



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología



Efecto de *Trichoderma spp.* sobre algunos parámetros fisiológicos en *Solanum lycopersicum L.* bajo condiciones de vivero

Trabajo Especial de Grado a ser presentado por la:

Br: Ariabny Gloriel Blanco Acosta

Tutor: Dr. Domenico Pavone Maniscalco

Jurado 1: Lic. Rafael Rodríguez

Jurado 2: Lic. Massiel Pinto

Febrero de 2017



Universidad de Carabobo

Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología

Departamento de Biología

Efecto de *Trichoderma spp.* sobre algunos parámetros fisiológicos en *Solanum lycopersicum L.* bajo condiciones de vivero

Resumen

En Venezuela, el tomate representa una de las principales hortalizas cultivadas. Los rendimientos son afectados en gran parte por la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo. El uso de agroquímicos comerciales tiene efectos adversos sobre el ambiente, los animales, las plantas, el hombre y el agua. Así, el empleo de cepas de *Trichoderma spp.* (hongo antagonista), es una alternativa dentro del biocontrol. Debido a la importante necesidad de disminuir la incidencia de patógenos del tomate en campo, se planteó determinar en condiciones de vivero el efecto de *Trichoderma spp.* y evaluar su efecto antagónico sobre el crecimiento de las plantas de tomate. Se realizó probando una formulación granulada contrastada con una líquida, en condiciones de vivero. Para todos los ensayos se utilizaron semillas comerciales de *S. lycopersicum* cv. Río Grande. Asimismo se utilizaron cepas de *Trichoderma spp.*, específicamente *T. virens* (TV118), *T. asperellum* (TV190), y *T. harzianum* (TV200). Con base en los resultados obtenidos, se escoge la formulación de gránulos con sales y 10^7 esporas/g, para los subsiguientes ensayos, por ser el tratamiento que mejor desempeño tuvo en las condiciones utilizadas. No se encontraron diferencias significativas entre los ocho tratamientos, sin embargo, se observó que con la aplicación de las formulaciones líquidas de las tres cepas estudiadas, hubo plantas con mayor longitud, al compararlas con las plantas bajo efecto de las formulaciones granuladas de las tres cepas. Para la biomasa seca aérea y radical encontramos resultados que parecen sugerir que la formulación granular, afecta negativamente el crecimiento de las plántulas. Los resultados del estado de las plántulas sometidas a estrés hídrico en presencia de formulaciones de *Trichoderma spp.* señalan que los tratamientos con formulaciones granuladas mostraron una mayor tolerancia al déficit hídrico. Al evaluar la estabilidad del almacenamiento de la formulación granulada, de forma general, a mayor tiempo en almacenamiento se va perdiendo la viabilidad de las esporas. A un mes de almacenamiento la disminución es mínima ($\approx 11\%$ en todos los tratamientos), mientras que a los 6 meses la viabilidad baja drásticamente ($\approx 24\%$) siendo mayor en nevera y $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ que a temperatura ambiente. Las cepas de *Trichoderma* utilizadas, lograron aumentar el crecimiento de las plántulas de tomate, observándose mejor en las formulaciones líquidas.

Palabras claves: *Trichoderma*, Formulación granulada, *Solanum lycopersicum*, Déficit hídrico, Biocontrol.

A mis padres ABNER BLANCO *y* ELSA ACOSTA,

Mis hermanos ERIK *y* ABNER GABRIEL,

A toda mi familia,

A mi EDUARNOLE.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a ti **mi Dios** por permitirme llegar hasta el final de esta meta, por ponerme cada obstáculo porque me hicieron caer y levantarme, aprender de cada tropiezo y querer, aún, seguir.

A mis papás, **mi Lorenzo** y **mi Elsitita**, porque por ustedes estoy donde estoy, porque me levantaron en cada caída y me animaron a seguir, nunca dejaron de creer en mí, y se esforzaron tanto o más que yo por completar este logro. Gracias por enseñarme los valores que hoy me han ayudado tanto a cumplir unas cuantas metas y trazarme unas cuantas más. Han sido mi pilar siempre, “le pido a Dios que me alcance la vida” para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Son mi mejor regalo. LOS AMO!

A mis hermanos, **Erikway** y **Abnerwin**, porque son los mejores hermanos que pueden existir, porque me fastidiaron muchísimo durante la carrera pero siempre para hacerme más resistente, gracias por siempre creer en mí, por su apoyo y por aguantar la montaña rusa por la que pase estos años. LOS AMO!

A mis tías **Mari**, **Daysi** y **Marly**, porque han sido mis segundas madres, me han dado el apoyo necesario para seguir, y a la vez, han sido ese refuerzo que mi mamá necesito todas las veces que me convertí en una persona difícil. Gracias por acompañarme en este largo camino. Esto también es por ustedes.

A mis **tíos**, a mis **primos**, porque cerca pero “de lejitos” siempre estuvieron conmigo. Los quiero muchísimo, son grandes!!!

A mis **Glory's** porque ¿Qué haría yo sin ustedes? Son esas hermanas que Dios manda para cuando crees que hasta ahí llegas, no puedes más, ellas te recuerden que aún falta, que debes seguir y luchar por alcanzar eso que tanto deseas. Son uno de mis grandes ejemplos a seguir. Son mi gran orgullo. Las amo con mi vida.

A mi **Eduarnole**, GRACIAS! Gracias por aguantarme, por quedarte, por estar, por el apoyo, por los regañones, por levantarme, por comprenderme la mayoría de las veces y por jamás dejar de creer en mí (así como nunca he dejado de creer en ti). Gracias por la paciencia!!! Eres mi gran compañero de camino, de destino, de vida, mi pingüino!. Espero poder acompañarte en cada meta alcanzada, así como tú me has acompañado a mí. TE!

A mi mejor amigo desde que nació, la persona que más buena vibra me ha dado durante toda la vida, durante mi carrera. Quien siempre me ha defendido, quien siempre ha creído en mí. Gracias mi **Angel Armando**, te admiro, no dejes de ser tú.

A los amigos que me dejaron el paso por la universidad, **Yule, María, Mau y Duitsy** nadie sabe exactamente el camino que hemos recorrido. Ustedes hicieron que fuese más llevadero. Gracias por su amistad.

A mis amigas de toda la vida, **Orla y Gil**, porque cada una recorrió su camino propio y aún seguimos allí para la otra, porque la amistad verdadera perdura en el tiempo y espacio. Gracias por siempre estar para mí.

A mi profesora preferida, **Eucandis Fuentes**, porque fuiste esa profesora que salía de su función profesional para entrar en esa función maternal y darnos esos regaños en el momento justo y necesario y animarnos a no rendirnos, personas como tú en una facultad así, en tiempos como los que vivimos, son invaluableles. Gracias!

A mi tutor **Domenico Pavone**, porque cuando parecía que no tendría proyecto de Tesis, no veía qué camino tomar para seguir, apareció y me dio la oportunidad de seguir y trabajar junto a él. Gracias por guiarme para alcanzar la meta.

Gracias a mis jurados, **Rafael Rodríguez y Massiel Pinto**, ya que me ayudaron a no desviarme del objetivo y sus correcciones fueron para ayudarme a mejorar.

**GRACIAS A TODOS LOS QUE ESTUVIERON EN ESTE LARGO E
INIGUALABLE CAMINO.**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



ACTA

Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. Ariabny Blanco**, Cédula de Identidad N° 19.891.393, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: **“Efecto de *Trichoderma* spp. sobre algunos parámetros fisiológicos en *Solanum lycopersicum* L. bajo condiciones de vivero”**, en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

En Valencia, a los 23 días del mes de Mayo del año 2017.

Prof. Domenico Pavone
Tutor

Prof. Rafael Rodriguez
Jurado Principal



Prof. Massiel Pinto
Jurado Principal

INDICE

Introducción	1
Planteamiento del problema	2
Justificación	4
Objetivos	5
Marco teórico	6
Clasificación de <i>Solanum lycopersicum L</i>	6
Origen de <i>Solanum lycopersicum L</i>	6
Generalidades de <i>Solanum lycopersicum L</i>	6
Características de <i>Solanum lycopersicum L</i>	6
Factores abióticos que afectan la producción de tomate	8
Zonas productoras de tomate en Venezuela	8
Aspectos generales de <i>Trichoderma spp.</i>	8
Formulación de bioinsecticidas.....	10
Antecedentes	12
Marco metodológico	14
Material biológico	15
Preparación de la formulación granulada y líquida	15
Pruebas de crecimiento de <i>Trichoderma spp.</i> en la formulación granulada	16
Ensayos de vivero	16
Determinación del crecimiento en <i>S. lycopersicum L</i>	17
Determinación del efecto de <i>Trichoderma spp.</i> sobre el estado hídrico de plántulas sometidas a sequía.....	17
Prueba de estabilidad en almacenamiento de la preparación granu- lada	18
Procesamiento de datos y Análisis Estadísticos	18
Resultados	19
Concentración óptima de esporas en la formulación granular	19
Determinación del crecimiento en <i>S. lycopersicum L</i> :	
Altura de la planta	20
Peso seco aéreo y radical	21
Efecto de <i>Trichoderma spp.</i> sobre el estado hídrico de plántulas in- ducidas a sequía	23
Estabilidad en almacenamiento de la preparación granulada	25
Discusiones	27
Concentración óptima de esporas en la formulación granular	27
Determinación del crecimiento en <i>S. lycopersicum L</i> :	
Altura de la planta	27
Peso seco aéreo y radical	28

Efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el estado hídrico de plántulas inducidas a sequía	30
Estabilidad en almacenamiento de la preparación granulada	31
Conclusiones y recomendaciones	33
Bibliografía	35
Anexos	46

INDICE DE TABLAS

Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las esporas en las formulaciones granuladas de <i>T. virens</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. harzianum</i>	25
--	----

INDICE DE FIGURAS

Determinación de la concentración de esporas en los gránulos y efecto de la presencia de sales minerales con las diferentes cepas estudiadas, TV118, TV 190 Y TV 200.....	19
Crecimiento de plantas de <i>S. lycopersicum</i> inoculadas con <i>T. virens</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. harzianum</i> en formulaciones granulares y líquidas.....	21
Masa seca aérea en plantas de <i>S. lycopersicum</i> inoculadas con <i>T. virens</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. harzianum</i> en formulaciones granulares y líquidas.....	22
Determinación de la masa seca (peso seco) radical en plantas de <i>S. lycopersicum</i> inoculadas con <i>T. virens</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. harzianum</i> en formulaciones granulares y líquidas.....	23
Determinación del efecto de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el estado hídrico de plántulas sometidas a sequía.....	24

I. INTRODUCCION

En Venezuela, el tomate representa una de las principales hortalizas cultivadas, alcanzando para el año 2010 una producción de 225.340 toneladas (GUÉDEZ *et al.* 2012). La producción de tomate se ve afectada por varios factores, entre los cuales están los patógenos habitantes del suelo que atacan al cultivo, generando pérdidas importantes. Las técnicas convencionales utilizadas en el control de plagas y enfermedades son los agroquímicos, los cuales han ocasionado problemas desde el punto de vista económico, ecológico y social, por los niveles de contaminación y afectación de la salud humana y animal que producen. Por esta razón, es necesario buscar métodos de control que sea más compatibles con el ambiente que los agroquímicos (SANTANDER *et al.*, 2003).

Así, el biocontrol de plagas se ha convertido en una herramienta útil, por las ventajas asociadas a este tipo de agente, como la disminución de organismos resistentes a controles químicos, aumento de la calidad del producto y la prevención de la pérdida total de la planta.. Dentro de los organismos utilizados en biocontrol, los hongos del género *Trichoderma* spp. se han reportado como un excelente agente de control biológico de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas, entre estos, el tomate. Además se ha reportado que la aplicación de *Trichoderma* estimula el crecimiento de algunas plantas, incrementa el número de flores y el peso total, actuando como un bioestimulante del crecimiento (SOTO *et al.* 2002). La aplicación de estos agentes de biocontrol, está altamente influenciada por las condiciones ambientales, situación que puede ser solucionada en parte, a través de formulaciones apropiadas, que aumenten el tiempo de vida del inóculo del agente de biocontrol en campo (PAVONE y DORTA, 2009).

De esta forma, el presente estudio propone el uso de una formulación granular de distintas cepas de *Trichoderma* spp. para la estimulación del crecimiento de plantas de tomate, además de verificar la tolerancia de las plantas a periodos de sequía moderados. Tales efectos serán contrastados con una formulación líquida de las mismas cepas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) representa uno de los principales cultivos a escala nacional, debido a la importancia que tiene para el consumo fresco, así como para su utilización en la agroindustria. Sin embargo, los rendimientos son afectados en gran parte por la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo. En ataques graves de fitopatógenos, gran parte de la superficie foliar queda inutilizada para realizar la fotosíntesis, lo que se traduce en un descenso en el rendimiento y en la calidad del fruto (DEWIT *et al.*, 2002).

Los agroquímicos convencionales, ocupan un lugar destacado como práctica de control de plagas, pero su uso tiene efectos adversos sobre el ambiente, los animales, las plantas y el hombre. Por lo tanto, se hace necesario utilizar medidas de control biológico para evitar este tipo de efectos. Así, el empleo de cepas de *Trichoderma* spp. (hongo antagonista), es una alternativa dentro del biocontrol, cuyo conocimiento de su efectividad y de su mecanismo de acción es esencial para el desarrollo de una estrategia en la implantación de una agricultura viable (HONEE *et al.*, 1994; MARTINEZ *et al.*, 1994; GUARRO *et al.*, 1999; LIECKFELDT *et al.*, 1999;). Dicha alternativa es de gran importancia ya que podría sustituir el control agroquímico, que además de su elevado costo, trae como consecuencia el desarrollo de resistencia por parte de fitopatógenos y problemas de contaminación y toxicidad (REYES *et al.*, 2000). Además es una estrategia que podría dar un buen resultado contra los agentes infecciosos al desplazarlos, a su vez con agentes biológicos benéficos (PAPAVIZAS, 1985; REYES *et al.*, 2000; SANTAMARINA *et al.*, 2002).

Todas estas aplicaciones de agentes de biocontrol son altamente dependientes de las condiciones ambientales (PAVONE *et al.*, 2009), por lo que el tipo de formulación con las que son aplicadas, influyen en el éxito del programa de biocontrol, ya que son herramientas poderosas para lograr este objetivo. Las formulaciones líquidas mejoran el rendimiento en campo de hongos y los aditivos tales como minerales pueden ayudar a las funciones de la planta como una mejor

nutrición del suelo (LELAND *et al.*, 2001). También se han utilizado formulaciones granulares como una alternativa para mejorar la eficacia de varios agentes de biocontrol, conteniendo micelios secos o conidios formulados. Estos gránulos se han utilizado como insecticidas (SHAH *et al.*, 1999, 2000), micoherbidas (CONNICK *et al.*, 1998), nematocidas (STIRLING & SMITH, 1998) y hongos antagonistas de patógenos vegetales (LEWIS & LARKIN, 1998). Este tipo de formulación puede actuar como un medio de cultivo sólido para el crecimiento de hongos en el campo o simplemente como un vehículo para la infección y a su vez, los protege de la luz solar (HUA & FENG, 2003).

Por lo tanto, se hace necesario saber el efecto de una formulación granulada sobre el crecimiento de *Solanum lycopersicum* en condiciones de vivero y a su vez contrastar tales efectos con los de una formulación líquida y así conocer las ventajas de su uso.

III. JUSTIFICACION

En tomate, *Trichoderma* spp. promueve un mayor crecimiento y vigor de las raíces, además de un aumento en los mecanismos de defensa contra fitopatógenos (JIMÉNEZ *et al.*, 2011). Sin embargo, las condiciones ambientales en un agroecosistema pueden ser extremas, siendo un factor de inactivación del inóculo aplicado (Pavone, 2003), por lo que se hace necesario el uso de una formulación apropiada que incremente la persistencia del inóculo (Pavone *et al.*, 2009).

Debido a la importante necesidad de disminuir la incidencia de patógenos del tomate en campo y, tomando en cuenta que la aplicación de *Trichoderma* spp. en formulaciones, favorece el control, reduce la incidencia de varias enfermedades causadas por hongos y ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas (PAVONE, 2012), en esta investigación se planteó determinar en condiciones de vivero el efecto de una formulación granulada de *Trichoderma* spp. y evaluar su efecto antagónico sobre el crecimiento de las plantas de tomate, ya que de esta manera, se ha comprobado que un vehículo sólido actúa como barrera física entre el microorganismo inoculado y el medio, así como también confiere protección a los microorganismos frente a lavados (MARÍNEZ *et al.* 2009), se mejora la vida media del hongo y la eficacia de este sobre la planta de *S. lycopersicum* L., el cual con un riego adecuado y en distintas formas climáticas lograría esparcirse y multiplicar el inóculo causando así una infección positiva en todo el cultivo (PAVONE *et al.*, 2009). A su vez, se comparará el efecto de la formulación granulada con el efecto de una formulación líquida, ya que ha sido la más común en el uso de biocontrol, a pesar de que se corre el riesgo de perder su efecto como consecuencia de drenaje de corrientes, sequías extremas, (SMITH *et al.*, 1999; DE COURCY *et al.*, 2000; INYANG *et al.*, 2000).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer el efecto de una formulación granulada de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y estado hídrico de plántulas de *Solanum lycopersicum* L. bajo condiciones de vivero.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de una formulación granulada y líquida de *Trichoderma* spp. para inducir aumento de la biomasa foliar y radical de *S. lycopersicum*.
- Valorar la capacidad de ajuste al déficit hídrico de plántulas de *S. lycopersicum*. tratadas con una formulación granulada y líquida de *Trichoderma* spp.
- Determinar la viabilidad de las esporas formuladas en condiciones de almacenamiento.

V. MARCO TEORICO

5.1 Generalidades de *Solanum lycopersicum* L.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las especies agrícolas más conocidas y exportadas comercialmente a escala mundial. Esta especie es una de las hortalizas de mayor importancia para el consumo humano directo (IANNACONE & REYES, 2001; DEWIT *et al.*, 2002; IANNACONE & MURRUGARRA, 2002). Dentro del aspecto fitosanitario, el cultivo del tomate es afectado por diversas plagas y enfermedades. Los patógenos que afectan la parte aérea del tomate son muy diversos y variados, muchos de ellos pueden ocasionar pérdidas muy severas si no se toman las medidas de control adecuadas (APAZA, 1999; REYES *et al.*, 2000).

5.2 Origen.

El origen del género *Solanum*, es la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (BALDOMERO & ZÁRATE, 2007). En la actualidad todavía crecen silvestres las diversas especies del género en algunas de esas zonas (ESQUINAS & NUEZ, 2001). Fue llevado por los distintos pobladores de un extremo a otro, extendiéndose por todo el continente y el mundo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

5.3 Clasificación.

S. lycopersicum es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Solanaceae. Posee un gran número de especies silvestres relacionadas. División: Magnoliophyta, clase: Magnoliopsida, subclase: Asteridae, orden: Solanales, familia: Solanaceae, género: *Solanum*, especie: *lycopersicum* (JARAMILLO *et al.*, 2007).

5.4 Características.

El tomate es una planta perenne, cultivada como anual. Posee un sistema radical bien desarrollado, pudiendo alcanzar de 60 a 120 cm de profundidad. En la

mayoría de los casos, el tallo logra alcanzar un grosor que fluctúa entre 0,7 a 4,0 cm. El tallo es anguloso y pubescente y en las primeras fases de crecimiento es herbáceo y en estado adulto leñoso. Las yemas axilares producen ramas sucesivas, mientras que las terminales desarrollan flores. El fruto es una baya con dos a nueve lóculos con un grupo de semillas en su interior. El tamaño o peso varía entre 30 – 400 gr. El color del fruto es producido por dos pigmentos carotenoides, la lycopersina que da un color rojo y un isómero de ésta, la carotina que da un color anaranjado (BALDOMERO & ZÁRATE, 2007).

El riego es una práctica común en el cultivo del tomate en el país, debido a que se siembra en época de verano (noviembre a marzo) en las zonas de alta precipitación y en las regiones áridas y semiáridas del país donde la precipitación es muy poca. La frecuencia o intervalo de riego se establecerá de acuerdo con el clima, tipo de suelo y de la etapa de desarrollo en que se encuentre el cultivo. En general, los riegos en la primera fase de desarrollo después del trasplante, deben ser frecuentes (cada tres o cuatro días) hasta que haya una regeneración en las raíces, luego un riego semanal es suficiente hasta el término del cultivo. Los períodos críticos de riego en el cultivo son: trasplante, polinización de la flor y maduración del fruto. La aplicación de niveles desiguales de agua, combinada con una falta de calcio o potasio, puede ocasionar un desorden fisiológico en el fruto conocido como “blosson” o podredumbre apical. Una inconstante aplicación de riegos o exposiciones prolongadas a sequía, seguida de un riego pesado, puede ocasionar rajaduras en el fruto (SANTIAGO *et al.*, 1998). La importancia agrícola del cultivo es la gran adaptabilidad que posee para obtener elevadas producciones, ya que permite que se exploten tanto en climas tropicales como en templados.

En cuanto a los requerimientos de temperatura, se tiene que entre los 20 y 30°C, la cutícula se ablanda y el agua es más fluida, aumentando entonces la absorción de la solución nutritiva aplicada. El tomate es considerado como una planta de clima cálido, que tiene gran sensibilidad a las heladas. La temperatura y

la luz, son los factores del medio ambiente más importantes, que afectan el tamaño de la inflorescencia (GARCÍA, 1996).

5.5 Factores abióticos que afectan la producción de tomate.

Dentro de los factores abióticos que afectan la producción de tomate bajo invernadero, están: (a) radiación, se ha descrito que una reducción de un 1% de radiación óptima supone una pérdida de un 1% de producción (MARCELIS *et al.*, 2006); (b) temperatura, por encima de los 37°C puede ser un factor limitante en el cultivo debido a la alteración que provoca en diversos procesos fisiológicos, como es el caso de la inhibición del proceso de crecimiento del tubo polínico; (c) humedad, además de aumentar el riesgo de enfermedades fúngicas, un exceso de humedad relativa (HR) por encima del intervalo comprendido entre el 85 y el 90% conduce a una disminución clara de la producción y la calidad (ÁLVARO, 2011); (d) la salinidad, el cual es un factor limitante debido a que una alta salinidad provoca problemas en la absorción de agua y nutrientes por parte del sistema radical debido a la presión osmótica a la que se ven sometidas las raíces.

5.6 Zonas productoras de tomate en Venezuela.

El tomate es la hortaliza más importante en Venezuela. Las áreas de mayor producción de esta hortaliza en el país se localizan en los estados Lara, Portuguesa, Guárico, Aragua, Carabobo, Monagas y Zulia (INIA, 2005).

5.7 Aspectos generales de *Trichoderma* spp.

Trichoderma, se halla dentro de un gran número de especies de hongos de los que no se reconoce su reproducción sexual (GALEANO, *et al.*, 2002).

Todos los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. se basan en su papel como promotor de crecimiento vegetal, el cual se manifiesta desde las primeras fases de la plántula, y que le confiere mayores ventajas a la hora del trasplante. *Trichoderma* spp. se asocia a las raíces de la planta promoviendo un mayor vigor y crecimiento (GUÉDEZ, *et al.*, 2012). Este hongo crece externamente a medida que lo hace el sistema radicular de la planta con el que se encuentra asociado. El

resultado es un aumento de la captación de nutrientes y de agua en las raíces, ya que se explora mayor volumen de suelo, y a su vez, incrementa la solubilización de nutrientes como el fósforo. Este mayor vigor a su vez le proporciona a la planta una mayor tolerancia frente a diferentes tipos de estrés tanto abióticos (causado por salinidad, riegos y condiciones climáticas no óptimas como sequía, temperaturas altas) como bióticos (ataques de patógenos) (ALONSO *et al*, 2002).

Trichoderma spp., comprende la mayoría de las cepas utilizadas en el control biológico de hongos fitopatógenos (GAMS & BISSETT, 1998), siendo la cepa T-22 una de las más efectivas (HARMAN *et al.*, 1996) en parte por su adaptación a las diferentes condiciones ambientales. *Trichoderma* spp. como antagonista de muchos hongos patógenos puede realizar un control biológico sobre estos agentes y dicho control lo realiza principalmente a través de cuatro posibles mecanismos de acción:

- Micoparasitismo: un tipo de antagonismo donde el antagonista parasita al patógeno, pudiendo atacar a hongos como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Armillaria*, *Colletotrichum*, *Verticillium*, *Venturia*, *Endothia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Diaporthe*, *Fusicladium* (AHMED *et al.*, 1999, 2000; HARMAN *et al.*, 1996; LEWIS *et al.*, 1995; CALVET *et al.*, 1993).
- Antibiosis: es la inhibición del desarrollo o muerte del patógeno por un producto metabolizado por otro, incluyendo tanto antibióticos como enzimas líticas extracelulares (TRANE *et al.*, 1997; BENITEZ, *et al.*, 1998; SCHIRMBOCK *et al.*, 1994).
- Competencia: se realiza por el espacio en la rizosfera de la planta y por los recursos nutritivos, propiedad que le proporciona la habilidad de desplazar al patógeno, suprimiéndolo o no expresándose la enfermedad.
- Resistencia sistémica inducida: aislamiento e inhibición del patógeno y cambios histológicos en el hospedero.

Además se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar la

inducción de mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la inducción de resistencia (HARMAN, 2004), la eliminación de toxinas secretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de éstos durante el proceso de infección y la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (HARMAN, 2003).

Las especies del género *Trichoderma* están entre los antagonistas más utilizados para el control de un grupo importante de patógenos del suelo (TORRES *et al.* 2008; GONZÁLEZ, *et al.* 1999). Su aplicación al suelo es de forma preventiva en semilleros y en diferentes etapas del cultivo a fin de reducir la aparición de enfermedades (DONOSO *et al.*, 2008; TORRES *et al.* 2008) como las causadas por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) en ajonjolí (PINEDA, 2001), *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc) en tomate (JONES 1991) y *Phytophthora infestans* (Mont) en tomate (PÉREZ y SÁNCHEZ 2000).

- **Formulación de bioinsecticidas**

El género *Trichoderma* al ser usado para el control de fitopatógenos puede presentarse en diferentes formulaciones, las cuales juegan un papel muy importante en la supervivencia del inóculo (AULD, 1991, GOETTEL & ROBERTS, 1991, PEREIRA & ROBERTS, 1991, RODHAM *et al.*, 1999, LACEY *et al.*, 2001). El objetivo de una buena formulación es preparar una combinación de ingredientes de forma tal que el principio activo (conidos) se mantenga estable durante el almacenamiento y en campo, efectivo y fácil de aplicar. Entre las formulaciones más usadas en el desarrollo de productos fitosanitarios con base en hongos se encuentran el granulado, polvo, polvo mojable, materiales microencapsulados,

concentraciones emulsionables, floables o suspensiones concentradas (CARABALLO, 1998, FRAGAS *et al.*, 2007).

Para las formulaciones granuladas fúngicas en general, el tamaño de partícula se ubica mayoritariamente entre 0,3 y 1 mm de diámetro. Los gránulos han sido utilizados en la preparación de hongos antagonistas para el control de enfermedades fungosas (LEWIS & LARKIN, 1998), hongos entomopatógenos (SCHWARZ, 1995, SHAH *et al.*, 1999, SHAH *et al.*, 2000), micoherbicidas para erradicar plantas utilizadas por el narcotráfico (CONNICK *et al.*, 1998; AULD, 1991) y hongos para el control de nemátodos (STIRLING & SMITH, 1998).

Los materiales utilizados en la formulación deben ser inertes sobre animales, plantas o insectos benéficos, ni afectar la actividad del hongo, deben ser inócuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con el ingrediente activo, facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentable (CARABALLO, 1998, URTUBIA & FRANCE, 2007). En toda formulación se distinguen tres tipos de componentes, los cuales son el principio activo, ya sean conidios, micelio (URTUBIA & FRANCE, 2007), o clamidosporas en el caso de *Trichoderma* (FERNÁNDEZ-LARREA, 2006), el diluyente o vehículo, puede ser sólido o líquido, y es material inerte, y los adyuvantes que son materiales inertes, pero tienen función protectora, dispersante y adherente (KOVACH *et al.*, 2000).

VI. ANTECEDENTES

En el cultivo de *S. lycopersicum* se presentan muchas enfermedades producidas por fitopatógenos. Con el fin de investigar un posible uso integrado de fungicidas y microorganismos antagonistas para el control de *Alternaria solani*, agente causal del tizón o marchitez temprana del tomate, Monaco *et al.* (2001), llevaron a cabo estudios en condiciones *in vitro*. Se evaluaron el efecto de dos fungicidas Daconil® (Clortalonil F 72 %) y Dithane® (Mancozeb WP 80 %) de amplio uso en el control de dicha enfermedad, sobre seis hongos antagonistas de *A. solani* (*Fusarium semitectum*; *Trichoderma polysporum*; *Chaetomium globosum*; *Rhodotorula sp.*, *Cladosporium cladosporioides* y *Nigrospora sp.*) y calcularon los valores de dosis efectiva mediante una regresión. *Rhodotorula sp.* y *Cladosporium cladosporioides* fueron resistentes a Daconil® (valores DE 50: 142,89 y 112,14 ppm), con respecto a Dithane®, sólo resultó resistente *Chaetomium globosum* (valores DE 50: 38,72 ppm), y el resto de los tratamientos resultaron igual de sensibles para ambos fungicidas.

Así mismo, otra enfermedad común en plántulas de tomate es la provocada por *Sclerotium rolfsii*. Reyes *et al.* 2002, probaron la actividad controladora de la cepa A34 de *Trichoderma harzianum* sobre dicha enfermedad. El trabajo se desarrolló en macetas que contenían suelo infestado artificialmente con una concentración de inóculo del patógeno que provocó aproximadamente el 18% de mortalidad en plantas de tomate. Ellos comprobaron la eficacia de la actividad antagónica a partir de la ausencia de síntomas de la enfermedad en las plantas protegidas, cultivadas hasta los 30 días posteriores a su germinación.

Las cepas de *Trichoderma harzianum* producen un mayor vigor a las plantas tratadas con éste a la vez que le proporciona al cultivo una protección frente a patógenos del suelo. Galeano *et al.* 2002, estudiaron el efecto de la aplicación de *T. harzianum* sobre plantas de semillero de distintos cultivos hortícolas. Las plantas a las que se aplicó *T. harzianum* en la siembra mostraron una fracción radical y aérea mayor con respecto a las plantas no tratadas, pudiendo hacer

frente a condiciones de estrés con mayor éxito que las no tratadas que mostraron un crecimiento menor.

Las plantas de tomate deben permanecer en semillero entre 17 a 21 días, antes de ir definitivamente a campo. En esta etapa es frecuente observar pérdidas por hongos del suelo como *Pythium* sp., *Sclerotium* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp., causantes de una enfermedad común llamada “Sancocho”, que se caracteriza por una podredumbre en la base del tallo que causa la muerte de la planta y pérdidas en la siembra. No obstante, Perdomo *et al.* (2007), intentaron identificar el agente causal de dicha enfermedad y compararon aplicaciones en forma líquida y sólida del hongo *T. harzianum* en el control de ésta. Entre los hongos que se identificaron están *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp., reportados como causantes de la enfermedad “Sancocho”. El hongo *Pythium* sp. resultó el causante del mayor número de plantas enfermas. El control de esta enfermedad en semillero se realizó con aplicaciones líquidas y sólidas de *T. harzianum*, y el análisis de varianza indica que no hay diferencias significativas entre las formas de aplicación.

Entre los hongos causantes de enfermedades en las plantas de tomate, se encuentra el moho foliar (*Cladosporium fulvum*), el cual produce una enfermedad que ataca el cultivo de dicho fruto. Como alternativa al control de este patógeno, Torres *et al.*, (2008), probaron la eficiencia bajo condiciones *in vitro* e invernadero de cuatro hongos antagonistas: *Hansfordia pulvinata*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma virens*. Al concluir el ensayo, lograron comprobar que *T. harzianum* fue más eficiente debido a que redujo la severidad de la enfermedad en un 19,35 % bajo condiciones de invernadero.

Se ha comprobado que las cepas de *Trichoderma* ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas y su control con ciertas enfermedades provocadas por fitopatógenos. En el 2011, Jiménez *et al.* demostraron el efecto de *T. harzianum* sobre el crecimiento de plantas de tomate, empleando un diseño completamente aleatorio, en donde probaron con muestras en semilleros, transplantes, semilleros + transplantes (todos con aplicación del hongo) y una

muestra sin aplicación, en donde evidenciaron que las plantas en semilleros obtuvieron mejores resultados que aquellas sin aplicación, tanto en la parte aérea como radicular, mientras que las muestras con transplantes presentaron un incremento significativo en la densidad de la raíz. Concluyeron que con la aplicación de *T. harzianum* se estimula el crecimiento y desarrollo del tomate.

La marchitez vascular, causada por *Fusarium oxysporum*, es una enfermedad que afecta la zona radical de plantas de tomate y avanza en forma sistémica. Salazar *et al.* (2011), evaluaron la efectividad de *Trichoderma spp.* para el control de la fusariosis (marchitez) tanto *in vitro* como *in vivo*. Usaron diez aislamientos del género *Trichoderma*: cuatro de *T. harzianum* (B2, C3, I9, J10), cuatro de *T. koningii* (D4, E5, G7, H8), uno de *T. longibrachiatum* (A1) y uno de *T. atroviride* (F6), y cinco aislamientos del patógeno colectados en plantaciones de tomate. Para la prueba *in vitro* evaluaron los porcentajes de inhibición de crecimiento y de esporulación, mientras que para la prueba *in vivo* se infectaron las plantas con *F. oxysporum* bajo condiciones de umbráculo. Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a los distintos aislamientos de las especies de *Trichoderma*, en donde los aislamientos A1, I9, H8 y J10 presentaron los porcentajes más altos de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* (53,44%, 38,01%, 38,00%, 33,26%, respectivamente), mientras que los aislamientos I9 y J10 correspondientes ambos a la especie *T. harzianum* fueron los que, en general, presentaron un mejor control al considerar el conjunto de las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

VII. MARCO METODOLÓGICO

7.1 Material biológico.

Para todos los ensayos se utilizaron semillas comerciales de *S. lycopersicum* cv. Río Grande. Asimismo se utilizaron cepas de *Trichoderma* spp, específicamente *T. virens* (TV118), *T. asperellum* (TV190) y *T. harzianum* (TV200). Todas las cepas aisladas de plantaciones de maíz Venezuela (Dorta & Pavone, 2015) pertenecientes al cepario del Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Universidad de Carabobo. Las cepas fueron mantenidas por subcultivo en medio papa dextrosa (PDA).

7.2 Preparación de la formulación granulada y líquida.

Esporas provenientes de cultivos en PDA, fueron resuspendidas en agua. Posteriormente se realizó un conteo de esporas con ayuda de una cámara de Neubauer en donde se determinó el volumen necesario de esporas para obtener gránulos de 10^6 y 10^7 esporas/g (se sugirió tales concentraciones de una metodología previa trazada por Pavone, 2003). Estas suspensiones de esporas fueron mezcladas con almidón de maíz suplementado con sales minarales Nutrisol P[®] (NP) y Nutrisol K[®] (NK) al 1 % p/p, hasta obtener una masa homogénea con un contenido de agua (aproximadamente 50 % p/v), cuya consistencia permitiera procesar la masa a través de un molino de carne y obtener gránulos sueltos de aproximadamente 0,5 cm de diámetro. Así mismo se realizaron gránulos sin sales minerales, utilizados como control. Los gránulos así producidos, fueron secados al aire hasta un contenido de agua menor al 10 % p/v y mantenidos a temperatura de 8 °C hasta su posterior uso en los ensayos. Para las formulaciones líquidas, se realizó un conteo de esporas provenientes de cultivos en PDA, con una cámara de Neubauer y se determinó la cantidad necesaria de esporas para obtener en 500 mL de agua destilada, suspensiones de 10^6 y 10^7 esporas/mL.

7.3 Pruebas de crecimiento de *Trichoderma* spp. en la formulación granulada.

Se realizó un ensayo de esporulación del hongo en frascos estériles, que consistió en tomar 0,5 g de gránulos de dos concentraciones, 10^6 y 10^7 esporas/g por separado, e hidratados con un contenido de agua del 50 % p/v. Los gránulos fueron incubados a temperatura ambiente por cinco días. Los ensayos se realizaron por quintuplicado. Finalmente, se resuspendieron las suspensiones con esporas obtenidas de cada repetición por separado de las dos concentraciones en 50 mL de agua, y se determinó el número de esporas formadas en cada tratamiento con la ayuda de una cámara de Neubauer. Los resultados se expresaron en esporas/g.

7.4 Ensayos de vivero.

Para todos los ensayos de vivero hubo dos formas de inoculación para su posterior comparación: líquida y granulada. Para las esporas en medio líquido, las semillas se sumergieron en una suspensión de esporas en agua de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (10^7 esporas/mL), por separado y provenientes de cultivos esporulados del hongo en medio PDA. Posteriormente se secaron al aire por 12 horas a temperatura ambiente. Como control se utilizaron semillas sumergidas en agua. Alternativamente se utilizó la formulación granulada a base de almidón de maíz y cada especie de *Trichoderma* spp. por separado. En los ensayos de vivero, junto con cada semilla se colocó un gránulo con esporas de *Trichoderma* spp. Como controles se usaron gránulos sin esporas.

Los ensayos de vivero, se realizaron para el estudio de dos variables: el efecto de *Trichoderma* spp. y su formulación granulada sobre (a) el crecimiento de *S. lycopersicum* y (b) su efecto sobre el estatus hídrico de estas plantas sometidas a estrés hídrico moderado. Las semillas de tomate impregnadas con esporas de las diferentes cepas de *Trichoderma* por separado y el control, se sembraron en bandejas para semilleros con tierra abonada (previamente esterilizada) adquirida en el mercado local. Se colocó una semilla por orificio. Una vez que germinaron

las semillas, se aplicó una reinoculación de suspensión de esporas de *Trichoderma* spp. (según el caso), aplicando 1 mL de una suspensión del hongo (10^7 esporas/mL) en la base de la planta. En los tratamientos de semillas con gránulos, las plantas se reinocularon con una suspensión de esporas (según el caso), aplicando 1 mL de la suspensión (10^7 esporas/mL) en la base de la planta. Para cada tratamiento (tres cepas de hongos, dos formulaciones de cada una y los controles) se utilizaron 18 semillas (conjuntamente se realizó réplicas en otra bandeja de semilleros). En las plantas empleadas para la promoción de crecimiento, el régimen de riego fue interdiario. En los experimentos de tolerancia a déficit hídrico las plantas se sometieron a un régimen de riego interdiario hasta 21 días después de la siembra (dds), donde luego se procedió a la aplicación de un déficit hídrico, suspendiendo el riego en los ensayos (siguiendo la metodología sugerida por Tortolero & Pavone, 2012).

7.4.1 Determinación del crecimiento en *S. lycopersicum*.

Se determinaron dos parámetros de crecimiento en las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. con o sin formulación granulada: altura de la planta (yema apical) y masa seca aérea y radical. Al finalizar el ensayo, las plantas fueron cortadas en la base y el sistema radical fue separado del sustrato con lavado con agua corriente. Se determinó la biomasa aérea y radical (masa seca), colocando la parte aérea y la parte radical en estufa a 60 °C hasta que alcanzaran peso contante.

7.4.2 Determinación del efecto de *Trichoderma* spp. sobre el estado hídrico de plántulas sometidas a sequía.

Se siguió la metodología planteada por Tortolero & Pavone, 2012. Plantas de tomate de 30 días de sembradas inoculadas con *Trichoderma* spp. con y sin formulación granulada, se sometieron a déficit hídrico moderado. Se determinó el potencial hídrico del tejido foliar a los 5 días de la sequía y a los 8 días después de iniciada la misma. Las mediciones (cuatro por tratamiento) se llevaron a cabo

entre las 6 y 7 am empleando para ello una bomba de presión (PMS Instrument Co., Covallis, Or. Modelo 600).

7.5 Estabilidad en almacenamiento de la preparación granulada.

Se siguió la metodología planteada por Tortolero & Pavone, 2012. Las preparaciones granuladas de concentración de esporas utilizada (10^7 esporas/g) y cada cepa por separado, se sometieron a diferentes temperaturas (8°, 30° y 40 °C). Se hizo un conteo de esporas viables en las formulaciones al inicio del ensayo, a los 30 días y a los 6 meses, determinándose la viabilidad de las esporas a través de la resuspensión de las mismas en agua en diluciones de 1/10 con cinco (5) repeticiones para cada tratamiento, siembra en agar agua y determinación del porcentaje de germinación en un microscopio estereoscópico a una magnificación de 400X.

7.6 Procesamiento de datos y Análisis Estadísticos.

Una vez obtenidos los resultados estos se reportaron como promedio y error estándar. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey), para determinar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Los datos que no cumplieron con los supuestos del ANOVA, fueron sometidos a una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (K-W) para determinar diferencias significativas. Para esto se utilizó el programa Statistix v 8.0 (Analytical Software. PO Box 12185. Tallahassee, FL 32317).

VIII. RESULTADOS

8.1 Concentración óptima de esporas en la formulación granular.

La Figura 1 muestra la capacidad de las diferentes cepas de *Trichoderma* de esporular a expensas del gránulo bajo condiciones de esterilidad y presencia o ausencia de sales minerales. De forma general, puede apreciarse que en todos los tratamientos sin sales, los rendimientos en esporas por gramo fueron sistemáticamente menores en comparación con los gránulos formulados con sales, lo cual evidencia la importancia del agregado de las mismas a la formulación para obtener los máximos rendimientos, ya que la fuente de carbono (almidón) por sí sola, no logra aportar todos los requerimientos al hongo para una máxima esporulación.

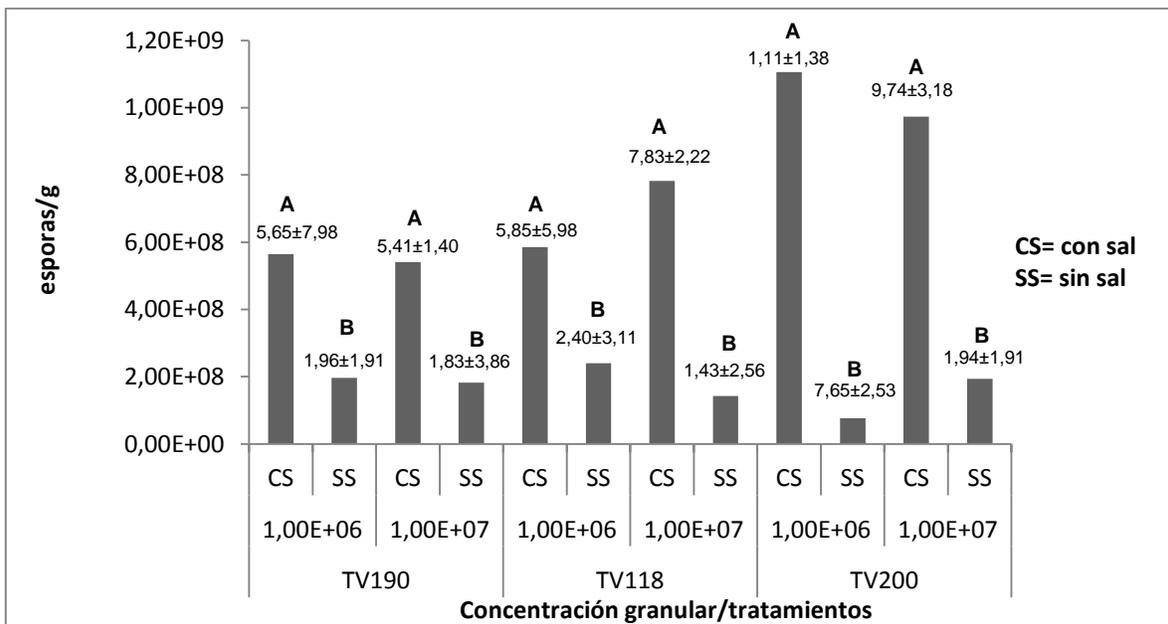


Figura 1. Determinación de la concentración de esporas en los gránulos y efecto de la presencia de sales minerales con las diferentes cepas estudiadas: *T. virens* (TV118), *T. asperellum* (TV 190), *T. harzianum* (TV 200). (A, B y AB: índices de similitud entre tratamientos).

En el caso de la concentración inicial de esporas en el gránulo, los resultados indican que los rendimientos fueron similares en los tratamientos con 10^6 y 10^7 esporas/g (TV190 $5,65E08 \pm 7,98E08$ y $5,41E08 \pm 1,40E08$, TV118 $5,85E08 \pm$

5,98E08 y 7,83E08 \pm 2,22E08, y TV200 1,11E09 \pm 1,38E09 y 9,74E08 \pm 3,18E08) sin diferencias significativas entre los tratamientos. A pesar de la similitud en los resultados obtenidos, se tomó como concentración óptima para los ensayos, 10^7 esporas/g, ya que no existe real diferencia en cuanto al costo y resulta una mejor proliferación del gránulo por poseer mayor concentración de esporas. No se descarta probar en futuros ensayos, concentraciones mayores (10^8 esporas/g), para estudiar su comportamiento y factibilidad económica.

8.2 Determinación del crecimiento en *S. lycopersicum* (altura de la planta).

Uno de los parámetros a evaluar en este trabajo, fue el efecto de la formulación granulada sobre el crecimiento del cultivo objeto de este estudio, el tomate. La presencia de la formulación granulada en el suelo, permitirá la multiplicación del inóculo del hongo, ejerciendo su papel de agente de biocontrol (parámetro no estudiado en este trabajo) y estimulador del crecimiento vegetal. En la Figura 2, pueden apreciarse los resultados obtenidos en relación al crecimiento de plántulas de tomate en los distintos tratamientos utilizados.

Según los análisis estadísticos realizados, no se encontraron diferencias significativas (varianza $p > 0,05$) entre los ocho tratamientos, para las variables evaluadas, sin embargo, se observó que con la aplicación de las formulaciones líquidas de las tres cepas estudiadas, hubo plantas con mayor longitud, al compararlas con las plantas bajo efecto de las formulaciones granulares de las tres cepas. En la Figura 2 se presenta el crecimiento de las semillas de *S. lycopersicum* a los 25 días después de sembradas y reinoculadas con los distintos tratamientos de *Trichoderma* spp., cabe mencionar que el tratamiento 1 (TV118 suspensión) presentó la mayor altura con un promedio de $9,04 \pm 0,57$ cm, seguido del tratamiento 2 (TV190 suspensión) con una altura en promedio de $8,92 \pm 0,49$ cm con respecto al resto de las plantas, los tratamientos 3, 8, 4 y 5 (TV200 suspensión, semillas con lavado en agua, TV118 granular y TV190 granular, respectivamente) mostrando una altura cuyos promedios oscilan entre los $7,91 \pm 0,51$ y $7,45 \pm 0,65$ cm aproximadamente, mientras que los tratamientos 6 (TV200 granular) y 7 (gránulos sin esporas) mostraron la menor altura entre todas

las plantas con un promedio de $6,56 \pm 0,95$ cm y $6,25 \pm 1,11$ cm respectivamente. A pesar de que no se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos, los datos sugieren un posible efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de las plántulas de tomate. Un mayor inóculo y una formulación distinta, pudiera evidenciar mejor este efecto estimulador del crecimiento vegetal.

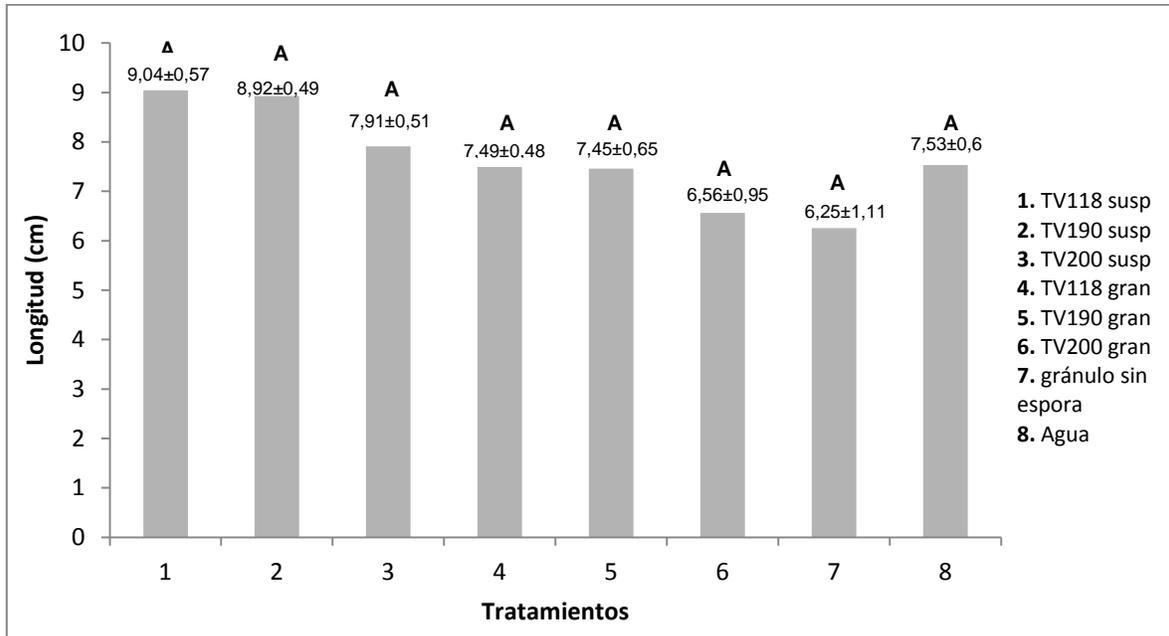


Figura 2. Crecimiento de plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *T. virens*, *T. asperellum* y *T. harzianum* (TV118, TV 190 y TV 200 respectivamente) en formulaciones granulares (gran) y líquidas (susp). (A, B y AB: índices de similitud entre tratamientos).

8.3 Determinación del crecimiento en *S. lycopersicum* (peso seco aéreo y radical).

El otro parámetro evaluado en este trabajo, fue la masa seca aérea y radical. En la Figura 3, se presentan los resultados obtenidos de masa seca aérea para cada tratamiento utilizado. Los datos evidencian una menor masa aérea en los tratamientos 4 (TV118 gran), 6 (TV200 gran) y 8 (agua) en relación al resto de los tratamientos, con diferencias significativas entre estos (apéndices 11.7 al 11.10). En el caso del tratamiento 5 (TV190 gran), el análisis estadístico evidencia que este grupo se asemeja a los más bajos pero también a los más altos (susp),

es decir, no presenta diferencias significativas. Esta tendencia en los resultados pareciera sugerir que la formulación granulada, afecta negativamente el crecimiento de las plántulas de tomate, o al menos las mismas no se benefician de la presencia de *Trichoderma*, ubicándolos al mismo nivel que los tratamientos control.

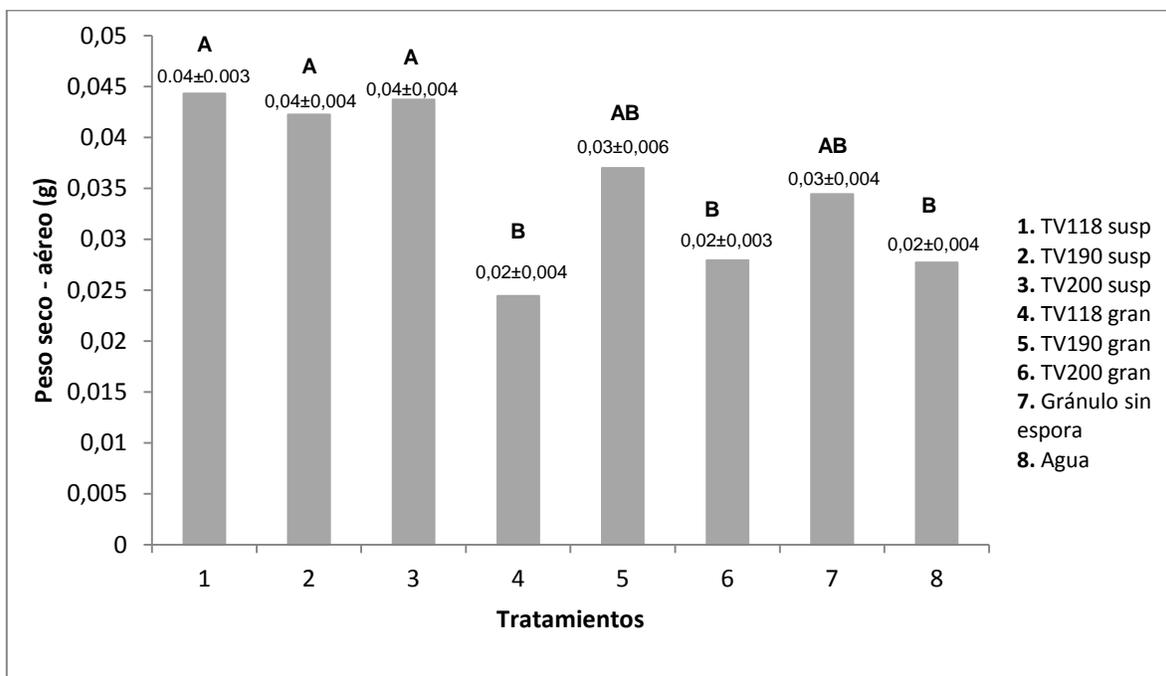


Figura 3. Masa seca aérea en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *T. virens*, *T. asperellum* y *T. harzianum* (TV118, TV 190 y TV 200 respectivamente) en formulaciones granuladas (gran) y líquidas (susp). Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí. (A, B y AB: índices de similitud entre tratamientos).

Los resultados de la determinación de la masa seca radical, se muestran en la Figura 4. En la misma puede apreciarse la misma tendencia que en los resultados de masa seca aérea, con valores mayores en los tratamientos con suspensión y valores menores y similares entre los tratamientos con gránulos y los controles.

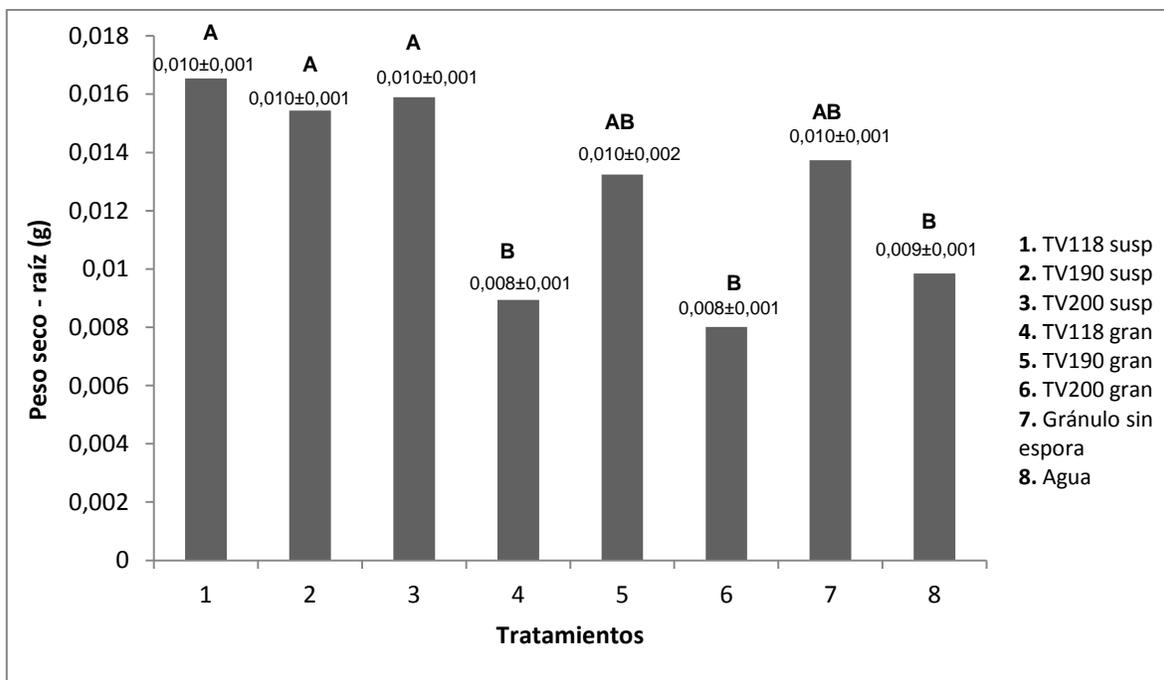


Figura 4. Determinación de la masa seca (peso seco) radical en plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con *T. virens*, *T. asperellum* y *T. harzianum* (TV118, TV 190 y TV 200 respectivamente) en formulaciones granulares (gran) y líquidas (susp). (A, B y AB: índices de similitud entre tratamientos). (A, B y AB: índices de similitud entre tratamientos).

8.4 Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el estado hídrico de plántulas inducidas a sequía.

Entre los factores que afectan el desarrollo normal de una planta se encuentra el estado hídrico de ésta, parámetro que toma más importancia durante el inicio de su crecimiento como plántula cuando se encuentran más indefensas. Los resultados del estado de las plántulas sometidas a estrés hídrico en presencia de formulaciones de *Trichoderma* spp. se muestran en la Figura 5, donde se señala que a los 5 días de sequía, el tratamiento con una mayor tolerancia al estrés hídrico fue TV200 granular con un promedio de $-0,1425 \text{ MPa} \pm 0,036$ representando el valor mayor de potencial hídrico, seguidamente del tratamiento con la cepa TV118 granular con un promedio de $-0,2975 \text{ MPa} \pm 0,085$, el tratamiento con la cepa TV190 granular arrojó un potencial hídrico de $-0,325 \text{ MPa} \pm 0,050$. Los tratamientos con formulaciones líquidas mostraron los valores más negativos de potencial hídrico, siendo la cepa TV190 con un promedio de $-0,4575$

MPa \pm 0,067 el más negativo de todos, seguido de la cepa TV200 con un potencial hídrico de -0,445 MPa \pm 0,055, mientras que el tratamiento con la cepa TV118 arrojó un potencial hídrico de -0,3975 MPa \pm 0,020. Los controles a los 5 días de sequía mostraron un potencial hídrico intermedio entre todos los tratamientos, donde los gránulos sin esporas arrojaron un promedio de -0,3575 MPa \pm 0,069 y semillas en agua un promedio de -0,33 MPa \pm 0,066.

La Figura 5 señala los potenciales hídricos de las plántulas con todos los tratamientos a los 8 días después de someterse a sequía, los cuales señalan resultados similares a los anteriores, donde una vez más los tratamientos con formulaciones granuladas mostraron una mayor tolerancia al déficit hídrico. El tratamiento con la cepa TV200 granular arrojó un potencial hídrico con un promedio de -0,525 MPa \pm 0,032, seguido de la cepa TV118 granular con un promedio de -0,555 MPa \pm 0,052 y de la cepa TV190 granular con un promedio de -0,59 MPa \pm 0,031. El resto de los tratamientos se encontraron en un estado de marchitez avanzada por lo cual fue imposible determinar el potencial hídrico de los mismos.

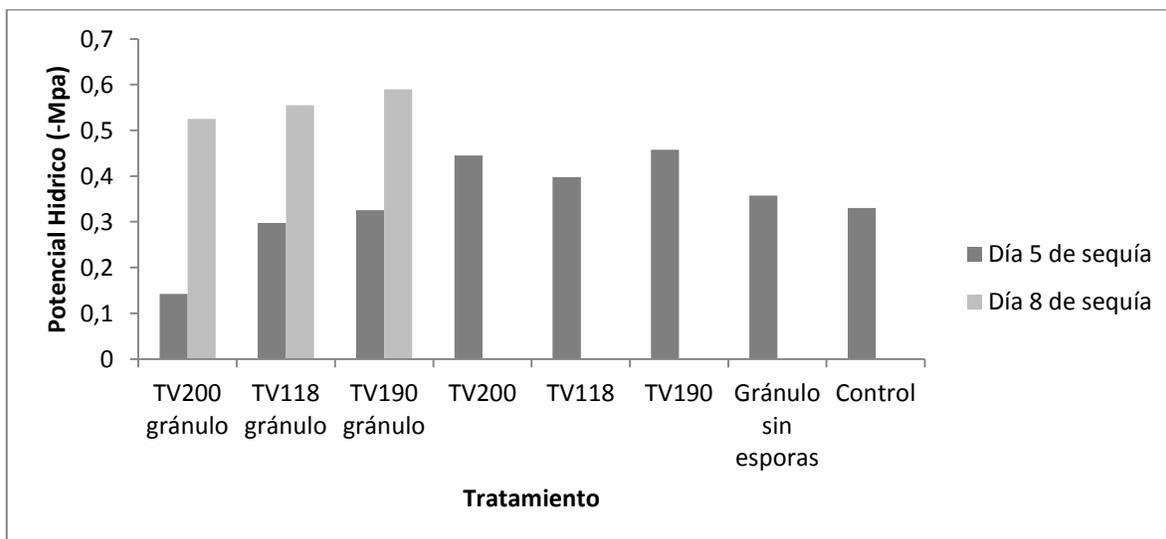


Figura 5. Determinación del efecto de *Trichoderma* spp. sobre el estado hídrico de plántulas sometidas a sequía.

8.5 Estabilidad en almacenamiento de la preparación granulada

La estabilidad en almacenamiento, es una variable muy importante al momento de comercializar un producto granulado con base en *Trichoderma* spp., ya que permite asignar fechas de vencimiento y las condiciones de almacenamiento del producto. La Tabla I muestra los resultados de la viabilidad de las esporas a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

En la tabla I se observa el conteo de esporas al inicio del ensayo, transcurrido un mes y a los seis meses después de mantenerse en almacenamiento bajo las distintas temperaturas del ensayo. De forma general, a mayor tiempo en almacenamiento se va perdiendo la viabilidad de las esporas. A un mes de almacenamiento la disminución es mínima ($\approx 11\%$ en todos los tratamientos, mientras que a los 6 meses la viabilidad baja drásticamente ($\approx 24\%$), para todas las temperaturas medidas.

Tabla I. Efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas en las formulaciones granuladas de *T. virens* (TV118), *T. asperellum* (TV190) y *T. harzianum* (TV200).

	8°C	30°C	40°C
Germinación (esporas/g) TV118			
Esporas iniciales	$5,6 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
Esporas en 1 mes	$4,6 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$
Esporas a los 6 meses	$3,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
Germinación (esporas/g) TV190			
Esporas iniciales	$4,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$
Esporas en 1 mes	$4,3 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
Esporas a los 6 meses	$3,3 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$
Germinación (esporas/g) TV200			
Esporas iniciales	$5,1 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
Esporas en 1 mes	$4,4 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$
Esporas a los 6 meses	$3,8 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$

Para el porcentaje de germinación, todas las repeticiones resultaron incontables o contaminadas, por lo que no se pudo calcular el mismo.

IX. DISCUSIONES

9.1 Concentración óptima de esporas en la formulación granular.

Con base en los resultados obtenidos, se escogió la condición de gránulos con sales y 10^7 esporas/g, para los subsiguientes ensayos, por no presentar diferencia en costo con respecto al otro tratamiento según las condiciones utilizadas.

Otros estudios han demostrado la necesidad del agregado de sales minerales a fuentes de carbono para el crecimiento de hongos filamentosos, específicamente sobre lodo papelerero con el hongo *Trichoderma reesei* (CENTENO & PAVONE, 2015; PAVONE & DORTA, 2015), y hongos xilófagos (PRADO, 2017). En estos casos, el sustrato es un desecho de la industria papelera, rico en celulosa pero muy pobre en sales minerales, lo cual obliga al agregado de las mismas para el desarrollo del hongo. En el caso de los gránulos con base en almidón utilizados en este estudio, los rendimientos fueron bajos, mientras que en los trabajos con lodo papelerero citados, no se observó crecimiento, lo cual es indicativo que en el almidón hay algún tipo de sales que permite un crecimiento limitado del hongo.

En formulaciones granuladas de *Trichoderma* spp. hay poca información bibliográfica, sin embargo, se han desarrollado patentes como EP 2227538 A1 y WO 2009083819 (Yahya & Mehmet, 2010), las cuales aún no se han probado en tomate.

9.2 Determinación del crecimiento en *S. lycopersicum* (altura de la planta).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con los expresados por CASTILLO, 2007, quien a plantas de maíz dulce variedad Golden Baby realizó tres aplicaciones de *Trichoderma harzianum* y no presencié cambio significativo en la altura de las plantas a los 60 días.

Sin embargo, también se hallan antecedentes de resultados positivos con respecto al efecto de *Trichoderma* sobre la altura de las plantas, como los

resultados señalados por DONOSO *et al.* (2008) y YEDIDIA *et al.* (2001), quienes mencionan que la aplicación de *Trichoderma* en semillero, puede causar incremento en el crecimiento de la planta, debido a la producción de factores que pueden estimular el crecimiento y aumentar la capacidad de las raíces en aprovechar los nutrientes. Las especies del género *Trichoderma* por ser un hongo celulolítico, pueden degradar el “pergamino” que recubre el endospermo de la semilla lo cual puede incrementar la velocidad de germinación (TORTOLERO & PAVONE, 2012).

Es importante señalar que los resultados de esta investigación reflejan que con la aplicación de *Trichoderma* no se evidenció un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas. La ausencia de un efecto en el crecimiento quizás pueda ser atribuido a factores que no se consideraron en el presente estudio, como tipo de planta hospedera, y la capacidad de estimular el crecimiento en estas por parte de las cepas de *T. virens*, *T. asperellum* y *T. harzianum*, así como factores climáticos no determinados y el tiempo de evaluación (25 días), ya que quizás las plantas de tomate requieren de un mayor tiempo para que el antagonista pudiera manifestar su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas (JIMÉNEZ *et al.*, 2011), así como también podrían necesitar de más espacio para que éste pueda ejercer su efecto estimulador del crecimiento.

9.3 Determinación del crecimiento en *S. lycopersicum* (peso seco aéreo y radical).

La razón de esta tendencia podría deberse a que al inicio del experimento, los tratamientos con suspensión de esporas, ya poseen las mismas adheridas a la semilla en contacto directo, mientras que las esporas en los tratamientos con los gránulos, están inmersas en el mismo y creciendo a expensas de éste, un mejor efecto de los tratamientos con gránulos podría observarse en tiempos posteriores en el experimento, una vez que se multiplique el inóculo, el gránulo se disgregue y estas esporas puedan estar en contacto directo con la plántula.

Otro factor que podría estar afectando el crecimiento en los tratamientos con gránulos es que estos ensayos se realizaron en bandejas con orificios

individuales, lo cual genera un relativo poco espacio para el crecimiento vegetal. La presencia del gránulo en este pequeño espacio pudo representar una barrera para el crecimiento de las plántulas. Este tipo de aplicaciones con gránulos pueden realizarse también en las plantas ya sembradas en campo, lo cual podría resolver el posible problema de espacio, dejando para los primeros estadios en bandejas, las aplicaciones en forma de suspensión.

En la literatura consultada no hay reportes del efecto observado en este trabajo, debido probablemente a que la mayoría de los mismos derivan en patentes, que no aportan todos los detalles de la investigación. Es evidente que se requieren más ensayos para poder estudiar con detalle este efecto y la razón del mismo.

Al igual que en este trabajo, Entre los parámetros que se han reportado que *Trichoderma* spp. puede mejorar, está el aumento de la biomasa tanto aérea como radical (BJÖRKMAN *et al* 1998; WINDHAM *et al* 1989), quienes señalan que uno de los principales mecanismos empleados por *Trichoderma* spp. para ejercer su acción bioestimuladora es la capacidad de solubilizar nutrientes y minerales del suelo no disponibles para las plantas.

Pocas especies de *Trichoderma* han sido identificadas como solubilizadoras de fósforo, siendo *T. harzianum* una de las más eficientes (ALTOMARE *et al*, 1999; HARMAN, 2000). El efecto de *Trichoderma* spp. puede deberse, además de la solubilización de fosfatos, a la producción de fitohormonas, al incremento en la toma de hierro a través de los sideróforos quelantes y/o a la inducción de resistencia sistemática contra un amplio espectro de patógenos. Los mecanismos de solubilización de fósforo incluyen la liberación de ácidos orgánicos, protones y fosfatasa en la rizósfera. La presencia de aniones orgánicos como son los ácidos liberados por el hongo, pueden conducir a un incremento en la carga negativa y disminución en la carga positiva del suelo (XU *et al.*, 2003, citado de LUZ, 2013).

Cabe destacar, que después del nitrógeno (N) y el fósforo (P), el potasio (K) es el nutriente vegetal de mayor importancia ya que es esencial para el desarrollo

de la planta y juega un papel fundamental en la síntesis proteica, fotosíntesis, activación enzimática, así como en la resistencia a enfermedades e insectos (REHM & SCHMITT, 2002, citado de VELÁZQUEZ & RAMOS, 2015). Actualmente, ha sido descrita la capacidad solubilizadora de potasio del género *Trichoderma* (VELÁZQUEZ & RAMOS, 2015).

9.4 Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el estado hídrico de plántulas inducidas a sequía.

El género *Trichoderma* lleva a cabo mecanismos que le proveen a las plantas inoculadas con las cepas una mayor tolerancia al estrés hídrico, los cuales a su vez están relacionados con los mecanismos de promoción de crecimiento antes descritos. En plantas de maíz se ha reportado que la presencia de *Trichoderma* en el suelo, logra mejorar las condiciones hídricas de las plantas bajo sequía moderada (TORTOLERO & PAVONE, 2012). Resulta probable que estas sean las razones, del efecto de mejoramiento del estatus hídrico en los ensayos de este trabajo.

El estrés se refiere a los cambios ambientales que alteran al estado fisiológico de las plantas (LARCHER, 1995). Cuando no existe un suministro suficiente de agua el potencial hídrico se hace más negativo, cuando alcanza valores por debajo de -0,05 hasta -0,1 Mpa, se dice que existe estrés y para muchos cultivos, el punto de marchitez permanente se alcanza cuando el suelo llega a valores de -2 MPa. Las hojas de las plantas pueden, generalmente, tolerar deficiencias más altas que -2 MPa por períodos cortos (algunas horas), pero si la deficiencia continua, resulta en una marchitez permanente (SLATYER & GOODE, 1967).

El término déficit hídrico en las plantas, significa insuficiencia interna de agua y puede ser inducida por escasez de agua en el suelo o porque la pérdida de agua por transpiración prosigue hasta ser mayor que la tasa de absorción de agua por las raíces, es decir, cuando el balance hídrico se torna negativo. El término sequía se refiere usualmente a una condición por la cual el agua no puede ser

aprovechada en forma satisfactoria por la planta, produciéndose un déficit hídrico en los tejidos al punto de afectar el crecimiento y desarrollo (TRIGOZO, 2012).

Un sistema radical más grande, como los que se inducen por la presencia de *Trichoderma*, pudiera explicar un mejor estatus hídrico, debido a que la plántula puede explorar un mayor volumen de suelo. Sin embargo, en este trabajo los valores más altos de potencial hídrico se obtuvieron en los tratamientos con gránulos, mientras que los mayores valores de masa seca radical se obtuvieron en los tratamientos donde se aplicó una suspensión de *Trichoderma* spp. Esta aparente discrepancia podría explicarse por la presencia de la masa del granulo en el pequeño espacio del orificio de la bandeja, que pudo impedir que el agua se evaporara más rápidamente. Para poder demostrar esta afirmación, se debe determinar el potencial hídrico del suelo en todos los tratamientos a medida que avanza la sequía.

9.5 Estabilidad en almacenamiento de la preparación granulada

Las altas temperaturas pueden afectar la estabilidad de los hongos entomopatógenos en almacenamiento. Este factor es muchas veces limitante, ya que puede afectar la germinación de las esporas, el desarrollo y la penetración del tubo germinativo, la colonización y la reproducción (LECUONA *et al*, 1996).

La estabilidad de las formulaciones de biopreparados en almacenamiento depende de varios factores, entre estos están los ingredientes de las mismas, la humedad relativa y la temperatura. Algunos autores han encontrado buena viabilidad en almacenamiento a humedades relativas de 4-5%. Las arcillas como zeolita o caolín, se han empleado como formulación inerte para incrementar la viabilidad en almacenamiento a 4° y 30 °C con buenos resultados (GATO, 2010). Adicionalmente, otros estudios han demostrado que la disminución en la viabilidad es causada principalmente por la temperatura del proceso de secado, independientemente de la actividad acuosa (FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). En ensayos con semillas de trigo recubiertas con esporas de *Trichoderma atroviridae* en una base de goma, Xantano, se encontró que mientras menor sea la temperatura y la humedad en el almacenamiento, mayor será la sobrevivencia de

las esporas en almacenamiento (SWAMINATHAN *et al.*, 2016). No obstante, los resultados obtenidos difieren con los antes ya definido, por lo que se puede decir que el proceso de secado pudo haber intervenido de manera negativa. Burges, 1998, argumentó que el retraso en la germinación de los conidios posiblemente se debe a la deshidratación de los mismos durante el tiempo de almacenamiento.

El aumento de la temperatura durante la preparación de la formulación puede jugar un papel importante en la viabilidad en almacenamiento. Cuando esporas de *T. harzianum* fueron formuladas en silica gel con y sin calentamiento, exhibieron una viabilidad más alta con un secado lento. En almacenamiento la viabilidad bajo más rápido con humedades y temperaturas altas (PEDRESCHI & AGUILERA, 1997). En nuestro caso las temperaturas durante la formulación nunca excedieron a la del ambiente y el proceso de secado fue durante 24 horas, para lo cual, lamentablemente, no se determinó la velocidad del mismo, por lo que es difícil comparar nuestros resultados con los de Pedreschi y Aguilera.

En el mercado mundial existen diferentes productos a base de *Trichoderma harzianum* como RootShield® WG, PlantShield® WP y Rootmate® WG, para los que los fabricantes estimaron una vida útil de 6 meses a temperatura entre 10° y 25°C y de 9 meses si el almacenamiento se realiza entre 0° y 10°C (SANTOS *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta lo anterior, y según los resultados obtenidos, se estima un tiempo de vida útil de un mes para la formulación granulada producida, sin embargo, se considera pertinente realizar ensayos entre 1 mes y 6 meses de almacenamiento para calcular la viabilidad en dicho intervalo.

X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Es factible obtener una formulación granulada con base en esporas de *Trichoderma* spp, que una vez hidratada, pueda crecer y esporular a expensas del almidón del gránulo, multiplicar el inóculo y crear focos de infección.
- La mejor formulación para un óptimo crecimiento bajo las condiciones de estudio fue a una concentración de 10^7 esporas/g con sales minerales, las cuales resultaron cruciales para lograr una mayor esporulación.
- Las cepas de *Trichoderma* utilizadas, lograron aumentar el crecimiento de las plántulas de tomate, aunque este efecto se observó mejor en las formulaciones líquidas, debido probablemente a que en estas, las esporas están en contacto directo con la semilla, mientras que en el gránulo, deben crecer y esporular para aumentar su inóculo.
- Las formulaciones granuladas parecen brindar a las plantas cierta protección contra periodos moderados de sequía, aunque pareciera ser un efecto físico por la presencia del material del gránulo.
- De forma general, la temperatura en almacenamiento es un factor muy importante para mantener una buena viabilidad de las esporas por largos períodos de tiempo, sugiriéndose una temperatura a 8°C como ideal.
- A los seis meses de almacenamiento, la viabilidad de todos los tratamientos cayó drásticamente.
- Se sugiere realizar formulaciones con mayor número de esporas y otras sales minerales para comprobar si es posible aumentar el crecimiento del hongo o disminuir el tiempo para lograr esto.
- Como los datos sugieren que la presencia del gránulo en los pequeños orificios de las bandejas, pudo afectar negativamente el desarrollo de las plántulas, se recomienda la realización de ensayos de campo, donde no haya limitantes de espacio para el desarrollo de la planta.

- Se debe estudiar el potencial hídrico del suelo en los orificios de las bandejas para comprobar si la presencia del mismo, puede afectar positivamente el estatus hídrico de las plántulas.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Ahmed, S., Pérez-Sánchez, C., Egea, C. & Candela, M. (1999). Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by to *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathol.*, 48: 58-65.
2. Ahmed, S., Pérez-Sánchez, C. & Candela, M. (2000). Evaluation of induction of systematic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106:817-824.
3. Alonso, R., Barranco ,B., García, G. & Jiménez, G. (2002). Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Universidad Pedagógica José Martí. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 66: 45-48.
4. Altomare, C., Norvell, W., Björkman, T. & Harman, G. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growthpromiting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. and Environ. Microb.* 65: 2926-2933.
5. Álvaro, J. & Urrestarazu, M. (2011). Incidencia de los factores abióticos en la producción del tomate en invernadero. Manejo de cultivos. Universidad de Almería. Revista agropecuaria, N° 939. 270-273 pág. España. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_2011_939_270_273.pdf. Revisado el 03/02/2015.
6. Apaza, W. (1999). Principales enfermedades foliares del tomate en el Perú. *Fitopatología*, Lima. 34: 78-79.
7. Auld, B. (1991). Mass production, formulation and application of fungi as biocontrol agent. En: Biological control of locust and grasshoppers. Proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical agriculture, 29 april – 1 may 1991. Edited by C. J. Lamer & C. Prior. Walingtord, Oxford, UK. CAB International. Pág. 219-229.
8. Baldomero, H. & Zárata, N. (2007). Producción de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hidropónico con sustratos, bajo invernadero. Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales. Instituto Politécnico Nacional. Oaxaca, México.

9. Benítez, T., Limon, J. & Rey, M. (1998). Glucanolytic and other enzymes and their control. En: *Trichoderma* and *Gliocladium*. 2: 101-127. Eds. Taylor & Francias. Londres.
10. Björkman, T., Blanchard, L. & Harman, G. (1998). Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of environmental stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 123: 35-40.
11. Calvet, C., Pera, J. & Barea, J. (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculum with *Glomus mosseae*, *Trichoderma atroviride* and *Pythium ultimum* in a peat-pertite mixture. Plant Soil, 148: 1-6.
12. Caraballo, M. (1998). Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo integrado de plagas. 47:1-4. Costa Rica.
13. Castillo, R. (2007). Efecto de la aplicación de (*Trichoderma harzianum*) en la producción de maíz dulce (*Zea mays*) variedad Golden Baby. Proyecto Especial presentado para optar al título de Ing. Agrónomo. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
14. Centeno R. & Pavone D. (2015). Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 35: 40-46.
15. Connick, W., Daigle, D., Pepperman, A., Hebbar, K., Lumsden, R., Anderson, T. & Sans, D. (1998). Preparation of stable, granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. Biological Control. 13: 79-84.
16. De Courcy, W., Edmondson, R. & Gill, G. (2000). The potential of some adjuvants in promoting infection with *Verticillium lecanii*: Laboratory bioassay with *Myzus persicae*. Ann. Appl. Biol. 137: 337-345.
17. Dewit, M., Brandwagt, B., Van Den Burg, H. & De Jong, C. (2002). The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. Antonie Van Leeuwenhoek, Nueva York. 81: 409-412.
18. Donoso, E., Lobos, G. & Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. Bosque 29 81: 52-57.

19. Esquinas, J. & Nuez, V. (2001). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. F. Nuez. Mundi-Prensa. España. 13-42 pág.
20. Fernández, O. (2006). Temas interesantes acerca del control biológico de plagas. Instituto Nacional de Plagas Agrícolas, Venezuela. Ficha técnica.
21. Fernández, M., Ortiz, M., Galindo, E. & Serrano, L. (2012) Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. Process Biochemistry 47(2) 186–194.
22. Fragas, I., Fleitas, G. & Hidalgo, L. (2007). Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico. La Habana.
23. Galeano, M., Méndez, F. & Urbaneja, A. (2002). Efecto de *Trichoderma harzianum* (cepa T-22) sobre cultivos hortícolas. Departamento I+D. Koppert Biological Systems. Finca Labrador ciclo del medio. Murcia, España. Disponible en:
http://www.koppert.com/fileadmin/user_upload/Overig/Koppert/Koppert.nl/PDF/ES/trianum/HORTICOLAS_SEMILLEROS.pdf. Revisado el 03/03/2015.
24. Gams, W. & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium*. 1: 3-34. Eds. Taylor & Francias. Londres.
25. García, A. (1996). Revista: Productores de hortalizas. Manual de acolchado 11 parte. 1:1-11.
26. Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. Fitosanidad. 14(3): 189-195.
27. Goettel, M. & Roberts, D. (1991). Mass production, formulation and application of fungi as biocontrol agent. AGRIS: International Information System for the Agricultural Science and Technology. En: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9124447>. Revisado el 03/02/2015.
28. González, C., Fonseca, M. & Arjona, C. (1999). Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanáceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. Investigación agraria. Producción y Protección vegetal. 14 (1-2): 297-306.

29. Guarro, J., Gené, J. & Stchigel, M. (1999). Development in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington. 12: 454-500.
30. Guédez, C. Canizales, L., Castillo C. & Olivar, R. (2012). Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 32:44-49.
31. Harman, G., La Torre, B., Agosin, E., San Martín, R., Riegel, D. G., Nielsen, P., Tronsmo, A. & Pearson, R. (1996). Biological and integrated control of Botrytis bunch rot of grape using *Trichoderma spp.* *Biol. Control*, 7: 259-266.
32. Harman, G. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393.
33. Harman, G. (2003). *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). 2: 45-54. Consultado el 20/02/2015. Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>
34. Harman, G. (2004). Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.*, 84: 377-393.
35. Hone, G., Van Den Aukerveken, G., Gelsang, R. & De Wit, P. (1994). Molecular characterization of the interaction between the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and tomato. *Euphytica*, Washington. 79: 219-225.
36. Hua, L. & Feng, M. (2003). New use of broomcorn millets for production of granular culture of aphid-pathogenic fungus *Pandora neoaphidis* for high sporulation potential and infectivity to *Myzus persicae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 227: 311-317.
37. Iannacone, J. & Murrugarra, Y. (2002). Efecto del nim y rotenona en las poblaciones de *Tuta absoluta* (meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) en dos especies de áfidos (Homoptera: Aphididae) en el cultivo de Tomate en Ica, Perú. *Folia Entom. Mex.* 41:119-128.
38. Iannacone, J. & Reyes, M. (2001). Efecto en las poblaciones de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) por los insecticidas botánicos nim y rotenona en el cultivo de tomate en el Perú. *Rev. Colom. de Entom.* 27: 147-152.

39. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). (2005). El cultivo de hortalizas en Venezuela. Serie Manuales de cultivo INIA N°2. 192 págs.
40. Inyang, E., McCartney, H., Oyejola, B., Inbrahim, L., Pye. B., Archer, S. & Butt, T. (2000). Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. Mycol. Res. 104: 653-661.
41. Jaramillo, J., Rodríguez, V., Guzmán, M., Zapata, M. & Rengifo, T. (2007). Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Manual técnico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/co/manualtomate.pdf>. Revisado el 03/02/2015.
42. Jiménez, C., Sanabria, N. Altuna, G. & Alcano, M. (2011). Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Revista Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. 28:1-10.
43. Jones, J. (1991). *Fusarium wilt* in: Compendium of tomato disease. Eds. Jones, J., Stall, T. American Phytopathology Society Press. p.14.
44. Kovach, J., Petzoldt, R. & Harman G. (2000). Use of Honey Bees and Bumble Bees to Disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to Strawberries for Botrytis Control. Bio. Contr. 18: 235-242.
45. Lacey, L., Frutos, R., Kaya, H. & Vail, P. (2001). Insects pathogens as biocontrol agents: Do they have future?. Biol. Contr. 21(3): 230-248.
46. Larcher, W. (1995). Physiological Plant Ecology. Springer – Verlag. Berlín. 506 págs.
47. Lecuona, R. & Alves, S. (1996). Epizootiología. En: Pavone. D. (2003). Formulación de un bioinsecticida con base en el hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson para el control de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae).
48. Leland, J. Mullins, D. Smits, N. Fargues, J. Warren, H. & Larry, V. (2001). Coating *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* with water-soluble lignins for enhanced UVB-protection and effects on virulence to *Schistocerca americana* (Drury). Disponible en:

http://esa.confex.com/esa/2001/techprogram/paper_3552.htm. Revisado el 12/03/2017.

49. Lewis, J. A., Fravel, D. & Lumsden, R. (1995). Application of Biocontrol fungi in granular formulation of pregelatinized starch-flour to control damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani*. Biol. Control, 5: 397-404.

50. Lewis, J. & Larkin, R. (1998). Formulation of the biocontrol fungus *Cladorrhinum foecundissimum* to reduce damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. Biological Control. 12: 182-190.

51. Lieckfeldt, E., Samuels, G. & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. Applied and Environmental Microbiology, Washington. 65: 2418-2428.

52. Marcelis, M., Leo, F. & Hoffman, L. (2006). Effect of temperatura on the growth of individual cucumber fruits. Physiologia Plantarum. 87: 321-328.

53. Martínez, A., Roldán, A., Lloret, E. & Pascual, J. (2009). Formulación de *Trichoderma harzianum* rifai en la producción agrícola de plántulas de melón en semillero para el control de la Fusariosis vascular. Dpto. de Conservación de suelos y agua y Manejo de residuos orgánicos. Campus Universitario de Espinardo. Disponible en:

http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/10%20P%20SV/11.pdf. Revisado el 13/03/2017.

54. Martínez, B., Fernández, L. & Solano, T. (1994). Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate, tabaco. Cultivos tropicales, La Habana. 15: 5.

55. Monaco, C., Nico, A., Rollán, M. & Urrutia, M. (2001). Efecto *in vitro* de dos fungicidas sobre la microflora antagonista al tizón temprano del tomate. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16(3): 325-332.

56. Papavizas, C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto. 23: 23-54.

57. Pavone, D. (2003). Formulación de un bioinsecticida con base en el hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson para el control de *Spodoptera frugiperda* Smth

(Lepidoptera: Noctuidae). Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Trabajo presentado para optar al grado académico de Magíster Scientiarum en Agronomía Orientación Protección Vegetal.

58. Pavone, D., Díaz, M., Trujillo, L. & Dorta, B. (2009). A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). *Interciencia*, 34(2): 130-134.

59. Pedreschi F. & Aguilera J, (1997). Viability of dry *Trichoderma harzianum* spores under storage. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 17(3): 177-183.

60. Perdomo, M., Peña, J., Guédez, C., Castillo, C. & Cásales, L. (2007). *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad “sancocho” en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico. Universidad de Los Andes. Sede Carmona. Acad. 6(12): 52-61.

61. Pereira, R. & Roberts, D. (1991). Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journ. of Econom. Entomo.* 84(6): 1657-1661.

62. Pérez, J. & Sánchez, V. (2000). Efectos de los sustratos celulosa y glucano sobre antagonistas de *Phytophthora infestans* en tomate. *Manejo integrado de Plagas*. 58: 45-53.

63. Pineda, J. (2001). Evaluación de métodos de aplicación de *Trichoderma harzianum* al suelo para el control de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí. *Fitopatología Venezolana*. 14 (2): 32-34.

64. Prado, M. (2017). Optimización de la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilófagos aislados de madera en descomposición. Tesis de Pregrado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Venezuela.

65. Reyes, M., Delgado, J., Rincón, A. & Benítez, T. (2000). Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como fungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología, España*. 17: 31-36.

66. Reyes, R., Martínez, B., Rivero, G. & Montejó, G. (2002). Actividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. *Manejo integrado de Plagas y Agroecología*. 66: 45-48.

67. Rodham, D., Wang, Y., Cantwell, J., Winn, P. & Foundling, J. (1999). Formulating microbial biocontrol agents. *Pest. Scie.* 55(3): 340-342.
68. Rodríguez, R., Tavares, R. & Medina, J. (2001). Cultivo moderno del Tomate. Edit. Mundi-Prensa. Madrid, España. 255 págs.
69. Ruano, D., Moral, L. & López, C. (2003). Estudio de temperaturas de crecimiento *in vitro* en aislados de *Trichoderma* sp. y de *Rosellina necatrix*. Evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. Instituto de Agricultura Sostenible, España. Actas V Congreso Mundial del Aguacate, 2003. 525-529.
70. Salazar, L., Sanabria, N., Aponte, G., Alcano, M., Herrera, R., Colmenares, D., Espinoza, M., Alemán, L. & Magaña, S. (2011). Efectividad de aislamientos de *Trichoderma spp.* en el control de la Fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *Bioagro* 23(3): 185-190.
71. Santamarina, M., Rosello, J. & Sanchis, V. (2002). Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum*. Corrie and Thom, *Penicillium decumbens*. Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects *in vitro*. *Revista Iberoamericana de Micología, España.* 19: 99.
72. Santander, C., Montealegre, J. R. & Herrera, R. (2003). Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Chile. *Cien. Inv. Agr.* 30(2): 107-112.
73. Santiago, J., Mendoza, M. & Borrego, F. (1998). Evaluación del tomate (*Lycopersicon esculentum*), en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. *Agronomía mesoamericana.* 9(1): 59-65.
74. Santos, A., García, M., Cotes, A. & Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corporación colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA. *Rev. Iberoam. Micol.* 29(3): 150-156.
75. Schirmbock, M., Wang, Y., Hayes, C., & Lorito, M. (1994). Pararell formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4364-4370.

76. Schwarz, M. (1995). *Metarhizium anisopliae* for soil pest control. En: Biorational pest control agents formulation and delivery. ACS Symposium series 595. 183-196.
77. Shah, P., Aebi, M. & Tuor, U. (1999). Production factors involved in the formulation of *Erynia neoaphidis* as alginate granules. Biocontrol Science and Technology. 9(1): 19-28.
78. Shah, P., Aebi, M. & Tour, U. (2000). Drying and storage procedures for formulated and unformulated mycelia of the aphid-pathogenic fungus *Erynia neoaphidis*. Mycological Research. 104(4): 440-446.
79. Slatyer, P. & Goode, J. (1967). Responses to wáter al different stages of growth. Common – Wealth Bur, Hart. Plant. Crop, Maidstone, Kent res. 2: 53-57.
80. Smith, S., Moore, D., Karanja, L. & Chandi, E. (1999). Formulation of vegetable fat pellets with pheromone and *Beauveria bassiana* to control the larger grain borer, *Prostephanus truncates* (Horn). Pesticide Sci. 55:711-718.
81. Soto, B., Osorio, A. Muñoz, M. & Galindo, R. (2002). El uso de *Trichoderma harzianum* como agente mejorador de plantas ornamentales. Colegio Marymount. Métodos de investigación. Resumen de proyecto.
82. Stirling, G. & Smith, L. (1998). Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactyloides* for biological control or root – knot nematodes. Biological Control. 11(3): 231-239.
83. Swaminathan, J., Van Koten., C, Henderson, H., Jackson, T. & Wilson, M. (2016). Formulations for delivering *Trichoderma atroviridae* spores as seed coatings, effects of temperature and relative humidity on storage stability. J Appl. Microbiol. 120(2): 425-431.
84. Torres, E., Iannacone, J. & Gómez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate (*Cladosporium fulvum*) empleando cuatro hongos antagonistas. Bragantia. 67 (1): 169-178.
85. Tortolero, J. & Pavone, D. (2012). Efecto de *Trichoderma* spp. sobre algunos parámetros fisiológicos en *Zea mays* L. bajo condiciones de vivero. Fitopatología Venezolana. 25(1) 10-15.

86. Trane, C., Tronsmo, A. & Jensen, D. (1997). Endo-1, 3-beta gluconase and cellulose from *Trichoderma harzianum* – purification and partial characterization, induction of biological activity against plant pathogenic *Pythium spp.* Eur. J. Plant Pathol, 103: 331-344.
87. Trigozo, E. (2012). Influencia de *Trichoderma spp* endófito sobre el crecimiento e inducción de resistencia al estrés hídrico en cacao (*Theobroma cacao* L.). . Para optar por el título profesional de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín. Facultad de Ciencias Agrarias. Perú.
88. Urtubia, I. & France, A. (2007). Formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas en la agricultura. INIA Tierra adentro. Plagas y enfermedades. 79: 46-49. Disponible en: <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf>. Revisado el 01/03/2015.
89. Velazquez, A. & Ramos, A. (2015). Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la ecuperación y mantenimiento de suelos agrícolas. Actas. VIII Congreso Mundial de la Palta. 495-499.
90. Walker, H. & Connick, W. (1983). Sodium alginate production and formulation of mycoherbicide. Weed Sci. 31: 333-338.
91. Windham, G., Windham, M. & Williams, W. (1989). Effects of *Trichoderma spp.* on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease 73: 493-495.
92. World Fertilizer use Manual. (1992). IFA, Paris. Disponible en: <http://www.fertilizer.org>. Revisado el 20/08/2016.
93. Yahya,S. & Mehmet, S. (2010). *Trichoderma* granule production. Patente publicada. Disponible en <https://www.google.com/patents/EP2227538A1?hl=es&cl=en>. Revisado el 14/03/2017.
94. Yedidia, I., Srivastva, A., Kapulnik, Y. & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentratons and increased growth of cucumber plants. Plants Soil, 235: 235-242.
95. Xu, R., Zhao, A. & Ji, G. (2003). Effect of low-molecular-weight organic anions on surface charge of variable charge soils. Journal of Colloid and Interface Sciencie 264: 322-326. Citado en: Luz, S. (2013). Efecto de la inoculación conjunta

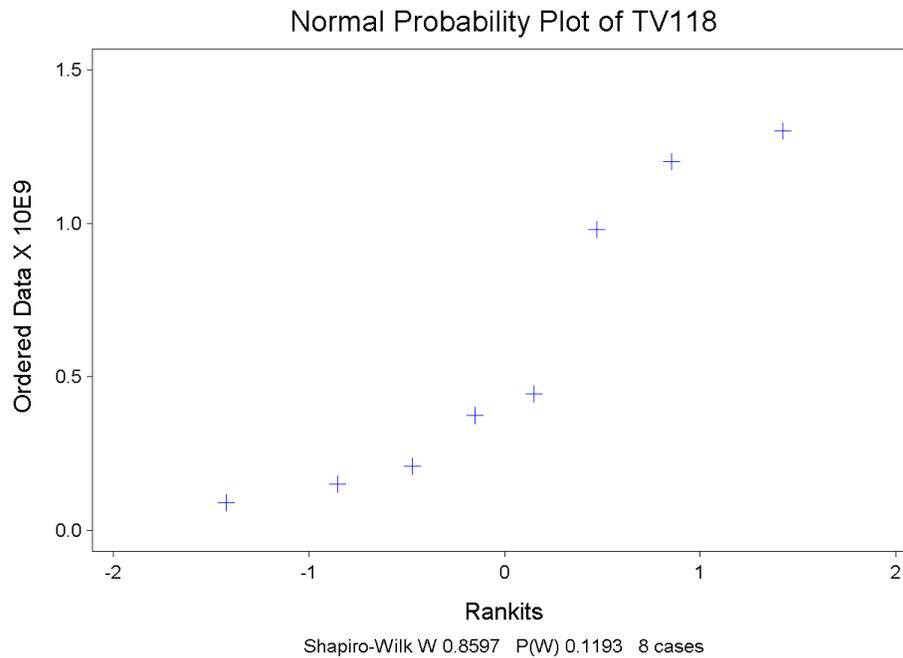
con hongos micorrizales y microorganismos solubilizadores de fósforo en plantas de aguacate.

XII. ANEXOS

CONCENTRACIÓN DE GRÁNULOS 10^6 Y 10^7

Datos estadísticos

11.1 Normalidad (TV118, TV190, TV200, concentración 10^6)



W debe ser $> 0,88$

Para los datos de concentración de gránulos en 10^6 los resultados mostraron un valor de $w = 0,8597$, por lo que al no asumir el supuesto, los errores no se distribuyen de una forma normal.

Independencia de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0,05$

Los datos para la concentración de 10^6 señalan un $P = 0,7429$, se cumple el supuesto por lo que los errores son entonces independientes. (Anexo 11.1)

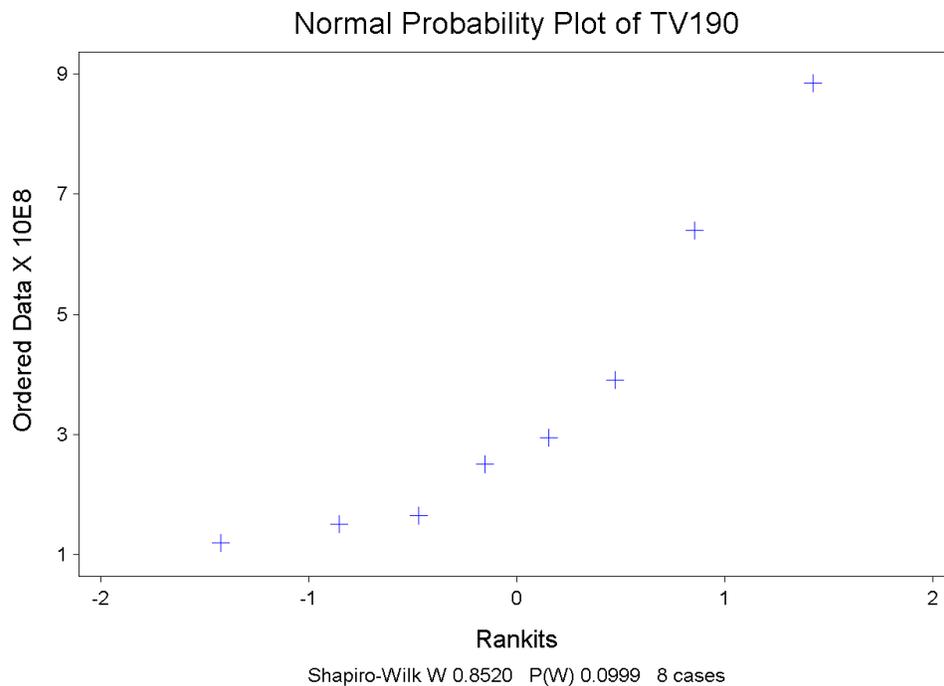
-Statistix 8.0

Runs Test for TV118

Median	4.100E+08
Values Above the Median	4
Values below the Median	4
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	2
Runs Below the Median	2
Total Number of Runs	4
Expected Number of Runs	5.0

P-Value, Two-Tailed Test	0.7429
Probability of getting 4 or fewer runs	0.3714
Probability of getting 4 or more runs	0.8857

Cases Included 8 Missing Cases 0



W debe ser $> 0,88$

Para los datos de concentración de gránulos en 10^6 los resultados mostraron un valor de $w = 0,8520$, por lo que al no cumplir el supuesto, los errores no se distribuyen de una forma normal.

Independencia de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0,05$

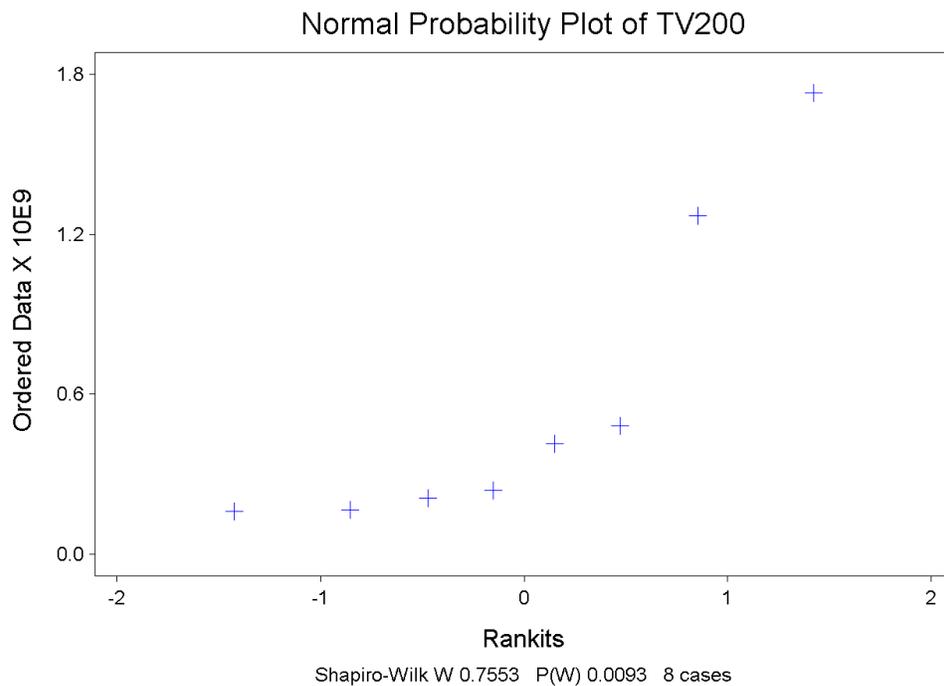
Los datos para la concentración de 10^6 señalan un $P = 0,7429$, se cumple el supuesto por lo que los errores son entonces independientes.

-Statistix 8.0

Runs Test for TV190

Median	2.725E+08
Values Above the Median	4
Values below the Median	4
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	3
Runs Below the Median	3
Total Number of Runs	6
Expected Number of Runs	5.0
P-Value, Two-Tailed Test	0.7429
Probability of getting 6 or fewer runs	0.8857
Probability of getting 6 or more runs	0.3714

Cases Included 8 Missing Cases 0



W debe ser $> 0,88$

Para los datos de concentración de gránulos en 10^6 los resultados mostraron un valor de $w = 0,7553$, por lo que al no cumplir el supuesto, los errores no se distribuyen de una forma normal.

Independencia de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0,05$

Los datos para la concentración de 10^6 señalan un $P = 0,0571$, se cumple el supuesto por lo que los errores son entonces independientes.

-Statistix 8.0

Runs Test for TV200

Median	3.275E+08
Values Above the Median	4
Values below the Median	4
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	1
Runs Below the Median	1
Total Number of Runs	2
Expected Number of Runs	5.0
P-Value, Two-Tailed Test	0.0571
Probability of getting 2 or fewer runs	0.0286
Probability of getting 2 or more runs	1.0000

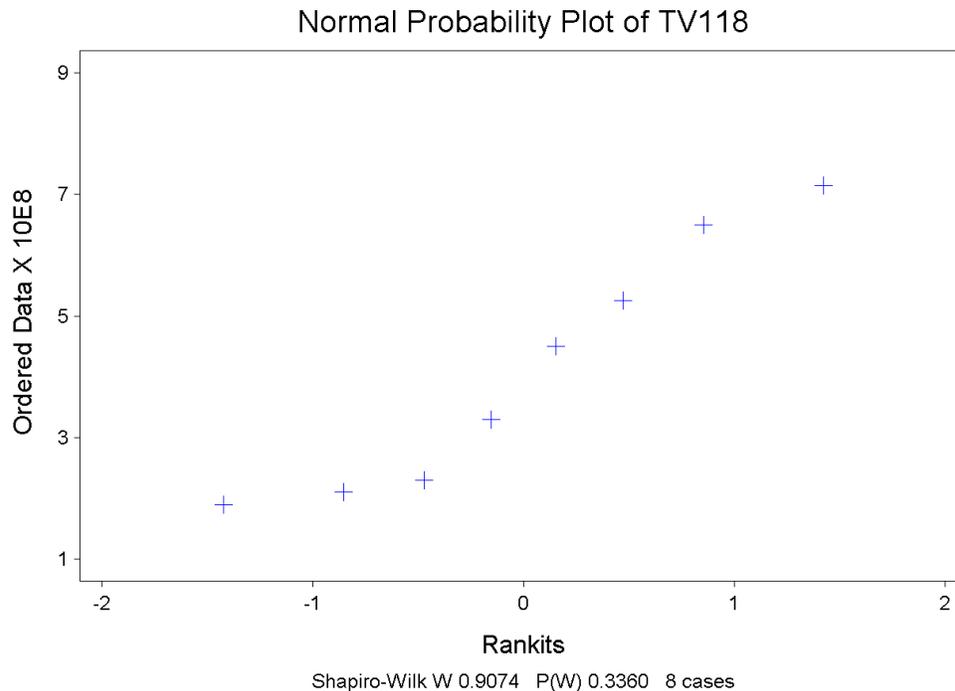
Cases Included 8 Missing Cases 0

-Statistix 8.0

Shapiro-Wilk Normality Test

Variable	N	W	P
TV118	8	0.8597	0.1193
TV190	8	0.8520	0.0999
TV200	8	0.7553	0.0093

11.2 Normalidad (TV118, TV190, TV200, concentración 10⁷)



W debe ser $> 0,88$

Para los datos de concentración de gránulos en 10^7 los resultados mostraron un valor de $w = 0,9074$, por lo que al cumplir el supuesto, se asume que los errores se distribuyen de una forma normal.

Independencia de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0,05$

Los datos para la concentración de 10^7 señalan un $P = 0,0571$, se cumple el supuesto por lo que los errores son entonces independientes. (Anexo 11.2)

-Statistix 8.0

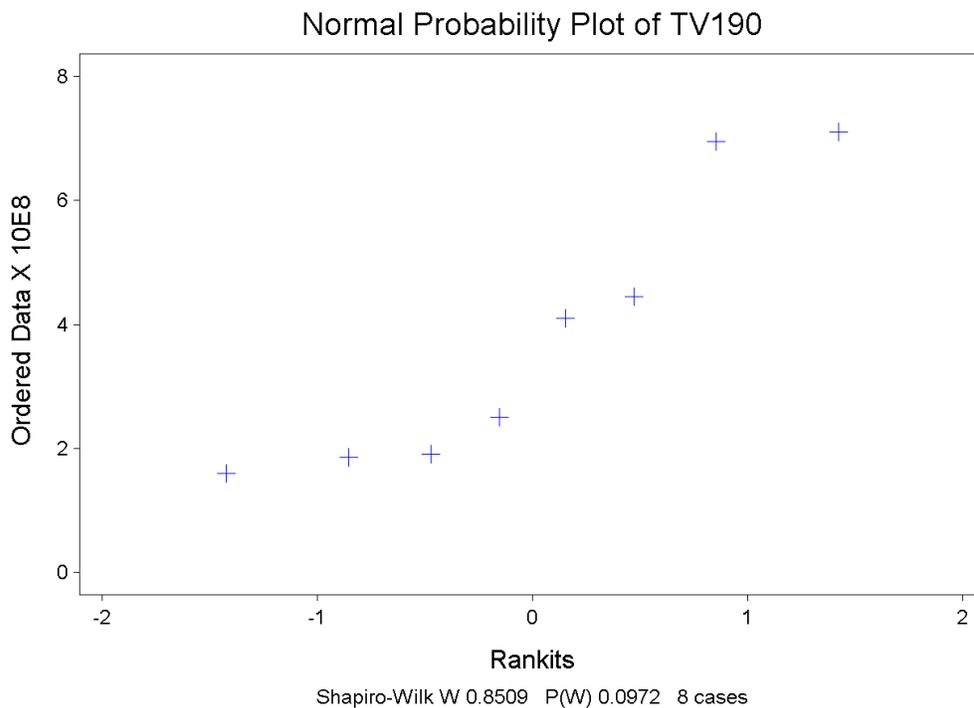
Runs Test for TV118

Median 3.900E+08
Values Above the Median 4

Values below the Median	4
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	1
Runs Below the Median	1
Total Number of Runs	2
Expected Number of Runs	5.0

P-Value, Two-Tailed Test	0.0571
Probability of getting 2 or fewer runs	0.0286
Probability of getting 2 or more runs	1.0000

Cases Included 8 Missing Cases 0



W debe ser $> 0,88$

Para los datos de concentración de gránulos en 10^7 los resultados mostraron un valor de $w = 0,8509$, por lo que al no cumplir el supuesto, se asume que los errores no se distribuyen de una forma normal.

Independencia de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0,05$

Los datos para la concentración de 10^7 señalan un $P = 0,0571$, se cumple el supuesto por lo que los errores son entonces independientes. (Anexo 11.2)

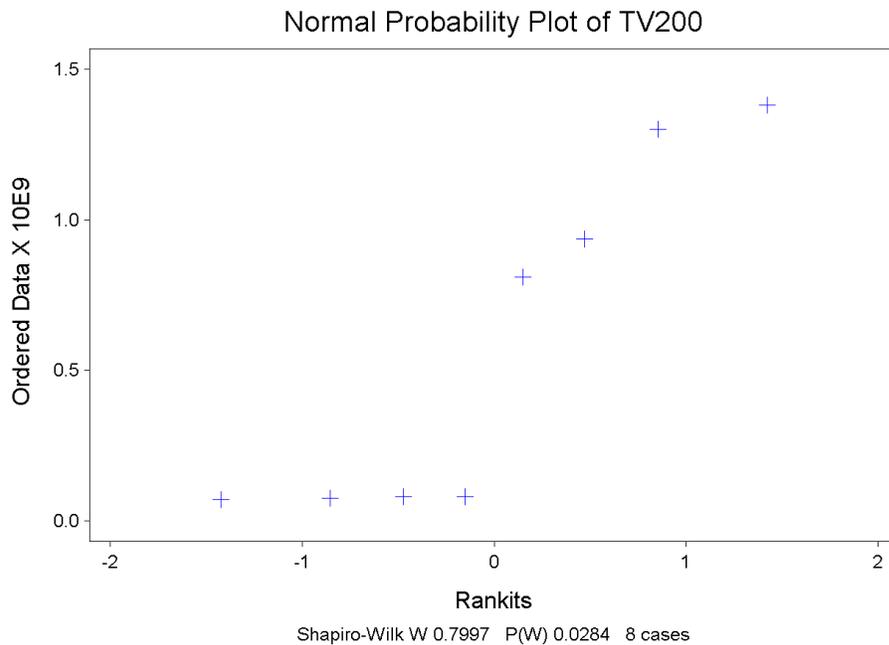
-Statistix 8.0

Runs Test for TV190

Median	3.300E+08
Values Above the Median	4
Values below the Median	4
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	1
Runs Below the Median	1
Total Number of Runs	2
Expected Number of Runs	5.0

P-Value, Two-Tailed Test	0.0571
Probability of getting 2 or fewer runs	0.0286
Probability of getting 2 or more runs	1.0000

Cases Included 8 Missing Cases 0



W debe ser > 0,88

Para los datos de concentración de gránulos en 10^7 los resultados mostraron un valor de $w = 0,7997$, por lo que al no cumplir el supuesto, se asume que los errores no se distribuyen de una forma normal.

Independencia de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0,05$

Los datos para la concentración de 10^7 señalan un $P = 0,0571$, se cumple el supuesto por lo que los errores son entonces independientes. (Anexo 11.2)

-Statistix 8.0

Runs Test for TV200

Median	4.455E+08
Values Above the Median	4
Values below the Median	4
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	1
Runs Below the Median	1
Total Number of Runs	2
Expected Number of Runs	5.0
P-Value, Two-Tailed Test	0.0571
Probability of getting 2 or fewer runs	0.0286
Probability of getting 2 or more runs	1.0000

Cases Included 8 Missing Cases 0

-Statistix 8.0

Shapiro-Wilk Normality Test

Variable	N	W	P
TV118	8	0.9074	0.3360
TV190	8	0.8509	0.0972
TV200	8	0.7997	0.0284

11.3 Kruskal-walis (TV118, TV190, TV200, concentración 10^6)

-Statistix 8.0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of TV118 by V6

V6 Mean Homogeneous Groups

1 5.7500 A
0 3.2500 A

Alpha 0.05

Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.3948

There are no significant pairwise differences among the means.

-Statistix 8.0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of TV190 by V6

V6 Mean Homogeneous Groups

1 6.2500 A
0 2.7500 B

Alpha 0.05

Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.3948

All 2 means are significantly different from one another.

-Statistix 8.0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of TV200 by V6

V6 Mean Homogeneous Groups

1 6.5000 A
0 2.5000 B

Alpha 0.05

Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.3948

All 2 means are significantly different from one another.

11.4 Kruskal-wallis (TV118, TV190, TV200, concentración 10⁷)

-Statistix 8.0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of TV118 by V7

V7 Mean Homogeneous Groups

1 6.5000 A
0 2.5000 B

Alpha 0.05

Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.3948

All 2 means are significantly different from one another.

-Statistix 8.0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of TV190 by V7

V7 Mean Homogeneous Groups

1 6.5000 A
0 2.5000 B

Alpha 0.05
Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.3948
All 2 means are significantly different from one another.

-Statistix 8.0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of TV200 by V7

V7 Mean Homogeneous Groups

1 6.5000 A
0 2.5000 B

Alpha 0.05
Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.3948
All 2 means are significantly different from one another.

Análisis No paramétrico

Para todos los tratamientos de las distintas cepas (TV118, TV190 y TV200) se aplicó una prueba de comparación de medias (Kruskal-wallis all comparisons test) en el que éstas se dividen en dos (2) grupos (A y B) donde se diferencian o no significativamente uno del otro.

Según los resultados obtenidos, para la comparación de los tratamientos Con Sal y Sin Sal, ambas concentraciones (10^6 y 10^7) mostraron diferencia significativa entre ellos, es decir, no son un grupo homogéneo.

Posteriormente, la concentración 10^7 Con Sal se tomó como concentración ideal para su uso en los siguientes ensayos, ya que resultó ser la que mayor cantidad de esporas produjo asumiéndose así un mejor beneficio para la planta y su desarrollo.

11.5 Varianza (TV118, TV190, TV200 concentración 10^6)

-Statistix 8.0

One-Way AOV for TV118 by V6

Source	DF	SS	MS	F	P
V6	1	2.628E+17	2.628E+17	1.11	0.3327
Error	6	1.421E+18	2.368E+17		
Total	7	1.683E+18			

Grand Mean 5.94E+08 CV 81.95
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 0.08 1 0.7783
 Cochran's Q 0.5871
 Largest Var / Smallest Var 1.4220

Component of variance for between groups 6.510E+15
 Effective cell size 4.0

V6 Mean

0 4.13E+08
 1 7.75E+08
 Observations per Mean 4
 Standard Error of a Mean 2.433E+08
 Std Error (Diff of 2 Means) 3.441E+08

Homogeneidad de los errores.

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de concentración 10^6 en los distintos tratamientos arrojaron un $P=0.7783$, siendo > 0.05 se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas son homogéneas.

-Statistix 8.0

One-Way AOV for TV190 by V6

Source	DF	SS	MS	F	P
V6	1	2.574E+17	2.574E+17	6.09	0.0486
Error	6	2.535E+17	4.226E+16		
Total	7	5.109E+17			

Grand Mean 3.62E+08 CV 56.81
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 3.44 1 0.0638
 Cochran's Q 0.9293
 Largest Var / Smallest Var 13.145

Component of variance for between groups 5.379E+16
 Effective cell size 4.0

V6 Mean

0 1.83E+08
 1 5.41E+08
 Observations per Mean 4
 Standard Error of a Mean 1.027E+08
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.454E+08

Homogeneidad de los errores.

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de concentración 10^6 de los distintos tratamientos arrojaron un $P=0.0638$, siendo < 0.05 no se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas no son homogéneas.

-Statistix 8.0

One-Way AOV for TV200 by V6

Source	DF	SS	MS	F	P
V6	1	1.217E+18	1.217E+18	5.98	0.0500
Error	6	1.220E+18	2.033E+17		
Total	7	2.437E+18			

Grand Mean 5.84E+08 CV 77.25
Chi-Sq DF P
Bartlett's Test of Equal Variances 10.9 1 0.0009
Cochran's Q 0.9964
Largest Var / Smallest Var 278.26

Component of variance for between groups 2.534E+17
Effective cell size 4.0

V6 Mean

0	1.94E+08
1	9.74E+08
Observations per Mean	4
Standard Error of a Mean	2.255E+08
Std Error (Diff of 2 Means)	3.189E+08

Homogeneidad de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de concentración 10^6 de los distintos tratamientos arrojaron un $P=0.0009$, siendo < 0.05 no se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas no son homogéneas.

11.6 Varianza (TV118, TV190, TV200 concentración 10⁷)

-Statistix 8.0

One-Way AOV for TV118 by V7

Source	DF	SS	MS	F	P
V7	1	2.381E+17	2.381E+17	26.2	0.0022
Error	6	5.455E+16	9.092E+15		
Total	7	2.926E+17			

Grand Mean 4.13E+08 CV 23.12
Chi-Sq DF P
Bartlett's Test of Equal Variances 1.03 1 0.3100
Cochran's Q 0.7874
Largest Var / Smallest Var 3.7026

Component of variance for between groups 5.724E+16
Effective cell size 4.0

V7 Mean

0 2.40E+08
1 5.85E+08
Observations per Mean 4
Standard Error of a Mean 4.768E+07
Std Error (Diff of 2 Means) 6.742E+07

Homogeneidad de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de concentración 10⁷ de los distintos tratamientos arrojaron un P= 0.3100, siendo > 0.05 se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas son homogéneas.

-Statistix 8.0

One-Way AOV for TV190 by V7

Source	DF	SS	MS	F	P
V7	1	2.720E+17	2.720E+17	20.2	0.0041
Error	6	8.072E+16	1.345E+16		
Total	7	3.527E+17			

Grand Mean 3.81E+08 CV 30.47
Chi-Sq DF P
Bartlett's Test of Equal Variances 4.08 1 0.0434
Cochran's Q 0.9459
Largest Var / Smallest Var 17.476

Component of variance for between groups 6.463E+16
Effective cell size 4.0

V7 Mean

0 1.96E+08
1 5.65E+08
Observations per Mean 4
Standard Error of a Mean 5.799E+07
Std Error (Diff of 2 Means) 8.202E+07

Homogeneidad de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de concentración 10^6 de los distintos tratamientos arrojaron un $P=0.0434$, siendo < 0.05 no se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas no son homogéneas.

-Statistix 8.0

One-Way AOV for TV200 by V7

Source	DF	SS	MS	F	P
V7	1	2.121E+18	2.121E+18	55.4	0.0003
Error	6	2.296E+17	3.827E+16		
Total	7	2.350E+18			

Grand Mean 5.91E+08 CV 33.08
Chi-Sq DF P
Bartlett's Test of Equal Variances 17.0 1 0.0000
Cochran's Q 0.9997
Largest Var / Smallest Var 2981.4

Component of variance for between groups 5.206E+17
Effective cell size 4.0

V7 Mean

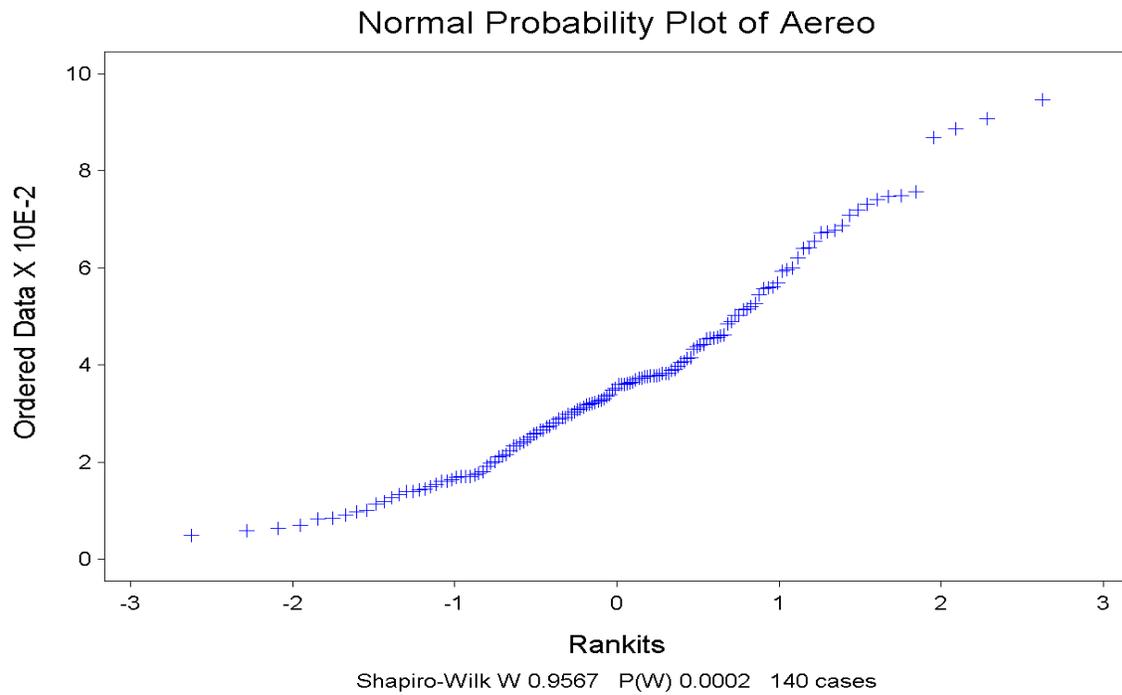
0 7.65E+07
1 1.11E+09
Observations per Mean 4
Standard Error of a Mean 9.782E+07
Std Error (Diff of 2 Means) 1.383E+08

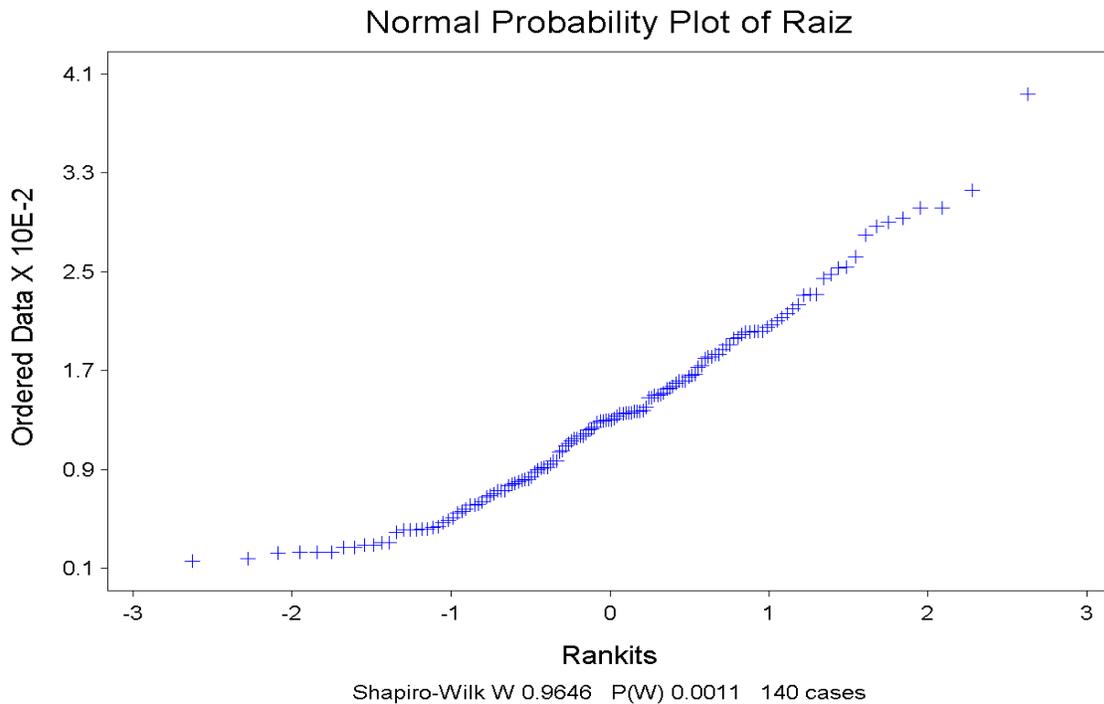
Homogeneidad de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de concentración 10^6 de los distintos tratamientos arrojaron un $P=0.0000$, siendo < 0.05 no se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas no son homogéneas. (Anexo 11.6)

11.7 Normalidad peso seco aéreo y radical





W debe ser > 0.88

La prueba para determinar normalidad en el peso seco de la parte aérea y la parte radical en los diferentes tratamientos señaló un $W = 0.9567$ y $W = 0.9646$ respectivamente, por lo que se cumplió con el supuesto en los dos casos, indicándose que los errores se distribuyen de una forma normal.

11.8 Kruskal – Wallis peso seco aéreo y radical

Statistix 8.0
04:50:30 p.m.

matriz peso seco, 18/10/2016,

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Aereo by Trata

Trata	Mean	Homogeneous Groups
1	87.500	A
3	85.354	AB
2	79.889	AB
7	66.500	AB
5	65.500	AB
8	52.778	AB
6	52.059	AB
4	43.846	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 3.124

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Statistix 8.0
04:49:45 p.m.

matriz peso seco, 18/10/2016,

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of Raiz by Trata

Trata	Mean	Homogeneous Groups
1	86.038	A
2	84.556	A
3	84.479	A
7	73.176	AB
5	67.656	AB
8	50.944	AB
4	46.692	AB
6	40.676	B

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.124

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

-Peso seco aéreo

P debe ser $< \alpha = 0.05$

Los resultados para la prueba arrojaron un $P = 0.0056$, por lo que se asume que hay diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea de los tratamientos.

Posteriormente se aplicó una prueba de comparación de medias (Kruskal-wallis all comparisons test) en donde éstas se dividieron en dos grupos (A y B) en el que se diferenciaban o no significativamente uno de los otros.

Según los resultados obtenidos, los tratamientos 2, 3, 5, 6, 7 y 8 (AB) no son diferentes significativamente de ninguno de los otros tratamientos mientras que el tratamiento 1 (A) se diferencia de manera significativa sólo del tratamiento 4 (B) y viceversa.

-Peso seco radical

P debe ser $< \alpha = 0.05$

Los resultados obtenidos muestran un $P = 0.0008$, por lo tanto se asume que hay diferencia significativa en el peso seco de la parte radical de los distintos tratamientos.

Seguidamente, se aplicó una prueba de comparación de medias en donde éstas se dividen en dos grupos (A y B) los cuales se diferencian o no significativamente uno de los otros.

Según los resultados obtenidos en la prueba, los tratamientos 4, 5, 7 y 8 (AB) no se diferencian significativamente de ninguno de los demás tratamientos, mientras que los tratamientos 1, 2 y 3 (A) son diferentes significativamente sólo del tratamiento 6 (B).

11.9 Varianza peso seco aéreo y radical

Statistix 8.0
04:45:04 p.m.

matriz peso seco, 18/10/2016,

One-Way AOV for Aereo by Trata

Source	DF	SS	MS	F	P
Trata	7	0.00731	0.00104	2.92	0.0072
Error	132	0.04726	0.00036		
Total	139	0.05457			

Grand Mean 0.0370 CV 51.13

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	9.75	7	0.2034
Cochran's Q	0.2320		
Largest Var / Smallest Var	4.0638		

Component of variance for between groups 3.972E-05
Effective cell size 17.3

Trata	N	Mean	SE
1	26	0.0443	3.71E-03
2	18	0.0422	4.46E-03
3	24	0.0437	3.86E-03
4	13	0.0244	5.25E-03
5	16	0.0370	4.73E-03
6	17	0.0279	4.59E-03
7	17	0.0344	4.59E-03
8	9	0.0277	6.31E-03

Statistix 8.0

matriz peso seco, 18/10/2016,

04:45:36 p.m.

One-Way AOV for Raiz by Trata

Source	DF	SS	MS	F	P
Trata	7	0.00135	1.927E-04	3.82	0.0008
Error	132	0.00666	5.043E-05		
Total	139	0.00801			

Grand Mean 0.0134 CV 53.00

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	8.02	7	0.3310
Cochran's Q	0.1916		
Largest Var / Smallest Var	2.7427		

Component of variance for between groups 8.232E-06
Effective cell size 17.3

Trata	N	Mean	SE
1	26	0.0165	1.39E-03
2	18	0.0154	1.67E-03
3	24	0.0159	1.44E-03
4	13	0.0089	1.97E-03
5	16	0.0132	1.78E-03
6	17	0.0080	1.72E-03
7	17	0.0137	1.72E-03
8	9	0.0098	2.37E-03

-Peso seco aéreo:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los resultados obtenidos en la prueba de homogeneidad muestran un $P = 0.2034$. Se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas son homogéneas. (Anexo 11.9)

-Peso seco radical:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

La prueba arrojo un $P = 0.3310$, por lo que se cumple con el supuesto y se asume que las varianzas son homogéneas.

11.10 Independencia. Peso seco aéreo y radical

Runs Test for Aereo

Median	0.0355
Values Above the Median	70
Values below the Median	70

Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	24
Runs Below the Median	24
Total Number of Runs	48
Expected Number of Runs	71.0
P-Value, Two-Tailed Test	0.0001
Probability of getting 48 or fewer runs	0.0000
Probability of getting 48 or more runs	1.0000

Cases Included 140 Missing Cases 0

Runs Test for Raiz

Median	0.0130
Values Above the Median	69
Values below the Median	68
Values Tied with the Median	3
Runs Above the Median	29
Runs Below the Median	29
Total Number of Runs	58
Expected Number of Runs	69.5
P-Value, Two-Tailed Test	0.0486
Probability of getting 58 or fewer runs	0.0243
Probability of getting 58 or more runs	0.9840

A value was counted as a tie with the Median if it was within 0.00001

Cases Included 140 Missing Cases 0

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Para el caso del peso seco de la parte aérea de los distintos tratamientos, la prueba arrojó un $P = 0.0001$, por lo tanto no se cumple con el supuesto, los errores no son independientes. Para el caso del peso seco de la parte radical de los diferentes tratamientos, la prueba mostró un $P = 0.0486$, a pesar de ser un valor cercano al del supuesto, éste sigue sin cumplirse, por lo que se asumió entonces que los errores no son independientes.

Por no cumplirse con uno de los supuestos, se aplicó posteriormente una prueba no paramétrica para determinar si hubo o no diferencias significativas en el peso seco de los tratamientos.

11.11 Normalidad. Longitud de la planta

Statistix 8.0
05:41:44 p.m.

04/10/2016,

One-Way AOV for long by trata

Source	DF	SS	MS	F	P
trata	7	63.635	9.09075	2.11	0.0506
Error	86	370.177	4.30438		
Total	93	433.812			

Grand Mean 7.8862 CV 26.31

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.00	7	0.5395
Cochran's Q	0.2014		
Largest Var / Smallest Var	2.9348		

Component of variance for between groups 0.40849
Effective cell size 11.7

trata	N	Mean	SE
1	14	7.5143	0.5545
2	11	8.3364	0.6255
3	13	8.3308	0.5754
4	10	8.0900	0.6561
5	13	8.3846	0.5754
6	11	8.6909	0.6255
7	13	6.0077	0.5754
8	9	8.0556	0.6916

W debe ser >0.88

Para los datos de longitud del tallo (desde la base del mismo hasta la yema apical) los resultados estadísticos arrojaron un $W = 0.9612$, por ser >0.88 se prueba que cumple con el supuesto, es decir, los errores se distribuyen de una forma normal.

11.12 Kruskal – Wallis. Longitud de la planta

Statistix 8.0
05:43:02 p.m.

04/10/2016,

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of long by trata

trata	Mean	Homogeneous Groups
6	56.636	A
2	54.500	A
5	53.692	A
3	52.692	A
8	49.611	A

4	47.700	A
1	41.143	A
7	27.692	A

Alpha 0.05

Critical Z Value 3.124

There are no significant pairwise differences among the means.

Análisis No paramétrico:

P debe ser $< \alpha = 0.05$

Los valores arrojados tuvieron una $P = 0.1467$ por lo que no se asume el supuesto, por lo tanto no hay diferencias significativas entre los valores.

Posteriormente, se aplicó una prueba de comparación de medias (Kruskal-wallis all comparisons test) en el que éstas se dividen en dos (2) grupos (A y B) donde se diferencian o no significativamente uno del otro.

Según los resultados obtenidos, ninguno de los tratamientos muestra diferencia significativa entre ellos, es decir, son un grupo homogéneo.

11.13 Varianza. Longitud de la planta.

Statistix 8.0
05:41:44 p.m.

04/10/2016,

One-Way AOV for long by trata

Source	DF	SS	MS	F	P
trata	7	63.635	9.09075	2.11	0.0506
Error	86	370.177	4.30438		
Total	93	433.812			

Grand Mean 7.8862 CV 26.31

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.00	7	0.5395
Cochran's Q	0.2014		
Largest Var / Smallest Var	2.9348		

Component of variance for between groups 0.40849
Effective cell size 11.7

trata	N	Mean	SE
1	14	7.5143	0.5545

2	11	8.3364	0.6255
3	13	8.3308	0.5754
4	10	8.0900	0.6561
5	13	8.3846	0.5754
6	11	8.6909	0.6255
7	13	6.0077	0.5754
8	9	8.0556	0.6916

Homogeneidad de los errores:

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos de longitud de los distintos tratamientos arrojaron un $P = 0.5395$, siendo > 0.05 se cumple con el supuesto, por lo tanto las varianzas son homogéneas. (Anexo 11.17)

11.14 Independencia. Longitud de la planta

Statistix 8.0
05:43:45 p.m.

04/10/2016,

Runs Test for long

Median	8.1500
Values Above the Median	47
Values below the Median	47
Values Tied with the Median	0
Runs Above the Median	14
Runs Below the Median	15
Total Number of Runs	29
Expected Number of Runs	48.0
P-Value, Two-Tailed Test	0.0001
Probability of getting 29 or fewer runs	0.0000
Probability of getting 29 or more runs	1.0000

Cases Included 94 Missing Cases 0

P debe ser $> \alpha = 0.05$

Los datos arrojaron un p valor de 0.0001, no cumpliendo con el supuesto, se asume que los errores no son independientes. (Anexo 11.18)

Al no cumplirse con uno de los supuestos para el análisis de varianza, se aplicó una prueba no paramétrica para determinar si hay o no diferencias significativas entre los tratamientos.

