antagonista crece completamente sobre el patógeno y cubre toda la superficie del medio de cultivo, ubicándolo según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) en clase 1. para el caso del enfrentamiento de *Curvularia* sp frente a *Trichoderma* spp se observó que a las 216 horas y a temperatura de 25°C, el antagonista cubre al menos las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo, ubicándolo según la escala de Bell *et al.* (1982) en clase 2. La cepa de *Trichoderma* spp T306 se considera altamente antagonista por presentar valores promedios ≤ 2 , se hubiera considerado no altamente antagonista si los valores promedios hubieran resultado ser ≥ 3 (Figura 3).

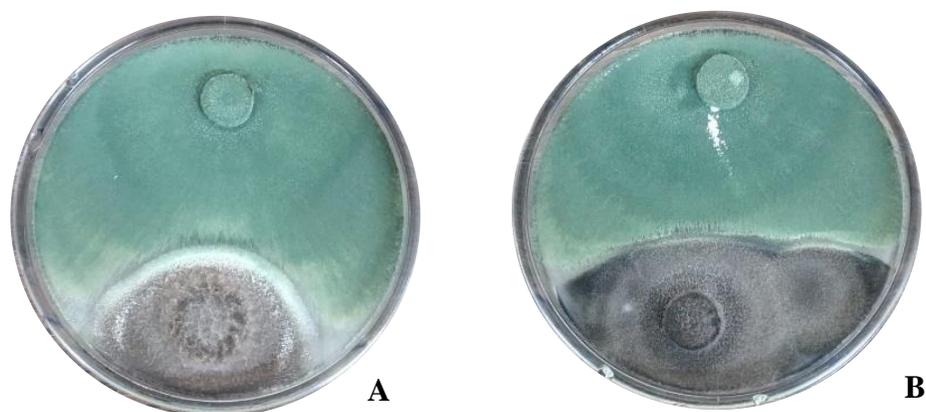


Figura 4. Enfrentamiento de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* sp frente a *Bipolaris* sp a las 216 horas (A), antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* y *Curvularia* sp a las 216 horas (B).

Según Fernández y Suárez (2009), Acosta *et al.* (2021) y Rodríguez *et al.* (2016), resaltan que la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp sobre los patógenos enfrentados se determinó a través de la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), lo que destaca que la competencia por nutrientes y espacio es un factor importante para su desarrollo considerándolo altamente antagonista en sus respectivas clases.

5.3 Porcentaje de antagonismo de *Trichoderma* spp sobre los patógenos

El porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp versus los patógenos del manchado de grano en arroz a las 216 horas y a una de temperatura de 25 °C mostró ser un factor limitante de competencia por espacio y nutrientes. El enfrentamiento *in vitro* de *Trichoderma* sp frente *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp resultó ser igual con 56.9 y 57 % respectivamente (Figura 5).

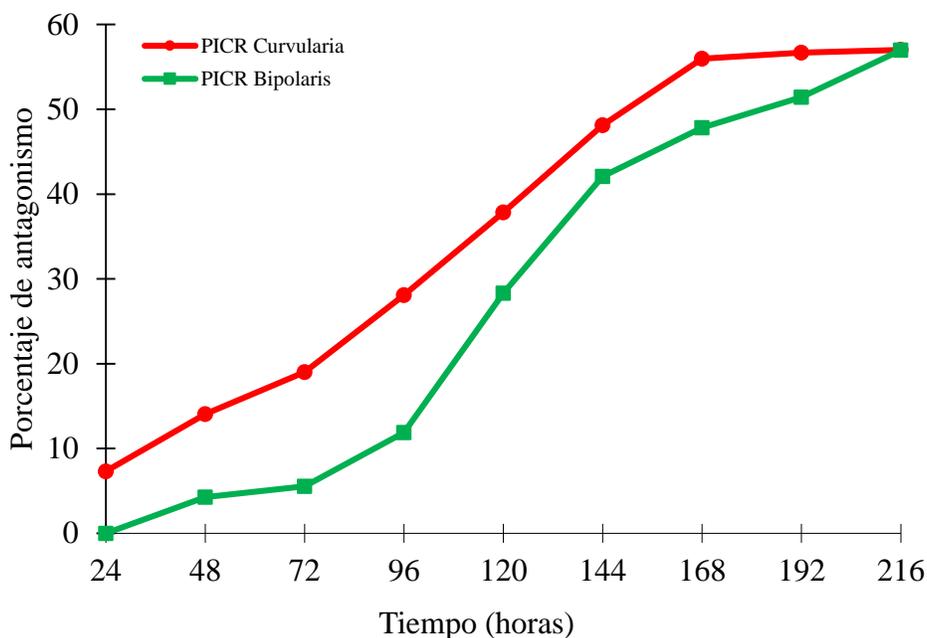


Figura 5. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp sobre *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp

Según Acosta, Azania y Azania (2021) y Andrade *et al.* (2019) demostraron que los aislados de *Trichoderma* spp, mostraron un crecimiento más rápido que los patógenos el antagonismo presentó una inhibición mayor al 50% y se encontró que el hongo mostró capacidad inhibitoria entre 58 y 68%.

5.4 Porcentaje de inhibición de Quitosano sobre *Bipolaris* sp

Se observó que el mayor efecto de inhibición del crecimiento radial se presentó a las 72 y 144 horas en el T3 (0.5 g/l). La menor inhibición de crecimiento radial se obtuvo en el tratamiento T4 (0.7 g/l). Los porcentajes de inhibición después de las 120 horas presentaron poca variación lo cual se puede atribuir a la degradación o desnaturalización de la molécula de Quitosano en el medio de cultivo (Figura 6).

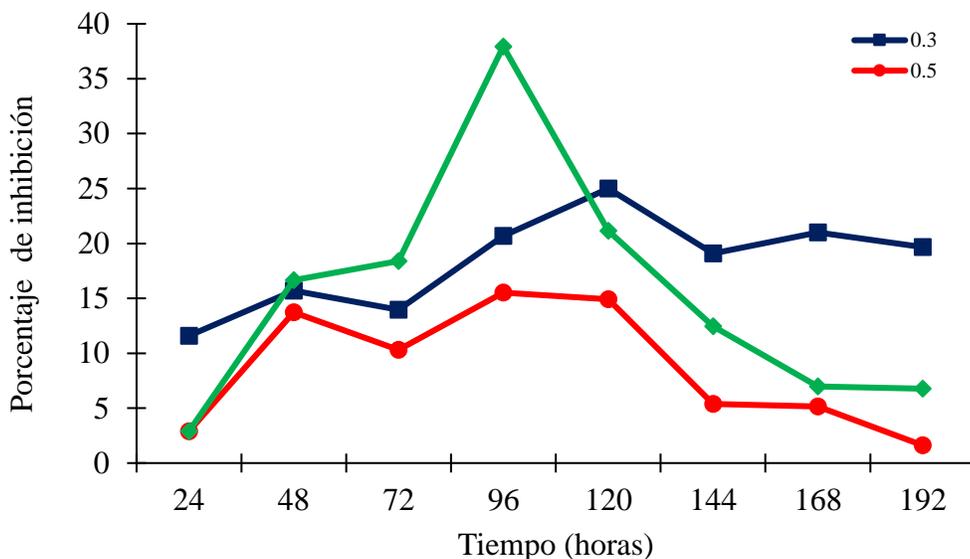


Figura 6. Inhibición de Quitosano comercial sobre *Bipolaris* sp.

Estudios realizado por Echevarría *et al.* (2012), basada en la actividad anti fúngica de Quitosano determinaron que el Quitosano en bajas concentraciones no causa un efecto letal, en el crecimiento micelial de los hongos.

5.5 Porcentaje de inhibición de Quitosano sobre *Curvularia* sp

De manera general, se puede observar que el Quitosano en altas concentraciones no causa ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial de *Curvularia* sp resultado que no coincide con otros autores, no comportándose de la misma forma.

La aplicación de las formulaciones a base de Quitosano en bajas concentraciones T2 (0.3 g/l) presentó mayor efecto de inhibición desde las 24 hasta las 96 horas, teniendo en cuenta que después de las 96 horas presenta poca variación de porcentaje de inhibición, lo cual se puede atribuir a la degradación o desnaturalización de la molécula de Quitosano en el medio de cultivo (Figura 7).

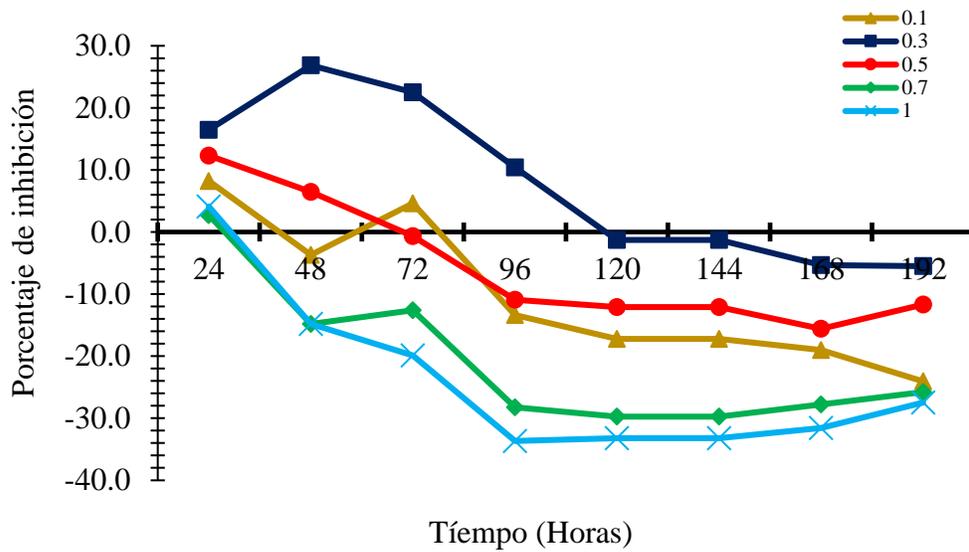


Figura 7. Inhibición de Quitosano comercial sobre *Curvularia* sp.

Según Rivero *et al.* (2009) Afirman que la acción de Quitosano sobre el hongo, *C. lunata* en la velocidad de crecimiento radial, tuvo efecto fungistático alcanzando la máxima inhibición (100 %) del crecimiento y la esporulación de los hongos a una concentración de 1 g/l. Datos que no coinciden con esta investigación puesto que el mayor porcentaje de inhibición lo alcanzó la dosis 0.3 g/l hasta las 96 horas, seguido de 0.5g/l hasta las 48 horas. Además quitosano resulta ser menos efectivo sobre el control de *Curvularia* sp debido a su pronta degradación de su molécula en medio de cultivo artificial a eso debe el comportamiento negativo que se observa en la figura 7.

VI. CONCLUSIONES

Los productos en estudio a nivel *in vitro* resultaron ser promisorios ya que *Trichoderma* y Quitosano muestra algún grado de inhibición sobre los patógenos.

Las características macroscópicas de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp coinciden con las reportadas en la literatura, pero a nivel microscópico difiere de lo que reporta Villalobos.

En las pruebas de cultivo dual se consideró que *Trichoderma* sp es altamente antagonista colocándolo en las clases 1 y 2, el porcentaje de inhibición de *Trichoderma* sp sobre *Bipolaris* sp fue de 56.9% y 57% para el caso de *Curvularia* sp.

Las dosis 0.3 g/l y 0.5 g/l de Quitosano comercial resultó ser la mejor ya que inhibió el crecimiento radial de *Bipolaris* sp y *Curvularia* sp.

VII. RECOMENDACIONES

- Ampliar investigaciones con Quitosano y *Trichoderma* sp en plantaciones de arroz establecidas a campo abierto para conocer el efecto del producto sobre los diferentes agentes causales del manchado de grano.
- Realizar aplicaciones de Quitosano comercial con intervalos de cinco días a razón de 0.3 o 0.5 g por litro de agua.

VIII. LITERATURA CITADA

- Acosta, L. T., Azania, D. K., y Azania, R. (2021). *Cultivo dual in vitro de cepas nativas de Trichoderma spp. frente a Botrytis sp. patógeno de Passiflora ligularis Juss. Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 1(4), 43. <https://doi.org/10.25127/riagrop.20214.720>
- Andrade Hoyos, P., Luna Cruz, A., Osorio Hernández, E., Molina Gayosso, E., Landero Valenzuela, N., y Barrales Cureño, H. J. (2019). *Antagonismo de Trichoderma spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259–1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Batalla, A. (2014). *Incidencia del manchado de grano en arroz. Ergomix*, 2014, 12.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1998) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Edition, APS Press, St. Paul, 218 p.
- Bell, D. ., Wells, H. ., & Markham, C. . (1982). *In Vitro Antagonism of Trichoderma species Against Six Fungal Plant Pathogens. Phytopathology*, 72, 4.
- Cruz, A., Rivero, D., Martínez, B., Ramírez, M. A., y L, Maqueira. (2005). *Efecto de la quitosana sobre el crecimiento y desarrollo in vitro del hongo S. oryzae Sawada y la protección de semillas de arroz (Oryza sativa Lin). Cultivos Tropicales*, 26(3), 5.
- Cuevas Medina, A. (2009). *Manejo Integrado de Plagas en el Cultivo del Arroz. In Guía Tecnológica*. http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6457/1/MIP_arroz.pdf
- Echevarría Hernández, A., Cruz Triana, A., Cárdenas Travieso, R. M., Rivero Gonzáles, D., Ramirez Arrebato, M. A., y Rodríguez Pedroso, A. T. (2012). *Actividad antifúngica de la quitosana en el crecimiento micelial y esporulación del hongo Pyricularia grisea Sacc. Cultivos Tropicales*, 33(3), 80–84.
- Esparza Abad, M. A. (2019). *Tolerancia de cultivares de arroz (Oryza sativa L.), al complejo del manchado de grano en la época lluviosa en la zona de Babahoyo [Babahoyo: UTB,2019]*. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/5448>
- 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.
- Galarza Guerrero, C. A. (2015). *Control Químico del Manchado de Grano de la Variedad de Arroz INIAP 14 en la Provincia de Los Ríos. Universidad Católica De Santiago De Guayaquil*.
- García Flores, S. V., y Maradiaga Cuadra, M. J. (2015). *Análisis de la Producción, Comercialización y consumo de arroz en Nicaragua (2009-2013) [Univeridad Nacional*

- Autonoma De Nicaragua]. In *Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua, Managua*. <https://repositorio.unan.edu.ni/3357/1/17323.pdf>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). *Mecanismo de acción de Trichoderma Frente a hongos Fitopatógenos*. *Artículo Reseña*, 24(1), 8.
- Intriago, M., Peláez, G., Estupiñán, I., García, B., y Villao, F. (1991). *Principales enfermedades del arroz en el Ecuador y su manejo*. In *Unidad de información y documentación*. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/2015/SB_191_R5_U583_Vol.3.pdf
- Martínez, C. P., Tohme, J., López, J., Borrero, J., McCouch, S. R., Roca, W., Chatel, M., y Guimarães, E. (1998). *Estado actual del mejoramiento del arroz mediante la utilización de especies silvestres de arroz en CIAT*. *Agronomía Mesoamericana*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.15517/am.v9i1.24609>
- Mendoza Aspiazu, L. (2014). *Evaluación de nuevas líneas promisorias de arroz (Oryza sativa L.) bajo condiciones de riego durante la época lluviosa en la zona de Santa Lucia, provincia del Guayas*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/6515>
- Pichardo, O., Siria, E., y Soza, B. (2006). *Determinación de la resistencia a enfermedades causadas por Helminthosporium oryzae, Cercospora oryzae y rendimientos en nueve líneas y una variedad de arroz en el municipio de Posoltega en el periodo julio-diciembre 2005*. Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua.
- Rivera, M., y Gómez, L. (2012). *Identificación y patogenicidad de Fusarium spp y Rhizoctonia solani en cultivos de arroz del Cesar*. *Revista Colombiana de Microbiología*, 2(2), 6.
- Rivero González, D., Cruz Triana, A., Pedroso Rodríguez, A. T., Pedroso, R., Echevarría Hernández, A., y Martínez Coca, B. (2012). *Artículo original Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (Oryza sativa L.) en Cuba*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32, 8.
- Rivero González, D., Triana, A., Coca, B., Ramírez Arrebato, M., y Rodríguez Pedroso, A. (2009). *Actividad antifúngica in vitro de la quitosana sigma frente a hongos fitopatógeno causantes del manchado del grano en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.)*. *Fitosanidad*, 13(2), 7.
- Rodríguez, A. T., Plascencia, M., Bautista, S., Cortez, M. O., y Ramírez, M. Á. (2015). *Actividad antifúngica in vitro de quitosanos sobre Bipolaris oryzae patógeno del arroz*. *Acta Agronomica*, 65(1), 7. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.48235>
- Rodríguez Saldaña, M. F., Milanes Virelles, P., Perez Torres, E., y Sierra Reyes, Y. (2016). *Compatibilidad de Trichoderma harzianum Rifai con fungicidas del arroz y su efecto sobre tres fitopágenos fungicos*. 552(2), 82–91.
- Ruiz, M., Díaz, G. S., Pérez, N., Muñoz, Y., Rodríguez, M. E., y Domínguez, D. (2009). *Comportamiento de la variedad de arroz (Oryza sativa L.) INCA LP-4 sembrada en diferentes épocas del año*. *Cultivos Tropicales*, 30(1), 5.

- Sauhing Aspiazu, J. carlos. (2017). *Evaluación de fungicidas orgánicos para el manejo del manchado del grano en arroz (Oryza sativa) bajo riego en Abras de Mantequilla*. Universidad DE Guayaquil.
- Sisterna N, M., Lori A, G., y Marassi, J. (1994). *Síntomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el cultivar Irga 409*. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 9.
- Solís Aguilar, A. J. (2016). *Alternativas biológicas para el manejo del complejo de manchado de grano en el cultivo de arroz en babahoyo-prov. los rios*. In *Resma (Vol. 3, Issue 2)*. Universidad de Guayaquil.
- Torres Celleri, C. (2016). “*Comportamiento agronómico del cultivo de arroz (Oryza sativa L.) ante la aplicación de fungicidas químicos y orgánicos para el control de manchado del grano*”. (Vol. 4, Issue 4). Universidad De Guayaquil.
- Villalobos, V. (2018). *Ficha técnica de Curvularia lunata agente causal del manchado de grano en arroz (Oryza sativa L)*. Dirección del centro nacional de referencia fitosanitaria.
- Villalobos, V. (2021). *Mancha marrón del arroz Cochliobolus miyabeanus (Bipolaris oryzae)*. Dirección del centro nacional de referencia fitosanitaria.

IX. ANEXOS

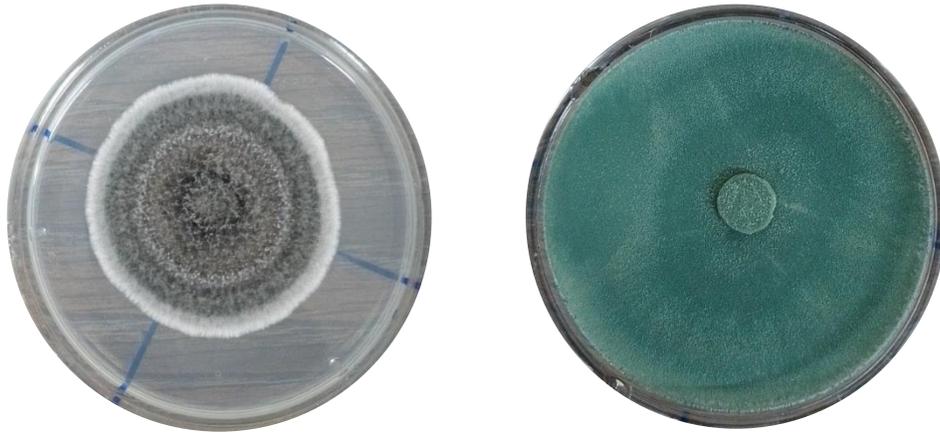
Anexo 1. Panículas de arroz con grano manchado



Anexo 2. Cámaras húmedas con granos de arroz manchado



Anexo 3. Cultivos puros de *Bipolaris* sp y *Trichoderma* spp



Anexo 4. Prueba de antagonismo de *Trichoderma* spp vs *Bipolaris* sp y *Trichoderma* spp vs *Curvularia* sp



Anexo 5. Crecimiento de *Bipolaris* sp con Quitosano



Anexo 6. Hoja de recolección para datos

Dosis mg/l	Repeticiones	Tiempo							
		24	48	72	96	120	144	168	192
0.1	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
0.3	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
0.5	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
0.7	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
1	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
Testigo	1								
	2								