



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**“BIOPROTECCIÓN DE *Plukenetia volubilis* L. CON EL HONGO *Trichoderma* sp PARA REDUCIR LOS DAÑOS DE *Meloidogyne incognita* BAJO CONDICIONES DE VIVERO”.**

**Tesis para optar el título profesional de  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR:**

**Bach. Dina Pezo Santillan**

**ASESOR:**

**Ing. Eybis José Flores García**

**Tarapoto – Perú  
2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO**

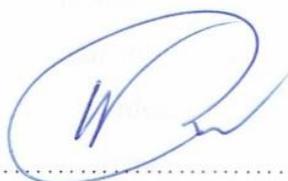
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**

**TESIS**

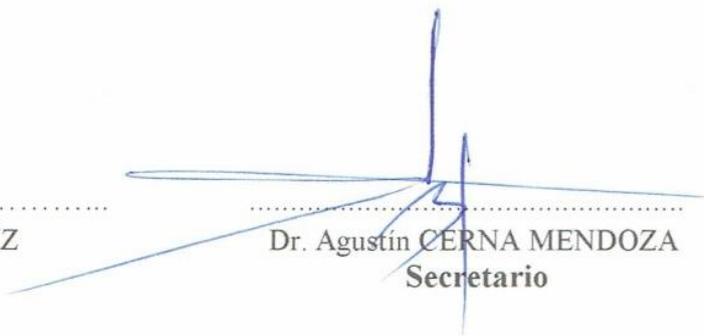
**“BIOPROTECCIÓN DE *Plukenetia volubilis* L. CON EL HONGO  
*Trichoderma* sp PARA REDUCIR LOS DAÑOS DE *Meloidogyne*  
*incognita* BAJO CONDICIONES DE VIVERO”.**

**PRESENTADO POR:  
Bach. Dina Pezo Santillán**

**Sustentado y Aprobado ante el honorable jurado  
el día 15 de diciembre de 2016**



.....  
Dr. Winston Franz RÍOS RUÍZ  
**Presidente**



.....  
Dr. Agustín CERNA MENDOZA  
**Secretario**



.....  
Ing. M.Sc. Manuel Santiago DORIA BOLAÑOS  
**Miembro**



.....  
Ing. Eybis José FLORES GARCÍA  
**Asesor**

## Declaración de Autenticidad

Yo, DINA PEZO SANTILLAN, egresado(a) de la Facultad de CIENCIAS AGRARIAS de la Escuela Profesional de AGRONOMÍA, de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, identificado con DNI N° 44008361, Domiciliado en: Jr. CIRCUNVALACIÓN CUMBAZA N° 112 - MORALES, con la tesis titulada: “BIOPROTECCIÓN DE *Plukenetia volubilis* CON EL HONGO *Trichoderma* sp PARA REDUCIR LOS DAÑOS DE *Meloidogyne incognita* BAJO CONDICIONES DE VIVERO”.

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), falsificación (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndose a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 15 de diciembre del 2016

  
.....  
DINA PEZO SANTILLAN  
DNI N° 44008361



**Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis**

**1. Datos del autor:**

Apellidos y nombres: PEZO SANTILLAN DINA	
Código de alumno : 101151	Teléfono: 988 862 034
Correo electrónico : dinitapezo@gmail.com	DNI: 44008361

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

**2. Datos Académicos**

Facultad de: CIENCIAS AGRARIAS
Escuela Profesional de: AGRONOMÍA

**3. Tipo de trabajo de investigación**

Tesis	( x )	Trabajo de investigación	( )
Trabajo de suficiencia profesional	( )		

**4. Datos de trabajo de investigación**

Título: "BIOPROTECCIÓN DE Plukenetia volubilis L. CON EL HONGO Trichoderma sp PARA REDUCIR LOS DAÑOS DE Meloidogyne incognita BAJO CONDICIONES DE VIVERO"
Año de publicación: 2016

**5. Tipo de Acceso al documento**

Acceso público *	( x )	Embargo	( )
Acceso restringido **	( )		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indiquen el sustento correspondiente:


**6. Originalidad del archivo digital**

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el Título Profesional o Grado Académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el jurado.

## 7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el Inciso 12.2, del Artículo 12° del Reglamento Nacional de Trabajos de Investigaciones para optar Grados Académicos y Títulos Profesionales –RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.



.....  
Firma del Autor

## 8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM-T.

Fecha de recepción del documento:

23 / 05 / 2018



.....  
Firma del Responsable de Repositorio  
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso  
Abierto de la UNSM-T.

**\*Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**\*\*Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

## **DEDICATORIA.**

### **A mis padres:**

JUAN DE LA CRUZ PEZO VALLES Y PETRONILA SANTILLAN ORDOÑA, quienes con su buen ejemplo, humildad y perseverancia han hecho de mí una persona de bien para la sociedad, por su amor, consejos y comprensión infinita que día a día me brindan para mantenerme firme en el camino del bien.

### **A mis hermanos:**

Alfonzo, Aquelino y Joel por ese apoyo y cariño desinteresado que a diario me transmiten, por el aliento de hermano que hace mantener viva la esperanza de progresar.

## **AGRADECIMIENTO.**

A Dios por concederme la dicha de seguir viviendo y por darme la oportunidad de vivir esta grata experiencia y así poder finalizar satisfactoriamente un propósito más trazado en mi vida profesional.

A mis padres Juan y Petronila, mis hermanos Alfonzo, Aquelino y Joel, mis cuñadas Rosa Elvira, Deysi y Flor de María, por el apoyo moral y espiritual que a diario me hacen llegar de una manera incondicional e infinita.

A Luis Miguel Salas Céspedes, una persona especial en mi vida quien día a día me anima y alienta a seguir adelante y no desistir, por ese apoyo incondicional y el amor infinito que compartimos juntos; a sus padres Luis Beltrán y Mercedes Isabel y a su hermana Magaly, por todas sus muestras de cariño.

A Ernesto Barrios Cuadros y Elna Osso Lynch, personas muy importantes en mi vida quienes durante el recorrido de la carrera me brindaron su apoyo incondicional y desinteresado hacia mi persona, por todos sus consejos y por transmitirme esas ganas de seguir adelante y no rendirme.

A la Universidad Nacional de San Martín – T, mi segunda casa que contribuyó en mi formación profesional, a través de sus docentes calificados que compartieron sus conocimientos.

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – San Martín (IIAP), por brindarme sus instalaciones y estar comprometido con el desarrollo de toda la región, aplicando tecnologías innovadoras para el mejoramiento y progreso de la agricultura con el fin de beneficiar a los agricultores.

Al proyecto “Generación de tecnologías para el control integrado de nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la región San Martín”, bajo el financiamiento de FINCyT.

A mi co-asesor Kadir J. Márquez Dávila, por brindarme parte de su tiempo y por compartir sus conocimientos a través de las enseñanzas durante el desarrollo de la tesis.

A mi asesor Ing. Eybis José Flores García, por ser un excelente docente, un gran amigo y por todo el apoyo y las enseñanzas otorgadas de principio a fin durante el desarrollo del trabajo de investigación.

Agradezco infinitamente a toda la familia del IIAP, especialmente al equipo de trabajo durante este proceso, convirtiéndose en grandes amigos y compañeros de labores.

A un gran amigo Michel Paz y su esposa Carolina Sánchez, por sus muestras de cariño y estima hacia mi persona.

A mis amigos en general Omar Chinchay, Henry Ruiz, Ramón, José Torres, Luis Pérez, Jicela Ríos, Fidel Ramírez, Karen, Grecia, Giovanni, Livis, Lleny, Nelly, Fredy; porque día a día me transmitieron esas fuerzas y ese apoyo moral para seguir adelante.

## ÍNDICE.

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<b>3.1. Generalidades del cultivo de sachá inchi.....</b>	<b>3</b>
3.1.1. Origen y distribución geográfica del sachá inchi.....	3
3.1.2. Morfología.....	3
3.1.3. Condiciones climáticas del cultivo.....	4
3.1.4. Plagas y enfermedades del cultivo.....	4
<b>3.2. Nemátodo de los nódulos radiculares (<i>Meloidogyne incognita</i>) .....</b>	<b>5</b>
3.2.1. Generalidades.....	5
3.2.2. Ciclo de vida .....	6
3.2.3. Importancia del género.....	6
3.2.4. Sintomatología.....	6
3.2.5. Mecanismos asociados a los síntomas observados en planta...	7
<b>3.3. Hongos endófitos.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4. Generalidades del <i>Trichoderma</i> sp.....</b>	<b>9</b>
3.4.1. Características.....	9
3.4.2. Condiciones del crecimiento.....	10
3.4.3. Interacciones <i>Trichoderma</i> – planta.....	11
3.4.3.1. <i>Trichoderma</i> en el desarrollo de la planta y la resistencia a patógenos.....	12
3.4.3.2. Colonización de <i>Trichoderma</i> en raíces.....	12
3.4.3.3. Efecto de <i>Trichoderma</i> en el control de nemátodos.....	12
3.4.3.4. Promoción del crecimiento vegetativo en plantas.....	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Ubicación del trabajo de investigación.....	17
4.2. Materiales de estudio.....	17
4.2.1. Ecotipo a utilizar.....	17
4.2.2. Esterilización del suelo.....	17
4.2.3. Aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófito.....	18
4.3. Metodología.....	20
4.3.1. Incremento de inóculo de <i>Trichoderma</i> endófito.....	20
4.3.1.1. Preparación de medio de cultivo.....	20

4.3.1.2. Reactivación de cepas e incremento de inóculo.....	20
4.3.2. Producción de plántulas de sachá inchi.....	21
4.3.2.1. Pre germinado de semillas de sachá inchi.....	21
4.3.2.2. Preparación del sustrato.....	21
4.4. Metodología para la colonización de <i>Trichoderma</i> sp.....	22
4.4.1. Colonización del sustrato.....	22
4.4.2. Siembras de semillas de sachá inchi.....	22
4.5. Metodología para determinar la capacidad endofítica.....	23
4.6. Efecto de control de <i>Trichoderma</i> sobre el nemátodo del nudo.....	24
4.6.1. Obtención de plántulas.....	24
4.6.2. Infestación de plántulas con <i>Meloidogyne incognita</i> .....	24
4.6.3. Cuantificación de nódulos.....	25
4.7. Crecimiento de plántulas colonizadas con <i>Trichoderma</i> sp.....	25
4.8. Diseño experimental.....	27
4.9. Análisis estadísticos.....	27
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>28</b>
5.1. Resultados.....	28
5.2. Discusiones.....	37
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE CUADROS.

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1:</b> Aislamientos de <i>Trichoderma</i> endófitos.....	19
<b>Cuadro 2:</b> Análisis de varianza para porcentaje de colonización de <i>Trichoderma</i> en plántulas de sachá inchi.....	28
<b>Cuadro 3:</b> Análisis de varianza para altura de planta en respuesta a la inoculación con <i>Trichoderma</i> e infestación con <i>Meloidogyne incognita</i> .....	29
<b>Cuadro 4:</b> Análisis de varianza para número de nódulos en respuesta a la inoculación de <i>Trichoderma</i> e infestación con <i>Meloidogyne incognita</i> .....	30
<b>Cuadro 5:</b> Análisis de varianza para longitud de raíz en respuesta a la inoculación con <i>Trichoderma</i> e infestación con <i>Meloidogyne incognita</i> .....	31
<b>Cuadro 6:</b> Análisis de varianza para altura de planta de sachá inchi colonizados con <i>Trichoderma</i> .....	32
<b>Cuadro 7:</b> Análisis de varianza para área foliar de plántulas de sachá inchi colonizados con <i>Trichoderma</i> .....	33
<b>Cuadro 8:</b> Análisis de varianza para número de hojas de plántulas de sachá inchi colonizados con <i>Trichoderma</i> .....	34
<b>Cuadro 9:</b> Análisis de varianza para peso fresco de biomasa total de plántulas de sachá inchi colonizados con <i>Trichoderma</i> .....	35
<b>Cuadro 10:</b> Análisis de varianza para longitud de raíces de plántulas de sachá inchi colonizados con <i>Trichoderma</i> .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> Área de vivero (A) y área de Laboratorio de Bioprotección (B), IIAP – San Martín.....	17
<b>Figura 2:</b> Equipo de autoclave (A) y sustrato esterilizado (B).....	18
<b>Figura 3:</b> Cepa reactivada (A) y conservación de cepas en viales (B).....	21
<b>Figura 4:</b> Sustrato estéril (A), transferencia del sustrato estéril a macetas (B) y colonización del sustrato (C).....	22
<b>Figura 5:</b> Siembra de semilla de sachá inchi en macetas colonizadas (A), emergencia de plántulas de sachá inchi (B) y plántulas de sachá inchi con dos pares de hojas (C).....	23
<b>Figura 6:</b> Determinación de la capacidad endofítica en plántulas de sachá inchi.....	23
<b>Figura 7:</b> Proceso para inoculación de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> a plántulas de sachá inchi.....	25
<b>Figura 8:</b> Cosecha de plántulas de sachá inchi (A), lavado de raíces (B) y cuantificación de nódulos de nemátodos (C).....	25
<b>Figura 9:</b> Determinación del área foliar por cada plántula de sachá inchi.....	26

## ÍNDICE DE GRÁFICOS.

	Pág.
<b>Gráfico 1:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para porcentaje de colonización de <i>Trichoderma</i> en plántulas de sachá inchi.....	28
<b>Gráfico 2:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para altura de planta en respuesta a la inoculación con <i>Trichoderma</i> e infestación de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	29
<b>Gráfico 3:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para número de nódulos en respuesta a la inoculación con <i>Trichoderma</i> e infestación <i>Meloidogyne incognita</i> .....	30
<b>Gráfico 4:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para longitud de raíces en respuesta a la inoculación con <i>Trichoderma</i> e inóculo de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	31
<b>Gráfico 5:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para altura de plantas colonizadas con <i>Trichoderma</i> .....	32
<b>Gráfico 6:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para área foliar de plántulas de sachá inchi colonizadas con <i>Trichoderma</i> . .....	33
<b>Gráfico 7:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para número de hojas de plántulas de sachá inchi colonizadas con <i>Trichoderma</i> .....	34
<b>Gráfico 8:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para peso fresco de biomasa de plántulas de sachá inchi colonizadas con <i>Trichoderma</i> . .....	35
<b>Gráfico 9:</b> Prueba de duncan ( $p < 0.05$ ) para longitud de raíz de plántulas de sachá inchi colonizadas con <i>Trichoderma</i> .....	36

## RESUMEN.

El uso de tecnologías limpias como son los productos orgánicos, tiene gran repercusión en la mitigación del uso excesivo de productos sintéticos, contribuyendo en la conservación de la fauna microbiana. Los hongos endófitos (*Trichoderma* sp) son organismos simbioses mutualistas que actúan de forma benéfica dentro de los tejidos de la mayoría de plantas, entre ellas el cultivo de sachá inchi, radicando así su gran importancia nutraceútica en los contenidos de omegas 3,6 y 9 que esta produce. El objetivo de este trabajo de investigación fue caracterizar la mejor cepa de *Trichoderma* sp por su capacidad de bioprotección en sachá inchi frente al ataque de *Meloidogyne incognita* bajo condiciones controladas. Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA) con 16 tratamientos (15 cepas de *Trichoderma* + 1 control) y 3 repeticiones. Para determinar el efecto de bioprotección entre estos dos organismos, se inoculó 1 000 huevos a cada plántula de sachá inchi que fue colonizado con cepas de *Trichoderma* sp durante la siembra, utilizando sustrato estéril. La altura de plantas se evaluó 5 días después de la inoculación (DDI) y las demás variables 45 DDI. Durante este proceso, se realizó un análisis de varianza y la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ) para todas las variables estudiadas; encontrando como mejor tratamiento al T3 (KMD 35) el cual contrarresto de manera eficiente en el control de *Meloidogyne incognita* y las demás variables estudiadas.

**PALABRAS CLAVE:** *Plukenetia*, *Meloidogyne*, *Trichoderma*, Hongos endófitos.

## SUMMARY.

The use of clean technologies as in the case of producing organic products has great impact in the reduction of the use of synthetic products and contributes to the preservation of microbial fauna. The endophyte fungi (*Trichoderma* sp) are mutualistic symbiotic organisms that benefit the tissues of most plants, as in the case of the sachá inchi; a plant of nutraceutical importance due to its high content of omega 3, 6 and 9 fatty acids. The objective of this research work was to characterize the best strain of *Trichoderma* sp by its bio-protection capacity in the sachá inchi against the attack of *Meloidogyne incognita* under controlled conditions. The study used a completely randomized design (CRD) with 16 treatments (15 *Trichoderma* sp strains + 1 of control) each repeated 3 times. To determine the bio-protection effect between these two organisms, 1 000 eggs were inoculated to each sachá inchi plantula that was colonized with *Trichoderma* sp strains during the sowing, using a sterile substrate. The height of the plants was evaluated after 5 days after inoculated (DAI) and the other variables were measured 45 DAI. During this process, a variance analysis and the Duncan test were run ( $p < 0.05$ ) to all studied variables, finding that the best treatment was T3 (KMD 35) which worked efficiently in controlling *Meloidogyne incognita* and the other studied variables.

**KEYWORDS:** *Plukenetia*, *Meloidogyne*, *Trichoderma*, Endophyte fungi



## I. INTRODUCCIÓN.

El Sacha Inchi o maní del inca, *Plukenetia volubilis* L., es un cultivo agroindustrial de importancia internacional porque sus semillas poseen excelentes cualidades nutricionales, por su alto contenido de ácidos grasos esenciales como linoleico, alfa linoleico; omega 3; 6 y 9 y vitamina E relativamente elevados respecto a otros granos de oleaginosas (Hasen y Stoewsand 1980). Debido a estos contenidos, actualmente la industria internacional ha marcado interés por el uso como ingrediente de cosméticos.

Esta especie ha demostrado alta susceptibilidad al nemátodo *Meloidogyne incognita*, afectando considerablemente su producción y algunas veces llegando a matar a la planta (Márquez; Cayotopa; Arévalo; Vivanco; Arévalo; 2007); ataca específicamente al sistema radicular induciendo la formación de nódulos, pudrición, interrumpiendo el transporte del agua y minerales del suelo hacia la parte aérea ocasionando el amarillamiento de las hojas y su posterior defoliación. Las lesiones radiculares ocasionadas por el nemátodo predisponen al ingreso de hongos y bacterias fitopatógenas, que ocasionan la pudrición de las raíces y marchitez vascular llegando a causar la muerte de la planta, dentro ellos tenemos a *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Ralstonia* sp, *Pectobacterium carotovora*.

Los nemátodos pueden ser controlados por organismos endófitos, como bacterias y hongos, quienes han recibido una creciente atención en los últimos años; por que mejoran la resistencia a patógenos, al infectar a las plantas por medio de la transmisión horizontal, cuando su inóculo se transporta a otra planta, o vertical cuando infectan a la semilla progenie de una planta infectada.

Dentro de los hongos biocontroladores, *Trichoderma* sp es una alternativa económica, viable y favorable con el medio ambiente, en tal sentido se realizó el trabajo de investigación, con la finalidad de evaluar su colonización de cepas de *Trichoderma* sp a partir de la rizósfera del sachá inchi para realizar bioensayos en el control de *Meloidogyne incognita* en condiciones de laboratorio.

## **II. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivo General.**

Caracterizar las cepas de *Trichoderma* por su capacidad de bioprotección en sachá inchi frente al ataque de *Meloidogyne incognita* en condiciones controladas.

### **2.2. Objetivos Específicos.**

**2.2.1.** Determinar la capacidad endofítica de *Trichoderma* sp colectada de sachá inchi.

**2.2.2.** Determinar el efecto de control del hongo endófito *Trichoderma* sp sobre el nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) de sachá inchi.

**2.2.3.** Determinar la capacidad del hongo endófito *Trichoderma* sp para el crecimiento de plántulas de sachá inchi.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA.

#### 3.1. Generalidades del cultivo de sachá inchi.

##### 3.1.1. Origen y distribución geográfica del sachá inchi.

El Sachá Inchi es una especie propia de la Amazonía Peruana y se encuentra distribuida en las regiones de Loreto, San Martín, Amazonas, Junín, Ucayali, Madre de Dios y el Cuzco, registrándose especies como: *Plukenetia volubilis* L., *P. lorentensis* Ulei, *P. brachybotrya* M. Arg (Galluser, 2005).

Valles (1993), menciona que el Sachá Inchi está distribuido en el trópico latinoamericano desde el Sur de México, Indias occidentales, la Amazonía y el Acre en Bolivia. En nuestro país se ha recolectado en Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa, San Martín, Rodríguez de Mendoza, Ucayali (Pucallpa, Contamana y Requena), el Putumayo, alrededores de Iquitos y Caballo cocha y áreas del estrecho. En San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga hasta Yurimaguas, en el Alto Mayo, Bajo Mayo, el Valle de Sisa y áreas de la cuenca Lamas-Sihuas (Shapiama, 2008).

##### 3.1.2. Morfología.

La planta, se caracteriza por ser voluble, perenne, semileñosa con crecimiento indeterminado. Presentan raíces ramificadas ya que no se diferencia de la raíz principal, y la estructura nos recuerda a las ramas de un árbol, pivotantes; por lo general en las primeras etapas de su desarrollo presentan una raíz principal y más adelante de su desarrollo no se diferencia la raíz principal ni secundaria distribuyéndose estas en la parte superficial del suelo alcanzando hasta una profundidad de 1 metro; (Guerrero, 2006).

Las hojas son alternas, acorazonadas, aserruladas, trinervadas con una nervadura central dirigida al ápice acuminado, así mismo en la base del limbo presenta 2 glándulas laterales (conteniendo en las mañanas gotitas de azúcares orgánicos) y una pequeña proyección intermedia denominada estipela (muy variable en los diversos ecotipos).

Las flores son hermafroditas monoicas, las flores masculinas son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos, en la base del racimo y lateralmente se encuentra una, dos y hasta tres flores femeninas, así mismo en las flores femeninas se observa que el número de estigmas es igual al número de ovarios.

Los frutos son cápsulas dehiscentes, distribuidos en lóculos, el número de lóculos está en función a la variabilidad genética de sachá inchi, presentando cuatro, cinco y hasta siete lóculos; presenta la semilla en forma ovalada de color marrón-oscuro, abultada hacia el centro y aplastada hacia los costados, al abrir la testa de la semilla se tiene a la almendra de color blanco que está protegida por una película blanquecina.

### **3.1.3. Condiciones climáticas del cultivo.**

Sachá Inchi se adapta desde los 100 a 2 000 m.s.n.m.m. (Manco, 2005). Registrándose así mismo las mejores semillas mayor de 12 mm de diámetro en plantaciones establecidas desde los 600 m.s.n.m.m. (Guerrero, 2006); se adapta a suelos ácidos con contenidos muy significativos en aluminio, así mismo prospera en áreas pobladas por *Pteridium aquilinum* “shapumba” e *Imperata brasiliensis* “Cashaucsha” (Valles, 1991).

Los parámetros de temperaturas adaptables a esta planta fluctúan entre 10 y 36°C, temperaturas altas son desfavorables por que ocasiona el aborto en flores y la formación de semillas pequeñas (Manco, 2005). Dentro de los factores ecológicos importantes en esta especie es la luz y el agua, mientras más luz reciba la cubierta vegetal mayor es la población de brotes, flores y frutos; la disponibilidad del agua al inicio de su desarrollo es importante, de igual manera en la etapa de guiamiento, floración y fructificación (Guerrero, 2006).

### **3.1.4. Plagas y enfermedades.**

Las plagas más visibles son indaneros, diabroticas, grillos cortadores, hormigas azucareras y otros (Guerrero, 2006), como *Acromyrmex* spp., *Solenopsis* sp y *Atta* spp., pertenecientes al orden Hymenóptera y a la familia

Formicidae; *Diabrotica* spp., del orden Coleóptera y familia Chrysomelidae; *Caelifera* spp., del orden Orthoptera y de la familia Acrididae.

El fitoparásito más importante en sachá inchi es el nemátodo del nudo asociado a *Fusarium* spp., que ocasionan la muerte de plantas en pleno proceso de producción. En la etapa de vivero se manifiestan enfermedades como Antracnosis causado por el hongo *Colletotrichum* sp y chupadera causado por hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y el *Stramenopila Pythium* sp (Guerrero, 2006). En examen clínico de diagnóstico realizado en la Universidad Agraria la Molina, en muestras de suelo, fruto y raíces de sachá inchi remitidos por la Corporación Bioquímica Internacional en Convenio con Agroindustrias Amazónicas, reportan enfermedades como *Fusarium solani* y *Phytium* sp (Raíces), *Colletotrichum* sp (Frutos), de igual manera se reporta la presencia de nemátodos de los géneros *Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Pratylenchus*, *Xiphinema*, *Tylenchus*, *Aphelenchus*, *Dorylaimidos*, *Rhabditidos* (Canto y Melgarejo, 2006).

### **3.2. Nemátodo de los nódulos radiculares (*Meloidogyne incognita*).**

#### **3.2.1. Generalidades.**

Los nemátodos del género *Meloidogyne* constituyen fitopatógenos obligados altamente especializados. Este género, contiene más de 90 especies que infectan miles de plantas herbáceas y leñosas (Gelpud, Mora, Salazar, Betancourth, 2011), se considera de gran importancia para el cultivo del café, según estudios de nocividad han demostrado que la progresión de los daños ha significado pérdidas en rendimientos superiores al 60% en campos de producción afectados debido a que este género destruye completamente la raíz del cafeto, haciendo que la planta no forme raíces nuevas, quedando las raíces gruesas, las que tienen una capacidad muy limitada para la absorción de agua y nutrientes. A diferencia de otros géneros *Meloidogyne* posee una característica muy peculiar, (formación de agallas) a simple vista son fáciles de identificar; inicialmente de color blanco, pero después se tornan parduzcas (Escobar, 2008).

Estudios realizados por (Leiva, 2009) muestran que en los cortes perineales obtenidos en el laboratorio para la identificación de la especie del género *Meloidogyne*; se puede observar un arco dorsal elevado en el modelo perineal, lo que nos indica que la especie del género *Meloidogyne* que afecta al sachá inchi es *M. incognita*.

### **3.2.2. Ciclo de vida.**

El ciclo de vida de todas las especies de *Meloidogyne* es esencialmente el mismo, sin embargo, algunos autores indican que el tipo de hospedero y condiciones ambientales como luminosidad, temperatura, altitud, pH, textura del suelo, etc., hacen que varíe el ciclo de vida de estos nemátodos (Sánchez, 2010).

La duración del ciclo de vida de *Meloidogyne*, es de 3 a 4 semanas en hospederas susceptibles presentes en suelos ligeros con temperaturas que oscilan entre los 25 y 30°C, y pueden presentarse 3 a 10 generaciones por año. Su ciclo biológico inicia con el huevo, posteriormente pasa por cuatro estados larvales para convertirse en adulto.

### **3.2.3. Importancia del género.**

Las especies del género *Meloidogyne* constituyen los nemátodos patógenos de plantas de mayor importancia económica por su amplia distribución mundial y por el gran número de hospederos que atacan. Más del 5% de pérdidas a nivel mundial están asociados a este nemátodo (Sanchez, 2010).

### **3.2.4. Sintomatología.**

Las plantas infectadas por *Meloidogyne* spp., muestran amarillamiento, marchitamiento y reducciones en la producción. La infección de las raíces produce engrosamientos característicos o agallas que pueden ser de varios tamaños dependiendo del número de hembras que alberguen (Talavera, 2003, p. 5). Las agallas pueden variar considerablemente dependiendo de las especies de *Meloidogyne*; la apariencia típica de las agallas es la siguiente: Hinchamientos pequeños de forma redondeada, abultamientos masivos de tejido indiferenciado que confluyen entre sí, puntas de la raíz hinchadas, abultamientos irregulares a

lo largo de la raíz, puntas de raíz curvadas en forma de gancho, no se aprecia ningún hinchamiento de forma definida, solamente la superficie levantada en donde se encuentra el nemátodo embebido (Coyne, 2010).

### **3.2.5. Mecanismos asociados a los síntomas observados en plantas.**

Las desviaciones sobre los procesos fisiológicos normales que tienen lugar con el parasitismo del nemátodo y que explican la reducción en el rendimiento de las plantas afectadas, no se limitan a las funciones de la raíz, sino que abarcan igualmente a procesos que ocurren en la parte aérea o a nivel de planta entera (Nico, 2002).

El efecto más aparente del parasitismo de nemátodos sobre la planta es una reducción general del crecimiento (Dropkin, 1989). Los nemátodos reducen el crecimiento de las plantas debido a que destruyen la estructura de las células y consumen su contenido, interfiriendo en los procesos fisiológicos normales y modificando la expresión genética en la planta hospedante. Además de la disminución en el crecimiento, los síntomas asociados al parasitismo, a menudo son marchitez temporal y aparentes deficiencias nutricionales en las hojas; manifestaciones de alteraciones en dos funciones radicales básicas como son la absorción de agua y la nutrición mineral (Nico, 2002).

Los nemátodos provocan una reducción en la absorción de agua debido a la destrucción mecánica que provocan en las raíces y a la consiguiente pérdida de biomasa funcional. Sin embargo, se reporta que las relaciones hídricas en la planta se ven afectadas en etapas tempranas de la infección, cuando el parasitismo aún no ha originado destrucción de tejidos ni ha reducido la relación raíz con la parte aérea; Manzanilla-López *et. al*, 2004, citados por Vera, (2014).

Otra función del sistema radical que sufre el efecto perjudicial del parasitismo de los nemátodos es la nutrición mineral. La magnitud de la alteración varía ampliamente de acuerdo con la especie de nemátodo, el hospedante, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde el comienzo de la infección (Hussey, 1985; Melakerberhan y Webster, 1993). La reducción en la absorción de nutrientes minerales obedece fundamentalmente a

que la superficie activa para la misma se ve reducida tanto por el daño mecánico directo, como por la disminución de emisión de raíces laterales y la elongación de las ya existentes. El perjuicio causado por los nemátodos a la nutrición mineral no se restringe al proceso de absorción, sino que afecta igualmente a la translocación de los mismos hacia la parte aérea. Este fenómeno es particularmente notable en el caso de aquellas especies que se alojan en el cilindro vascular, como, *Meloidogyne* spp. (Hussey y Williamson, 1998).

### **3.3. Hongos endófitos.**

Los hongos endófitos son organismos que viven dentro de los tejidos de las plantas, sin causar síntomas o daños aparentes (Carroll y Petrini 1983; Carroll, 1988; Bandara; Seneviratne; Kulasooriya; 2006; Shi; Lou; Li, 2009). Estos colonizan la mayoría de plantas sanas; considerados como simbioses y mutualistas omnipresentes, se pueden encontrar en varios tejidos, semillas, raíces, tallos y hojas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009).

Estos hongos pueden ser extraídos del interior de las plantas o aislados desde la superficie estéril de los tejidos de las plantas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009). Las plantas se benefician ampliamente por la protección de estos organismos endofíticos, promoviendo el crecimiento de la planta (Compant *et al.*, 2005) y otorgando un incremento en la resistencia a varios patógenos, por la producción de varios antibióticos y metabolitos secundarios. Esto sugiere que hay presencia de hongos endofíticos mutualistas que actúan como detonantes biológicos para activar los sistemas de defensa ante condiciones adversas bióticas y/o abióticas (Bandara *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2009).

Los hongos endófitos infectan a la planta en forma localizada y sistémicamente, y ocurre especificidad de los tejidos y sus plantas hospedadoras. Así mismo, pueden infectar a las plantas por medio de la transmisión horizontal o vertical; además los mecanismos potenciales de hongos endófitos en la protección de la planta contra los patógenos se dan por efectos directos (interacción entre endófitos y patógenos) e indirecto (mejora de las defensas de la planta) y los efectos ecológicos (hiperparasitismo), así como también tienen

un rol importante en los resultados de la interacción planta - patógeno que conduce a la enfermedad (Reátegui, 2014).

### **3.4. Generalidades del *Trichoderma* sp.**

#### **3.4.1. Características.**

*Trichoderma* es un hongo comúnmente del suelo y se reproduce asexualmente, es filamentoso, anamórfico, heterótrofo, aerobio, con una pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelo ácido; crece en los medios de cultivo con un desarrollo difuso que cubre toda la superficie del agar como un césped amarillo o amarillo verdoso, la superficie de la colonia es granular o plumosa. En las características microscópicas sobresalen las hifas hialinas y septadas, conidióforos generalmente cortos que dan origen a esterigmas romos con puntas. Las conidias son esféricas y mantenidas en racimos compactos mediante una ligera secreción mucilaginosa (Harman and Chet, 1981).

La población de *Trichoderma* decrece especialmente cuando la humedad del ambiente desciende por largos periodos de tiempo. Otros estudios han determinado que el pH, la concentración de CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>, sales y el contenido de materia orgánica son factores físicos y químicos determinantes para la variación poblacional, además para la presencia o ausencia de otros microorganismos en el ambiente (Fonseca, 1998); es un hongo de vida libre en suelos y ecosistemas de raíz (Harman; Howell; Viterbo; Chet; Lorito, 2004) y puede estar presente en la materia orgánica de los suelos y en residuos de cultivos; Rincón, 1992; Cupull *et al.*, 2003, citado por Sánchez, (2009).

Dentro de las especies de *Trichoderma* que más resultados se ha obtenido están: *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. lignarum*, *T. virens* y *T. polysporum* (Papavizas, 1985).

Se encontraron que cepas específicas del hongo del género *Trichoderma* pueden colonizar y penetrar los tejidos de las raíces de las plantas, iniciando una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las plantas, lo cual conlleva a la resistencia sistemática inducida de la planta (ISR), (Fonseca, 1998).

### **3.4.2. Condiciones del crecimiento.**

Dentro de los factores que afectan el crecimiento de *Trichoderma* se encuentran los de tipo físico y de tipo nutricional como:

La mayoría de especies de este género son fotosensibles, puesto que presentan mayor esporulación al ser expuestas a la luz; pero cuando se someten a periodos alternados de luz y oscuridad, la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos se ve favorecido (Domsch; Anderson; Yersoon, 1980).

*Trichoderma* esporula fácilmente sobre muchos sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico circular en respuesta a la alternación de luz diurna y oscuridad, donde los conidios se producen durante el periodo de luz. La exposición de los cultivos en agar durante 20 a 30 segundos a la luz es suficiente para inducir la esporulación. La mayor foto inducción de la conidiogénesis se obtiene con la exposición a la luz del día por 3 minutos o cerca de la radiación ultravioleta Tipo A (366nm) de 10 a 30 segundos. Además, el número total de conidios producidos es inversamente proporcional a la concentración de la fuente de carbono (Fonseca, 1998).

La germinación de los conidios depende del tipo de enlace que presenta la fuente de carbono, la cual puede ser un disacárido o un polisacárido. Para su aprovechamiento este hongo emplea enzimas como amilasas,  $\alpha$ -glucosidasas, endo y exocelulasas que realizan la hidrólisis de los azúcares simples para dar inicio a la germinación en los diferentes medios de cultivo; mientras que, para iniciar el proceso de infección, debemos tener en cuenta la composición química de la pared celular de los conidios (Astudillo, 1999).

El **pH** de 6 a 6,5 es el adecuado para su desarrollo, pero puede sobrevivir en rangos mayores, debido a la capacidad que tiene de acidificar el medio en el que se encuentra, mediante secreción de ácidos orgánicos; citado por Sánchez, (2009).

El rango de temperatura para su crecimiento se encuentra entre los 10°C a los 40°C, considerando como óptimo 25°C (Alexopoulos, 1996). Según otros estudios, se ha demostrado que el crecimiento saprófito en suelo se presenta a temperatura que va entre 20°C y 30°C, con temperatura óptima de 25°C (Cruz y Lina, 2007).

**Humedad relativa:** Capaz de crecer entre el 20% y 80% siendo 70% la mejor.

**Carbono:** La principal fuente de carbono que asimila es celulosa. Este hongo es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada maquinaria enzimática que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. También, asimila como fuente de nitrógeno compuestos tales como aminoácidos, úrea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore, 1996).

### **3.4.3. Interacciones *Trichoderma* - planta.**

Respecto a las interacciones mutualistas entre plantas y hongos, el ejemplo más conocido es el de las micorrizas, el cual tiene su mayor efecto sobre la nutrición de las plantas. Sin embargo, también existen otros organismos que generan mutualismo con plantas, incrementando así la resistencia de estas al ataque de patógenos, como es el caso de los hongos del género *Trichoderma* (Mousain, 1997), este es capaz de colonizar la superficie de las raíces y causar cambios sustanciales en el metabolismo de los tejidos de las plantas promoviendo el crecimiento, incrementando la disponibilidad de nutrientes y mejorando la producción de los cultivos (Harman et al., 2004; Vinale; Sivasithamparam; Ghisalberti; Marra; Woo; Lorito, 2008).

#### **3.4.3.1. *Trichoderma* en el desarrollo de la planta y la resistencia a patógenos.**

Las propiedades benéficas que se atribuyen son el control de patógenos en raíz y hojas (Induce a la resistencia, control biológico por ataque directo a enfermedades fúngicas de las plantas como antagonismo), cambio en la composición de la microflora en la raíz, además mejora la absorción de nutrientes, mejora solubilidad de los nutrientes del suelo, mejora crecimiento radicular, Incrementa la formación de pelos absorbentes y mejora la profundización de raíz. (Harman, 2006).

#### **3.4.3.2. Colonización de *Trichoderma* en raíces.**

En vitroplantas de banano inoculadas con hongos endofíticos, se encontró que el mayor porcentaje de colonización por parte de los hongos es en la raíz, seguido por el cormo, pseudotallo y hojas (Barrios, 2006). Asimismo, pruebas para determinar el patrón de colonización de hongos y bacterias endofíticas combinadas en vitroplantas de banano, se encontró que los mayores porcentajes de colonización fueron con el tratamiento consorciado *Trichoderma atroviride* con *Bacillus*, con un porcentaje de colonización de 90 % en raíz, 85 % en cormo y 45 % en pseudotallo (Cháves, 2007); por su parte Nuñez y Pocasangre (2012) inocularon tres aislamientos de *Trichoderma atroviride* a plantas de maíz y arroz en una suspensión de esporas de  $5 \times 10^6$  ufc/ml por 15 minutos, y se sembraron en maceteros de 3 litros de capacidad determinando en maíz que los 3 aislamientos fueron capaces de colonizar los órganos internos alcanzando colonizaciones promedio de 47% en raíz, 45% en tallo y 16% en hojas y en arroz la colonización promedio fue de 40% en raíz, 37% en tallo y 8% en hojas; la colonización se presentó en todos los órganos de la planta, presentándose un gradiente de colonización, siendo mayor en la raíz con un promedio de 47%, independientemente del hongo utilizado, tallos y hojas respectivamente.

#### **3.4.3.3. Efecto de *Trichoderma* en el control de nemátodos.**

Por su parte, Dos Santos, Ferraz y Muchovej (1992), evaluaron en agar 20 especies de hongos aislados de raíces y suelo recolectadas en 50 localidades de Brasil, como agentes de control biológico frente a segundos estadios juveniles, huevos y masas de huevos de *Meloidogyne incognita*.

Ensayos in vitro mostraron que aislamientos de *Paecilomyces lilacinus*, *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *A. robusta*, *Monoacrosporium ellipsosporum*, *Dactylaria thaumasia*, *Cylindrocarpon sp* y *Trichoderma harzianum* fueron parásitos eficientes y se observó una variabilidad considerable entre aislamientos de la misma especie.

Se ha reportado que *Trichoderma* produce diversos metabolitos tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alameticina, Dermadina, Penicilina, Trichotecenosa y Tricorzinianos que se han reportado como sintetizados por *Trichoderma harzianum*; o Gliotoxina producido por *Trichoderma viridae* (Hidalgo 1999). Speijel y Chet (1998) reportan a *Trichoderma harzianum* como buen antagonista contra *Meloidogyne javanica*, reduciendo el índice de agallas en raíces y el número de huevos por gramo de raíces.

Las cepas de *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* tienen un efecto negativo sobre la evolución de los huevos de *Meloidogyne sp* en condiciones de laboratorio (Mendoza; Wilson; Colina, 2013).

Meneses (2003), trabajó con *Fusarium* y *Trichoderma* provenientes de plantaciones de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* Cobb. Thorne., obteniendo que las plantas protegidas con los hongos endofíticos presentaron menor población de *R. similis*, comparado a las plantas que no fueron protegidas, así como valores más altos en las variables de promoción de crecimiento, además el peso de las raíces y el tallo en plantas que fueron protegidas, tuvo un incremento promedio de 39 y 29% respecto al testigo, por su parte Pérez; Pérez; Acosta; Gandarilla; Pérez, (2006) coinciden al afirmar que el hongo antagonista *Trichoderma spp.*, es un biorregulador efectivo contra nemátodos del género *Meloidogyne*, donde se pone de manifiesto la acción de sus toxinas e hifas dando lugar a un follaje más exuberante en plantas de tomate que el testigo estándar, y fue más eficaz, aunque no significativamente, lo que pudiera atribuirse al efecto estimulador del crecimiento del hongo.

El análisis microscópico mostró la adhesión conidial de *Trichoderma* spp., hacia huevos de *Meloidogyne incognita*, teniendo similitud a los estudios realizados por Madail (2008) cuando menciona el potencial de los hongos *Trichoderma* spp., y *Paecilomyces lilacinus* para controlar *M. incognita*, en bioensayos realizados in vivo asociada a plantas de frijol, mostrando que producen enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y proteasas que causaron el 100% de mortalidad de J2 (juveniles segunda etapa) y produciendo menor número de agallas.

Por su parte Requena (2013) estudió la relación entre la población inicial de nemátodos y el crecimiento de plántulas de pimiento, obteniendo la tasa de reproducción del nemátodo en pimiento en condiciones de cultivo y, siendo el límite de tolerancia (T) de la planta a *Meloidogyne incognita* de 1,5 huevos y J2 por ml<sup>-1</sup>.

#### **3.4.3.4. Promoción del crecimiento vegetativo en plantas.**

*Trichoderma* promueve el crecimiento y desarrollo de los cultivos produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal (Sutton y Peng, 1993); tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Altomare; Norvell; Björkman.; Harman, 1999).

Ramos (2006), evaluó el efecto de promoción de crecimiento de 14 tratamientos: 6 aislamientos del género *Trichoderma* y 6 aislamientos de cepas no patogénicas del género *Fusarium* sobre vitroplantas de banano y piña bajo invernadero, obteniendo resultados favorables después de 60 días presentando una mayor promoción de crecimiento, diámetro del pseudotallo, número de hojas activas, peso foliar y radical y desarrollo radical, el mayor desarrollo de sistema radical se registró en el tratamiento Mycoral®. En piña los tratamientos inoculados con Endofítico 3 (*Fusarium*), 2.10 *Trichoderma*, 3.10 *Trichoderma* y 1.4 *Trichoderma* mostraron un mejor desarrollo en las mismas variables comparados con el testigo. Por su parte Núñez (2011) determinó los porcentajes de promoción de crecimiento en

plantas de maíz y arroz protegidas con tres aislamientos endofíticos de *Trichoderma atroviride* inoculadas en una suspensión de esporas de  $5 \times 10^6$  ufc/ml por 15 minutos, los resultados en maíz mostraron al tratamiento Endo 2 y Endo 3 los que tuvieron mejores resultados con 85,14 cm y 80,35 cm respectivamente comparado con 73,41 cm del testigo, en la producción de biomasa fresca total, el mejor tratamiento fue el Endo 3 con un incremento en peso de 25% con respecto al testigo, en arroz los tratamientos que mayor valor en la altura obtuvieron fueron el Endo 3 y el TA con 45,19 cm y 43,80 cm respectivamente. En la producción de biomasa fresca total el TA y Endo 1 obtuvieron los mejores resultados, 126,80 g y 120,92 g respectivamente. Estos resultados indican que los aislamientos endofíticos evaluados promueven el crecimiento en maíz, pero este efecto no fue detectado significativamente en arroz.

El hongo *Trichoderma* endófito es capaz de promover crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas; las especies *Trichoderma harzianum* (cepa T22) y *Trichoderma atroviride* incrementó el crecimiento vegetativo de plantas de *Lactuca sativa*, *Capsicum annum* (Vinale *et al.*, 2008), *Zea mays* (Blanchard y Bjorkman, 1996), *Nicotiana tabacum*, *Cucurbita maxima* (Kleifeld y Chet, 1992), *Lycopersicon esculentum* (Vinale *et al.*, 2008). Asimismo, produce ácidos orgánicos, como el glucónico, ácidos cítricos y fumáricos; estos ácidos disminuyen el pH del suelo y permite la solubilización de fosfatos, micronutrientes y minerales; cationes como hierro, magnesio y manganeso útiles para los metabolitos de la planta (Benítez; Rincón; Limón; Codón, 2004; Harman *et al.*, 2004 y Vinale *et al.*, 2008).

Estudios preliminares con inoculación del hongo *Trichoderma* sobre plantas de frijol, observaron que estimula la germinación y presenta incremento en la altura de las plantas entre el 70 y 80%, y ganancia en peso en 60% aproximadamente, ello supone incremento en los rendimientos de este cultivo; asimismo, se encontró que plantas protegidas con cepas de *Trichoderma atroviride* presentaban pesos superiores de 78 % en raíces y 41 % de peso foliar, que las vitroplantas no protegidas de banano del cultivar

Gran Enano (AAA) (Pocasangre, 2002). También, se encontró incrementos significativos en peso de las raíces y peso foliar de plantas de banano inoculadas con hongos endofíticos, en comparación con el testigo absoluto (Meneses, 2003).

Las cepas Th1 y T22 de *Trichoderma harzianum* promovieron el crecimiento en altura y biomasa aérea de plantas de *Eucalyptus globulus* en vivero y su efecto fue mayor a los 3 meses de post siembra (Tornatore *et al* 2011). Las plantas inoculadas con los hongos endofíticos correspondientes al género *Trichoderma*, tuvieron incremento altamente significativo en peso del sistema foliar con 29%, al compararlo con el testigo absoluto (Meneses 2003).

Según Bjorkman; Harman and Blanchard, (1995), la estimulación del crecimiento de raíces por efecto de la presencia de *Trichoderma*, en experimentos de invernadero en plantas de maíz, el peso de raíces a los 21 días después de plantación e inoculación era 50% mayor que las plantas testigo, mientras que la exploración del suelo fue 40% mayor. La colonización de las raíces por *Trichoderma* se relacionó con la edad de éstas, siendo mayor en sus partes más viejas, colonizando incluso en los ápices radicales.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Ubicación del trabajo de investigación.

El trabajo de investigación se realizó en el vivero (Figura 2: A) del Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP), distrito de Morales, Provincia y Departamento de San Martín, ubicado a 06° 28' de latitud Sur y 76° 22' de Longitud Oeste y 330 m.s.n.m.m.

Las evaluaciones de algunas variables estudiadas se realizaron en el laboratorio de Bioprotección, ubicado dentro del Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP), San Martín (Figura 2: B).



**Figura 1:** Área de vivero (A) y Área de Laboratorio de Bioprotección (B), IIAP – San Martín.

### 4.2. Materiales de estudio.

#### 4.2.1. Ecotipo a utilizar.

Se utilizaron semillas del ecotipo de sachu inchi obtenidos de la localidad de Shica, que se encuentren aptas para la siembra.

#### 4.2.2. Esterilización del suelo.

El suelo utilizado fue esterilizado con ayuda de un autoclave a temperatura de 121 °C, 15 libras de presión durante 30 minutos por tiempo, en 2 repeticiones.



**Figura 2:** Equipo de autoclave (A) y Sustrato esterilizado (B)

#### **4.2.3. Aislamiento de *Trichoderma* endófito.**

Se utilizaron cepas de *Trichoderma* spp, las cuales se encuentran en la micoteca del Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP – San Martín), se evaluó 15 aislamientos de *Trichoderma* sp, colectados a partir de hojas y tallos de sachá inchi. (Cuadro 1).

**Cuadro 1: Aislamientos de *Trichoderma* endófitos**

Trat.	Género	Código	Procedencia			
			Especie	Órgano	L. de colección	F. de colección
T0	Control					
T1	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 33	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja	Sector Monte Alegre	Feb-14
T2	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 34	<i>Plukenetia lorentensis</i>		Sector Puerto Almendra	Feb-14
T3	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 35	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja	Sector Monte Alegre	Feb-14
T4	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 39	<i>Plukenetia</i> sp	Hoja	Shucush	Feb-14
T5	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 42	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja	Sector Monte Alegre	Feb-14
T6	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 46	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja	Sector Monte Alegre	Feb-14
T7	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 47	<i>Plukenetia</i> sp	Tallo	Shucush	Feb-14
T8	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 48	<i>Plukenetia huayllabambana</i>	Hoja	Shucush	Feb-14
T9	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 55	<i>Plukenetia</i> sp	Tallo	Shucush	Feb-14
T10	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 57	<i>Plukenetia</i> sp	Tallo	Shucush	Feb-14
T11	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 58	<i>Plukenetia</i> sp	Tallo	Shucush	Feb-14
T12	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 79	<i>Plukenetia huayllabambana</i>		Shucush	Feb-14
T13	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 119	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Tallo	Sector Monte Alegre	Feb-14
T14	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 120	<i>Plukenetia huayllabambana</i>	Hoja	Shucush	Feb-14
T15	<i>Trichoderma</i> sp	KMD 138	<i>Plukenetia brachybotria</i>	Hoja	Sector Puerto Almendra	Feb-14

\*KMD (Kadir Márquez Dávila)

- **Sector Monte Alegre:** Distrito de Limabamba, provincia de Rodríguez de Mendoza departamento de Amazonas.
- **Sector Puerto Almendra:** Distrito de San Juan, provincia de Maynas, departamento de Loreto.
- **Shucush:** Distrito de Longa, provincia de Rodríguez de Mendoza departamento de Amazonas.

### **4.3. Metodología.**

#### **4.3.1. Incremento de inóculo de *Trichoderma* endófito.**

##### **4.3.1.1. Preparación de medio de cultivo.**

**Papa Sacarosa Agar (PSA):** Para 1 litro de medio de cultivo se lavó 250 gramos de papa blanca variedad canchan, estas en trozos se pusieron a cocer en 500 ml de agua destilada (AD) durante ( $\pm 2$ ) 10 minutos evitando que deshaga, después el caldo de papa fue filtrado en otro recipiente limpio y se agregó 10 g de sacarosa (Azúcar rubia). En otro recipiente que contiene 500 ml de AD se diluyo 18 g de agar en tiras con ayuda de un horno microondas. Ambas diluciones fueron mezcladas y agitadas unos minutos. La mezcla antes que solidifique, fue distribuida en matraces 200 ml, después el matraz con el medio fue cerrado con un tapón de algodón y cubierto con papel aluminio (French y Herbert, 1982).

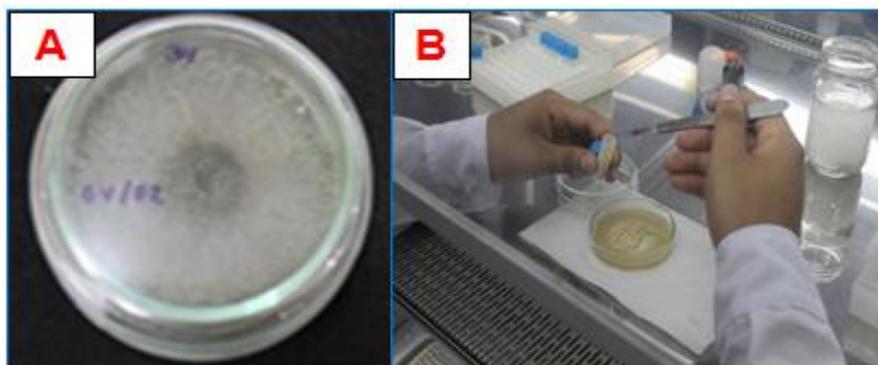
Después se esterilizó a 121 °C de temperatura, 15 libras de presión y por espacio de 20 minutos con ayuda de un autoclave vertical a vapor. Al matraz que contiene el medio de cultivo estéril y tibio (temperatura punto de biberón) se agregó 1 gramo del antibiótico Oxitetraciclina, inmediatamente después el medio de cultivo fue distribuido en placas de Petri 15 x 60 mm (French y Herbert, 1982).

**Agar Agua (AA):** Para 1 litro en un recipiente conteniendo 500 ml de AD se incorporó 20 g de agar en tiras y serán diluidas con ayuda de un horno microondas, se enrazo con AD hasta 1000 ml, luego fue esterilizado a 120°C, 15lb de presión por 20 min (French y Herbert, 1982).

##### **4.3.1.2. Reactivación de cepas e incremento de inóculo.**

Las cepas de *Trichoderma* sp, se encuentran conservadas en la micoteca del IIAP – San Martín, fueron reactivadas en placas de petri 15 x 60 mm que contiene medio PSAO. Para ello se extrajo una porción de agar con el micelio del hongo de los viales y se transfirió a las placas en condiciones asépticas. Las placas se dejaron en incubación a temperatura ambiente ( $\pm 2$ ) 5 días. Después las cepas reactivadas serán transferidas a otra placa conteniendo el mismo medio para las pruebas de este estudio y una copia

fue conservada en viales que contienen solución Glicerol al 20% y a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura.



**Figura 3:** Cepa reactivada (A) y Conservación de cepas en viales (B).

#### **4.3.2. Producción de plántulas de sachá inchi.**

##### **4.3.2.1. Pre-germinado de semillas de sachá inchi.**

Para este estudio se usaron semillas de sachá inchi de la accesión Shica recién cosechada (cinco días antes del pre-germinado). A las semillas se desinfectó con solución de lejía al 20% durante 2 minutos, luego se enjuagó tres veces con agua destilada estéril (ADE) con la finalidad de eliminar restos de lejía, se colocó en una bandeja teniendo como base algodón húmedo, luego se tapó y se dejó en incubación 5 días a temperatura ambiente o hasta que las semillas hayan germinado en un 80%; periodo que se visualizó la radícula que permitió su siembra en macetas conteniendo sustrato estéril.

##### **4.3.2.2. Preparación de sustrato.**

Se usó como sustrato tierra agrícola, esta se incorporó a bolsas de polipropileno 10 x 15 aproximadamente 2 Kg por bolsas. Después fueron esterilizadas a  $121^{\circ}\text{C}$  de temperatura, 15 libras de presión en dos tiempos (30 minutos por tiempo). Después el sustrato estéril se transfirió a macetas previamente desinfectadas con solución de lejía al 20% por 5 minutos y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril (ADE).

#### 4.4. Metodología para la colonización de *Trichoderma sp*

##### 4.4.1. Colonización del sustrato.

Previamente, a la placa con el hongo se incorporó 10 ml ADE y con un ansa estéril se removerá con la finalidad de liberar las conidias del micelio, después la suspensión de conidias fue diluida en 40 ml ADE en un vaso de prueba. Después del vaso se tomó una alícuota de 1 ml para cuantificar la concentración de conidias por centímetro cúbico (cc) de agua con ayuda de un hematocímetro. Con ayuda de una pipeta se inoculó la suspensión de conidias al sustrato a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/gs-1. Después las macetas con sustrato inoculado con el hongo fueron incubados a temperatura ambiente por 7 días (Bailey *et al.*, 2008).



**Figura 4:** Sustrato estéril (A), transferencia del sustrato estéril a macetas (B) y colonización del sustrato (C)

##### 4.4.2. Siembra de semillas de sachá inchi.

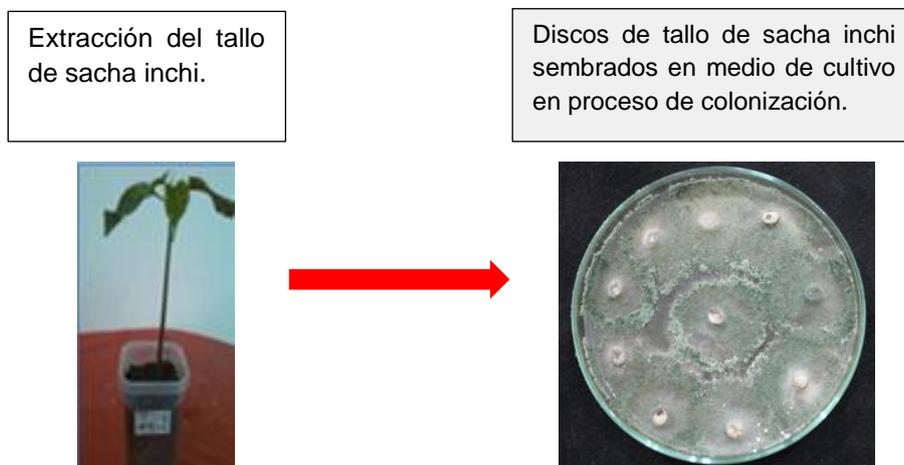
Las semillas pre-germinadas fueron sembradas al sustrato colonizado con el hongo, orientando la radícula hacía abajo haciendo un orificio con ayuda de un tubo de aluminio estéril y después cubierto con una ligera capa del sustrato, después se incorporó 50 ml de ADE. Las macetas fueron puestas en incubación hasta que la plántula alcance dos pares de hoja.



**Figura 5:** Siembra de semilla de sacha inchi en macetas colonizadas (A), emergencia de plántulas de sacha inchi (B) plántulas de sacha inchi con dos pares de hojas (C)

#### 4.5. Metodología para determinar la capacidad endofítica.

Las plántulas de sacha inchi que crecieron en sustrato colonizado con *Trichoderma* sp descritos en los párrafos 4.4.1 y 4.4.2, y alcanzaron 45 días de edad, fueron sacrificadas para el re-aislamiento del hongo, de cada plántula se extrajo una sección del tallo principal, esta se desinfectó en solución de lejía al 20% por 1 min, luego lavados con ADE cuatro veces hasta quitar residuos de la lejía. Se realizó cortes para extraer discos pequeños sobre papel toalla y se dejó sobre la misma para su secado. Los discos de tallo fueron sembrados en placas conteniendo medio PSAO. Estas placas fueron incubadas a temperatura ambiente 5 días. Al término del periodo de incubación se registró como positivo (+) cuando se observa crecimiento del hongo de los discos y como negativo (-) cuando no se observa crecimiento alguno. En cada placa se puso 10 discos y esta cantidad se consideró como el 100% para la colonización de *Trichoderma* sp. Se realizaron 3 repeticiones (plántulas) por cada aislamiento del hongo endófito.



**Figura 6:** Determinación de la capacidad endofítica en plántulas de sacha inchi.

#### **4.6. Efecto de *Trichoderma* sobre el nemátodo del nudo.**

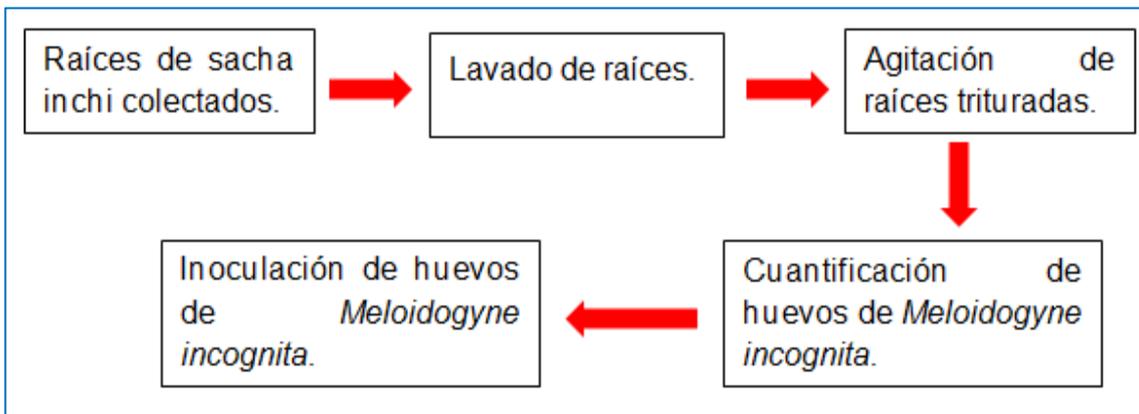
##### **4.6.1. Obtención de plántulas.**

Las plántulas de sachá inchi fueron producidas y colonizadas con *Trichoderma* siguiendo el procedimiento descritos en los párrafos 4.4.1 y 4.4.2.

##### **4.6.2. Infestación de plántulas con *M. incognita*.**

Se colectaron raíces de sachá inchi con formación de nódulos infestados por el nemátodo *M. incognita*. Estas muestras fueron colectadas de la parcela de sachá inchi en la Estación Experimental Pucayacu, ubicada en Bello Horizonte en el distrito de La Banda de Shilcayo. Las raíces fueron lavadas con agua de caño, cortando aquellas que tenían nódulos en trozos de aproximadamente 2 cm de longitud, licuándolas posteriormente durante 3 minutos en un litro de agua. El extracto licuado fue tamizado y lavado con abundante agua. Se utilizaron tamices de 40, 325 y 400 mesh. Los huevos y juveniles (J2) del nemátodo atrapados en el tamiz de 400 mesh fueron colectados con ayuda de una pizeta y transferidos a un vaso de prueba de 500 ml (Jatala, 1986). El inóculo fue cuantificado con ayuda de un microscopio, tomando para ello una alícuota de 3 ml de la suspensión, transfiriéndola a una placa de conteo, expresando el resultado en huevos por centímetro cúbico (huevos/cm<sup>3</sup>). Los huevos del nemátodo fueron inoculados a una concentración de 1000 huevos por maceta con 2 kg de sustrato; cuando las plántulas ya presentaban 2 pares de hoja equivalente a 15 días después de la siembra (DDS).

Para la infestación de las raíces de sachá inchi con *M. incognita* se removió el suelo aproximadamente 5 cm alrededor del tallo y 2 cm de profundidad. Los huevos de *M. incognita* fueron inoculados con ayuda de una jeringa hipodérmica de 10 ml (Márquez *et al.*, 2007). Posteriormente las plántulas fueron incubadas a temperatura ambiente del invernadero y con humedad a capacidad de campo constante por un periodo de 45 días considerando el ciclo biológico del nemátodo (25 a 35 días) (Cepeda, 1996): durante esta etapa de crecimiento de plántulas se evaluó la altura a los 5 días después de la infestación con un intervalo de 5 días durante 45 días.



**Figura 7:** Proceso para inoculación de huevos de *Meloidogyne incognita* a plántulas de sachá inchi

#### 4.6.3. Cuantificación de nódulos.

Al término del periodo de incubación las plántulas de sachá inchi fueron cosechadas cuidadosamente, separando la parte aérea de la parte radicular, lavándolas posteriormente con agua de caño de forma individual (Márquez *et al.*, 2007). Inmediatamente después se cuantifico el número de nódulos por sistema radicular y la longitud de la raíz será determino a través del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS) (Lamari, 2002).



**Figura 8:** Cosecha de plántulas de sachá inchi (A), lavado de raíces (B) y cuantificación de nódulos de nemátodos (C).

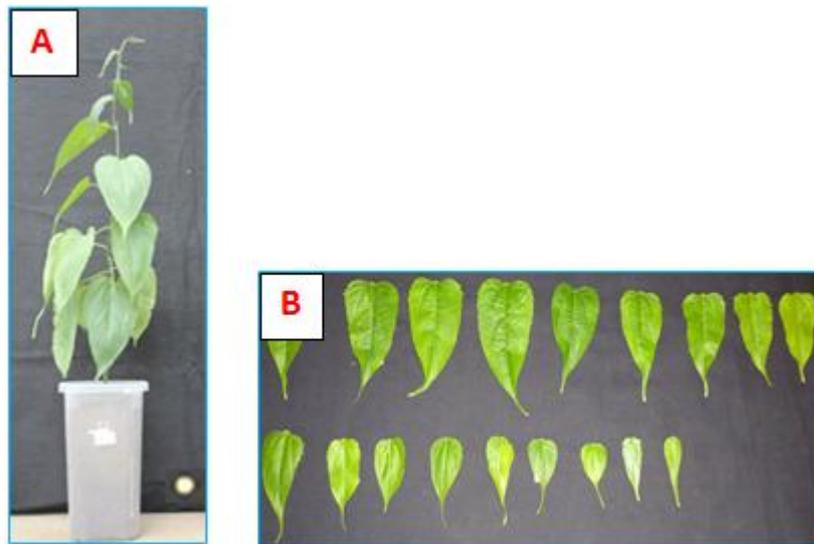
#### 4.7. Crecimiento de plántulas colonizadas con *Trichoderma* sp.

Las plántulas de sachá inchi que crecieron en sustrato colonizado con *Trichoderma* sp, descritos en los párrafos 4.4.1 y 4.4.2., fueron mantenidas en un ambiente de incubación ( $\pm 2$ ) 25 °C) durante 30 días, posteriormente fueron trasladadas a un invernadero, donde se registró los parámetros biométricos (área foliar, altura de planta y número de hojas) con intervalos de tres días

hasta los 60 días de edad las plántulas, para evaluar altura de planta se consideró como base la superficie del sustrato hasta la yema terminal de la hoja; al término de este periodo tres plántulas por cada tratamiento fueron sacrificadas para medir la longitud de raíz con ayuda del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS) (Lamari, 2002) y biomasa de la plántula.

- **Área foliar.**

Para esta evaluación se tomaron fotografías de 3 plántulas de sachá inchi representativos por cada tratamiento (cuadro 1), para esto se fotodocumentó todas las hojas de cada plántula. Metodología propuesta por Lamari (2002) con modificaciones, el cual nos permitió obtener un dato más exacto sobre el área foliar de las plántulas, luego estas fotografías fueron llevadas a una computadora para el cálculo correspondiente, el cual se realizó con la ayuda del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS).



**Figura 9:** Determinación del área foliar por cada plántula de sachá inchi.

- **Peso fresco de la biomasa.**

Para la evaluación de la variable peso fresco de la biomasa por planta, se tomaron 3 plántulas previamente lavadas y se cortaron en dos partes separando la parte aérea de la parte radicular por cada plántula, del cual se

llegó a obtener un peso fresco, siendo luego llevada a una estufa con una temperatura de 60 °C, por un periodo de 24 horas, luego se procedió a realizar los pesos respectivos tanto de la parte aérea como de la radicular con la ayuda de una balanza analítica (OHAUS), siguiendo la metodología propuesta por Leiva (2009) con modificaciones.

#### **4.8. Diseño experimental.**

Cada uno de los 16 tratamientos evaluados tuvo 3 repeticiones, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar (DCA). Cada plántula de sachá inchi representó una unidad experimental, lo que dio un total de 48 plántulas o unidades experimentales.

#### **4.9. Análisis estadístico.**

Todos los datos obtenidos de las diferentes variables de estudio, fueron ordenados y sometidos a su análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico Statistics Program Service System (SPSS) versión 22. Se aplicó una comparación de medias por la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

### 5.1. Resultados.

#### 5.1.1. Porcentaje de colonización de *Trichoderma*.

El anva y la prueba de duncan para el porcentaje de colonización de *Trichoderma* en plántulas de sachá inchi se muestran en el Cuadro 2 y el Gráfico 1.

**Cuadro 2:** Análisis de varianza para el porcentaje de colonización de *Trichoderma* en plántulas de sachá inchi.

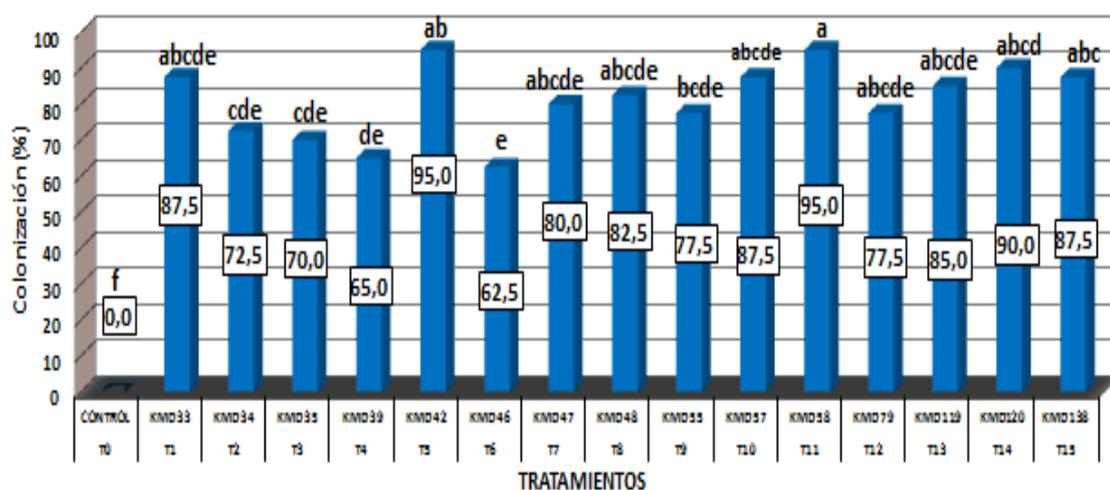
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Media cuadrática	F.C	Sig.
Tratamientos	5,503	15	0,367	27,279	**
Error	0,646	48	0,013		
Total	6,148	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V =0,37 %

R<sup>2</sup> =89,5 %

X= 76,41%



**Gráfico 1:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para porcentaje de colonización de *Trichoderma* en plántulas de sachá inchi.

### 5.1.2. Altura de plantas inoculadas con nemátodos.

El anva y la prueba de duncan para altura de planta de sachá inchi inoculadas con *Trichoderma* y *Meloidogyne incognita* se muestran en el Cuadro 3 y el Gráfico 2.

**Cuadro 3:** Análisis de varianza para altura de planta en respuesta a la inoculación con *Trichoderma* e infestación con *Meloidogyne incognita*.

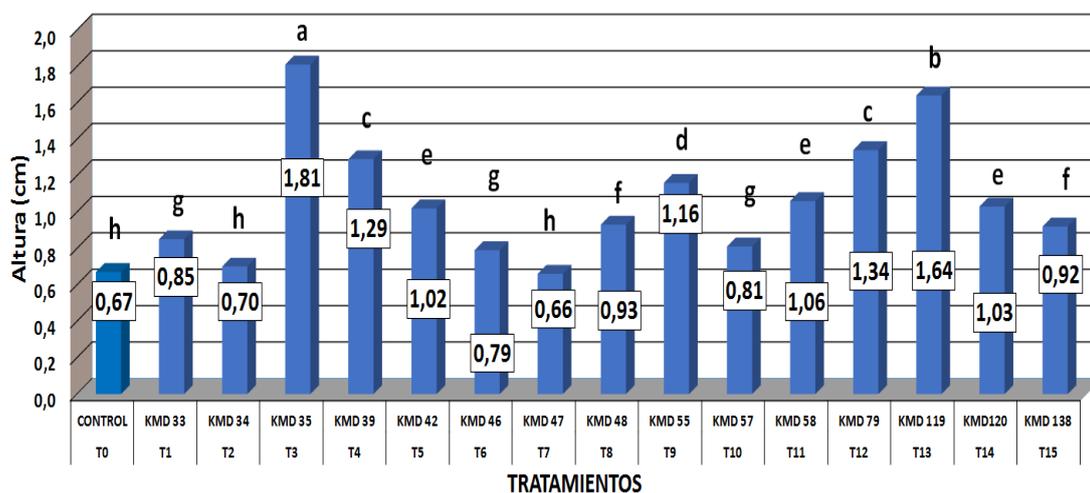
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Media cuadrática	F.C	Sig.
Tratamientos	6,746	15	0,450	223,457	**
Error	0,097	48	0,002		
Total	6,842	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 4,29 %

R<sup>2</sup> = 98,6%

X = 1,04 cm



**Gráfico 2:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para altura de planta en respuesta a la inoculación con *Trichoderma* e infestación con *Meloidogyne incognita*.

### 5.1.3. Número de nódulos.

El anva y la prueba de duncan para números de nódulos de planta de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* e inoculadas con *Meloidogyne incognita* se muestran en el Cuadro 4 y el Gráfico 3.

**Cuadro 4:** Análisis de varianza para número de nódulos en respuesta a la inoculación de *Trichoderma* e infestación con *Meloidogyne incognita*.

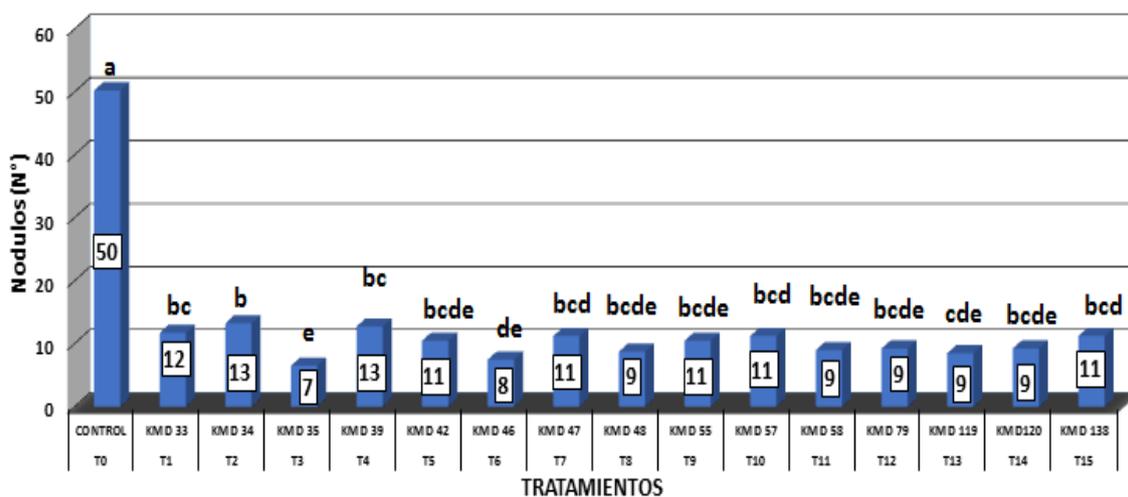
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Media cuadrática	F.C	Sig.
Tratamientos	61,546	15	4,103	22,619	**
Error	8,707	48	0,181		
Total	70,254	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 3,38 %

R<sup>2</sup> = 87,6%

X = 13



**Gráfico 3:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para número de nódulos en respuesta a la inoculación con *Trichoderma* e infestación con *Meloidogyne incognita*.

### 5.1.4. Longitud de raíces.

El anva y la prueba de duncan para longitud de raíces de plántulas de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* e inoculadas con *Meloidogyne incognita* se muestran en el Cuadro 5 y el Gráfico 4.

**Cuadro 5:** Análisis de varianza para longitud de raíz en respuesta a la inoculación con *Trichoderma* e infestación con *Meloidogyne incognita*.

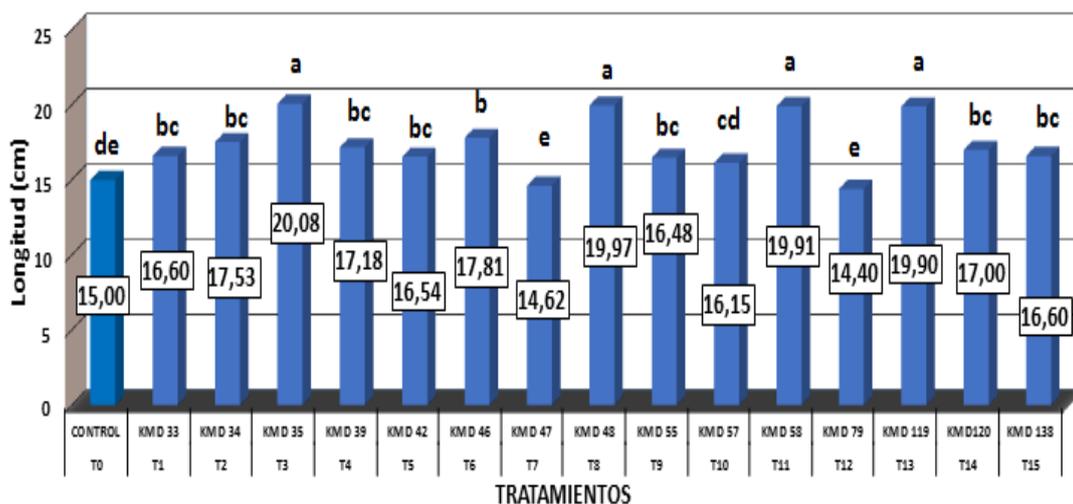
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Media cuadrática	F.C	Sig.
Tratamientos	212,719	15	14,181	17,990	**
Error	37,837	48	0,788		
Total	250,556	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 5,15 %

R<sup>2</sup> = 84,9%

X = 17,24 cm



**Gráfico 4:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para longitud de raíces en respuesta a la inoculación con *Trichoderma* e infestación con *Meloidogyne incognita*.

### 5.1.5. Altura de plantas colonizadas con *Trichoderma*.

El anva y la prueba de duncan para altura de planta de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* se muestran en el Cuadro 6 y el Gráfico 5.

**Cuadro 6:** Análisis de varianza para altura de planta de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

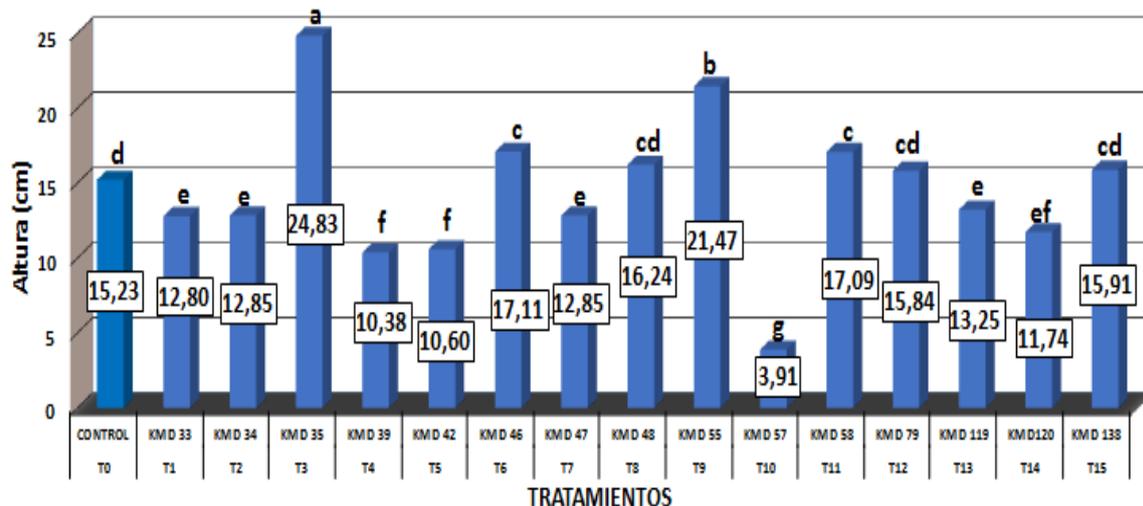
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig.
Tratamientos	1352,491	15	90,166	80,228	**
Error experimental	53,946	48	1,124		
Total	1406,437	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 7,31 %

R<sup>2</sup> = 96,2 %

X = 14,5 cm



**Gráfico 5:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para altura de plantas colonizadas con *Trichoderma*.

### 5.1.6. Área foliar.

El anva y la prueba de duncan para el área foliar de plántulas de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* se muestran en el Cuadro 7 y el Gráfico 6.

**Cuadro 7:** Análisis de varianza para área foliar de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

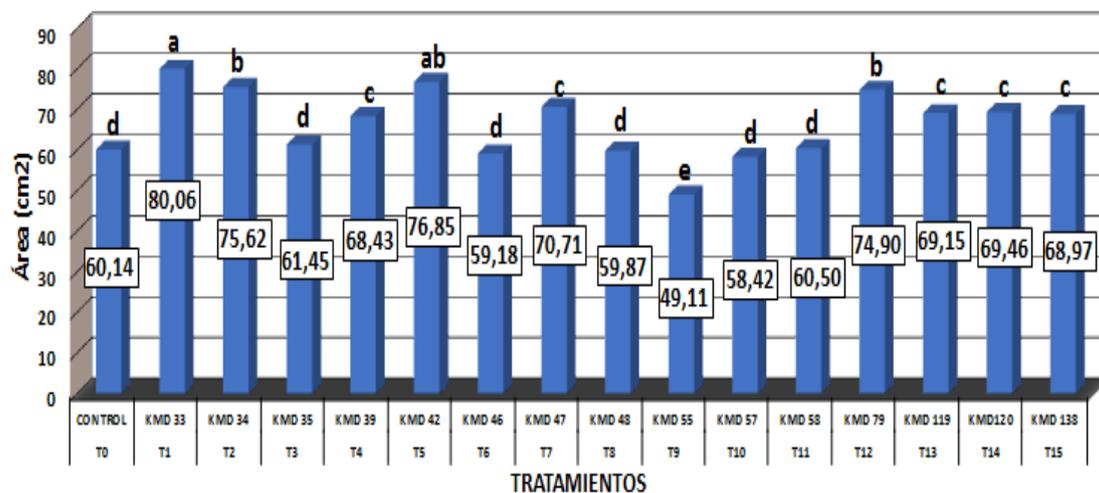
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L	Media cuadrática	F.C	Sig.
Tratamientos	4221,242	15	281,416	44,956	**
Error	300,474	48	0,788		
Total	452,716	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 3,77 %

$R^2 = 93,4\%$

$X = 66,4 \text{ cm}^2$



**Gráfico 6:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para área foliar de plántulas de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma*.

### 5.1.7. Número de hojas.

El anva y la prueba de duncan para el número de hojas de plántulas de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* se muestran en el Cuadro 8 y el Gráfico 7.

**Cuadro 8:** Análisis de varianza para número de hojas de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

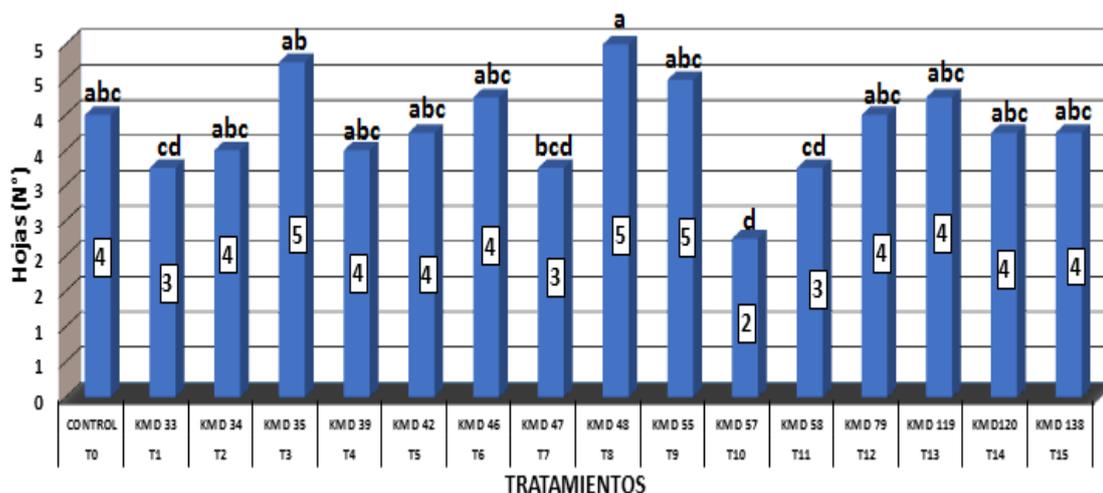
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig.
Tratamientos	2,092	15	0,139	2,615	**
Error experimental	2,560	48	0,053		
Total	4,652	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 6,04 %

R<sup>2</sup> = 45 %

X = 3,81



**Gráfico 7:** Prueba de duncan (p<0,05) para número de hojas de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

### 5.1.8. Peso fresco de la biomasa.

El anva y la prueba de duncan para el peso fresco de la biomasa de plántulas de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* se muestran en el Cuadro 9 y el Gráfico 8.

**Cuadro 9:** Análisis de varianza para peso fresco de la biomasa total de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

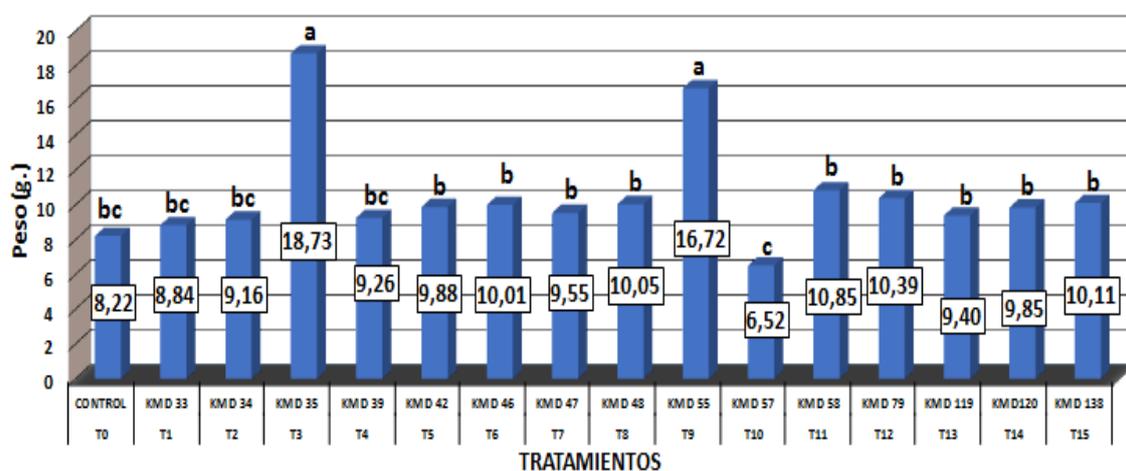
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig.
Tratamientos	548.274	15	36,552	11,531	**
Error experimental	152,157	48	3,170		
Total	700,431	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 17%

$R^2 = 78,3 \%$

$X = 10,47 \text{ g}$



**Gráfico 8:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para peso seco de la biomasa de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

### 5.1.9. Longitud de raíz.

El anva y la prueba de duncan para longitud de raíz de plántulas de sachá inchi colonizadas con *Trichoderma* se muestran en el Cuadro 10 y el Gráfico 9.

**Cuadro 10:** Análisis de varianza para longitud de raíz de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

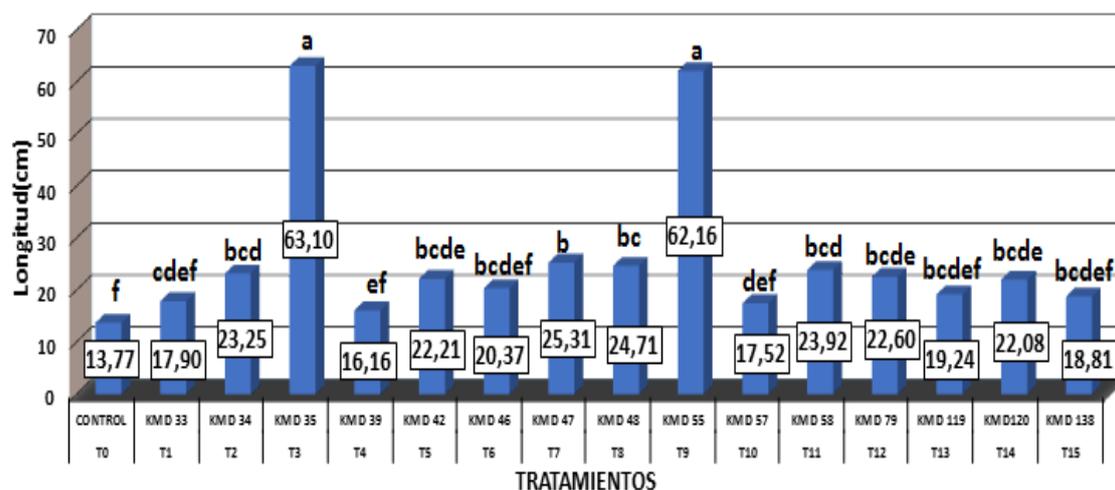
Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	G.L.	Media cuadrática	F.C.	Sig.
Tratamientos	13006,732	15	867,115	50,062	**
Error experimental	831,394	48	17,321		
Total	13838,126	63			

\*\*= Altamente Significativo

C.V = 16,12%

$R^2 = 94 \%$

$X = 25,82 \text{ cm}$



**Gráfico 9:** Prueba de duncan ( $p < 0,05$ ) para longitud de raíz de plántulas de sachá inchi colonizados con *Trichoderma*.

## **5.2. Discusiones.**

### **5.3. Capacidad endofítica de *Trichoderma* sp, colectada de plantas de sachá inchi.**

#### **5.3.1. Porcentaje de colonización endofítica.**

De acuerdo a los resultados obtenidos, todos los tratamientos evaluados tuvieron un alto porcentaje de colonización endofítica, teniendo como mejores tratamientos a T5 (KMD 42) y a T11 (KMD 58) con 95 % de colonización respectivamente (Gráfico 1), a diferencia del T6 (KMD 46) que obtuvo 62,5% de colonización, esto indica que sí hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados; estudios realizados por (Barrios, 2006) muestran que en vitroplantas de banano inoculadas con hongos endofíticos, el mayor porcentaje de colonización por parte de los hongos es en la raíz, seguido por el cormo, pseudotallo y hojas. Asimismo, pruebas para determinar el patrón de colonización de hongos y bacterias endofíticas combinadas en vitroplantas de banano, se encontró que los mayores porcentajes de colonización fueron con el tratamiento consorciado *Trichoderma atroviride* con *Bacillus*, con un porcentaje de colonización de 90 % en raíz, 85 % en cormo y 45 % en pseudotallo (Cháves, 2007); por su parte Nuñez y Pocasangre (2012) inocularon tres aislamientos de *Trichoderma atroviride* a plantas de maíz y arroz en una suspensión de esporas de  $5 \times 10^6$  ufc/ml por 15 minutos, y se sembraron en maceteros de 3 litros de capacidad determinando en maíz que los 3 aislamientos fueron capaces de colonizar los órganos internos alcanzando colonizaciones promedio de 47% en raíz, 45% en tallo y 16% en hojas y en arroz la colonización promedio fue de 40% en raíz, 37% en tallo y 8% en hojas; la colonización se presentó en todos los órganos de la planta, presentándose un gradiente de colonización, siendo mayor en la raíz con un promedio de 47%, independientemente del hongo utilizado, tallos y hojas respectivamente.

### **5.4. Efecto de control del hongo endófito *Trichoderma* sp, sobre el nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) de sachá inchi.**

#### **5.4.1. Altura de plantas de sachá inchi.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el Gráfico 2 se observa que de los tratamientos evaluados el mejor fue T3 (KMD 35) con una tasa de

crecimiento de 1,81 cm cada cinco días, en cambio el T0 (Control) obtuvo una tasa de crecimiento de 0,67 cm cada cinco días, esto indica que si hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y el control, Meneses (2003) trabajó con *Fusarium* y *Trichoderma* provenientes de plantaciones de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* Cobb. Thorne., obteniendo que las plantas protegidas con los hongos endofíticos presentaron menor población de *R. similis*, comparado a las plantas que no fueron protegidas, así como valores más altos en las variables de promoción de crecimiento, además el peso de las raíces y el tallo en plantas que fueron protegidas, tuvo un incremento promedio de 39 y 29% respecto al testigo, por su parte Pérez *et al.*, (2006) coinciden al afirmar que el hongo antagonista *Trichoderma* spp., es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne*, donde se pone de manifiesto la acción de sus toxinas e hifas dando lugar a un follaje más exuberante en plantas de tomate que el testigo estándar, y fue más eficaz, aunque no significativamente, lo que pudiera atribuirse al efecto estimulador del crecimiento del hongo.

#### **5.4.2. Número de nódulos.**

Según los resultados que se obtuvieron en la prueba de número de nódulos, en el Gráfico 3 se observa que el mejor tratamiento evaluado fue el T0 (Control) con 50 nódulos, en cambio el que presentó menor número de nódulos fue el T3 (KMD 35) con 6 nódulos, lo que indica que si hubo diferencias significativas entre el control con los tratamientos evaluados. El análisis microscópico mostró la adhesión conidial de *Trichoderma* spp., hacia huevos de *Meloidogyne incognita*, teniendo similitud a los estudios realizados por Madail (2008) cuando menciona el potencial de los hongos *Trichoderma* spp., y *Paecilomyces lilacinus* para controlar *M. incognita*, en bioensayos realizados in vivo asociada a plantas de frijol, mostrando que producen enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y proteasas que causaron el 100% de mortalidad de J2 (juveniles segunda etapa)y produciendo menor número de agallas.

### **5.4.3. Longitud de raíz.**

Para la longitud de raíz en los tratamientos evaluados los que presentaron mejor índice de longitud fueron T3 (KMD 35), T8 (KMD 48), T11 (KMD 58) y T13 (KMD 119) con 20,08; 19,97; 19,91 y 19,90 cm de longitud de raíz respectivamente, en cambio el T0 (Control) se mostró en un rango medio de longitud con 15 cm (Gráfico 4), mostrando diferencias significativas entre los tratamientos y el control, Pérez *et al.*, (2006) menciona que la eficacia del hongo en el suelo se incrementa a medida que este se establece. Por su parte Requena (2013) estudió la relación entre la población inicial de nemátodos y el crecimiento de plántulas de pimiento, obteniendo la tasa de reproducción del nemátodo en pimiento en condiciones de cultivo y, siendo el límite de tolerancia (T) de la planta a *Meloidogyne incógnita* de 1,5 huevos y J2 por ml<sup>-1</sup>.

### **5.5. Capacidad del hongo endófito *Trichoderma* sp, como promotor de crecimiento de plántulas de sachá inchi.**

Para la altura de plantas de sachá inchi, de acuerdo con los resultados obtenidos el mejor tratamiento fue el T3 (KMD 35) con una tasa de crecimiento semanal de 24,83 cm de altura, en cambio el T0 (Control) se mostró en un rango medio con 15,23 cm de longitud (Gráfico 5). Para el área foliar, el mejor tratamiento fue el T1 (KMD 33) con 80,06 cm<sup>2</sup> de área foliar, por su parte el T0 (Control) se mostró en un rango medio con 60,14 cm de área foliar (Gráfico 6), para el número de hojas de acuerdo al Gráfico 7 se observa que los mejores tratamientos fueron el T8 (KMD 48) y el T3 (KMD 35) con 5 y 4 hojas respectivamente, en cambio el T0 (Control) tuvo 4 hojas. Para el peso de la biomasa fresca de plantas de sachá inchi, de acuerdo a los resultados obtenidos en el Gráfico 8 se observa que los mejores tratamientos fueron el T3 (KMD 35) y el T9 (KMD 55) con 18,73 y 16,72 g. respectivamente, por su parte el T0 (Control) obtuvo 8,22 g. de peso de biomasa fresca, mostrándose en un rango medio. De acuerdo a los resultados obtenidos, en el Gráfico 9 se observa que los mejores tratamientos fueron el T3 (KMD 35) y el T9 (KMD 55) con 63,10 y 62,16 cm de longitud de raíz, por su parte el tratamiento que mostró menor índice de longitud de raíz fue el T0 (Control) con 13,77 cm de longitud. Ramos (2006) evaluó el efecto de promoción de crecimiento de 14 tratamientos: seis aislamientos del género *Trichoderma* y seis aislamientos de cepas no

patogénicas del género *Fusarium* sobre vitroplantas de banano y piña bajo invernadero, obteniendo resultados favorables después de 60 días presentando una mayor promoción de crecimiento, diámetro del pseudotallo, número de hojas activas, peso foliar y radical y desarrollo radical, el mayor desarrollo de sistema radical se registró en el tratamiento Mycoral®. En piña los tratamientos inoculados con Endofítico 3 (*Fusarium*), 2,10 *Trichoderma*, 3,10 *Trichoderma* y 1,4 *Trichoderma* mostraron un mejor desarrollo en las mismas variables comparados con el testigo. Por su parte Núñez (2011) determinó los porcentajes de promoción de crecimiento en plantas de maíz y arroz protegidas con tres aislamientos endofíticos de *Trichoderma atroviride* inoculadas en una suspensión de esporas de  $5 \times 10^6$  ufc/ml por 15 minutos, los resultados en maíz mostraron al tratamiento Endo 2 y Endo 3 los que tuvieron mejores resultados con 85,14 cm y 80,35 cm respectivamente comparado con 73,41 cm del testigo, en la producción de biomasa fresca total, el mejor tratamiento fue el Endo 3 con un incremento en peso de 25% con respecto al testigo, en arroz los tratamientos que mayor valor en la altura obtuvieron fueron el Endo 3 y el TA con 45,19 cm y 43,80 cm respectivamente. En la producción de biomasa fresca total el TA y Endo 1 obtuvieron los mejores resultados, 126,80 g y 120,92 g respectivamente. Estos resultados indican que los aislamientos endofíticos evaluados promueven el crecimiento en maíz, pero este efecto no fue detectado significativamente en arroz.

## VI. CONCLUSIONES.

- 6.1.** Según los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación se concluyó que el tratamiento que mostró mejor respuesta por su capacidad de bioprotección a sachá inchi frente al ataque de *Meloidogyne incognita* es la cepa KMD 35 (T3).
- 6.2.** Para el porcentaje de colonización endofítica, todos los tratamientos evaluados tuvieron un alto porcentaje de colonización endofítica, teniendo como mejores tratamientos la cepa KMD 42 (T5) y cepa KMD 58 (T11) con 95 % de colonización.
- 6.3.** Las cepas KMD 35 (T3) y KMD 55 (T9) de *Trichoderma* sp promovieron mayor crecimiento de plántulas de sachá inchi, sobresaliendo en las variables de altura de planta, peso fresco de la biomasa, longitud de raíz y menor número de nódulos.

## VII. RECOMENDACIONES.

- 7.1. Estudiar la interacción de estos microorganismos en campo definitivo porque están demostrando que tienen un alto grado de eficiencia de colonización benéfica hacia plantas de sachá inchi en la fase de laboratorio y vivero, y de esta manera corroborar resultados.
- 7.2. Realizar ensayos continuos con este hongo endófito (*Trichoderma* sp) en otros cultivos de importancia en nuestra región, en etapa de vivero, con la finalidad de evaluar su efectividad, en el desarrollo de las plantas, como en su capacidad de controlar plagas.
- 7.3. Utilizar los tratamientos caracterizados de acuerdo a su efecto obtenido en este trabajo de investigación para realizar estudios continuos y ver si su efecto prevalece con el tiempo y si se obtiene resultados favorables.
- 7.4. Se recomienda el uso de hongos endófitos (*Trichoderma*) como organismo benéfico en el crecimiento de plantas y que además actúan como controladores biológicos, reduciendo el uso de plaguicidas y contribuyendo de esa manera con el cuidado del medio ambiente.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Alexopoulos, C.; Mims, C. y Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. Fourth edition. Editorial Willey. New York. 237 p.
- Altomare, C.; Norvell, W. A.; Björkman, T. y Harman, E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microb.* 65(7), 2926-2933.
- Astudillo, C.; Blanco, B. (1999). *Establecimiento de los parámetros semi-industrial del hongo T. harzianum, utilizado en control biológico*. Tesis de pregrado. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Pp. 7-11, 14, 20.
- Bae, H.; Sicher, C.; Kim, S.; Strem, D.; Melnick L.; Bailey, A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11): 3279–3295.
- Bailey A., Bae H., Strem D., Crozier J., Thomas E., Samuels J., Vinyard T., Holmes A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao* L. *Biological Control* 46, 24–35.
- Bandara, W.; Seneviratne, G.; Kulasooriya, A. (2006). International among endophytic bacteria and fungi: effect and potentials. *J. Biosci* 31:645-650.
- Barrios, M. (2006). *Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet) en plátano*. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica
- Benítez, T.; Rincón, M.; Limón, C.; Codón, C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7(4):249-260.

- Bjorkman, T., Harman E. and Blanchard L. (1995). Root development in sweet-corn inoculated with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *HortScience* 30(4): 810 (Abstr.).
- Canto M, Mattos L. y Melgarejo T. (2006). Reporte de Análisis Fitopatológico y Nematológico Muestras de Suelo, Fruto y Raíces. UNALAM. Lima – Perú.
- Carroll, G.; Petrini, O. (1983). Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycology* 75(1):53-63.
- Carroll, G. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (1993). *Manejo integrado de plagas* (Tomo III). Ministerio de Agricultura y ganadería. Nicaragua. 106 págs.
- Cepeda, M. (1996). *Nematología Agrícola*. Primera edición. Editorial Trillas. 305 pp.
- Chaves, N. (2007). *Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nemátodo barrenador Radhopolus similis (Cobb) Thorn*. Tesis de posgrado Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba – Costa Rica. CATIE. 85 p.
- Coyne, N. (2010). *Nematología practica: Una guía de campo y Laboratorio*. SP-IPM. Cotonou.
- Cruz, M. y Lina. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003, Mediante fermentación Bifásica a escala piloto*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C. 123 p.
- Cupull, R., Andréu, N.C. Pérez, Y. Delgado, and S.M. del C. Cupull (2003). *Efecto de Trichoderma viride como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de Rhizoctonia solani Kuhn*. Centro Agrícola. Año 30. n° 1.
- Domsch, K.; Anderson, W.; Yersoon, H. (1980). *Compendium of soil fungi. Revision of the genus Trichoderma*. Academic Press, London. 136:794-810.

- Dos Santos, A., Ferraz, S. and Muchovej, J., (1992). *Evaluacion de 20 especies de hongos de Brasil para el control biologico de Meloidogyne incognita raza 3*. Universidad Federal de Vicosa. Vicosa, MG Brazil.
- Escobar, M. (2008). *Poblaciones de nemátodos fitoparasitos asociados a diferentes sistemas de manejo en café en el municipio de Masatepe, departamento de Masaya (ciclo 2006-2007)*. Universidad Nacional Agraria (UNA). . Managua.
- Federación de Cooperativas Agroindustriales de Nicaragua (FENIAGRO) (2010). *Biofertilizantes, bioprotectores y biorestauradores micorrízicos para la producción agroecológica en las fincas de los productores de café*.
- Fonseca, A. (1998). *Estudio preliminar sobre la dinámica poblacional del bio-controlador Trichoderma spp. En el suelo*. Tesis de pregrado. Bacteriología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad javeriana, Bogotá-Colombia. p. 29-32.
- French, E. y T. Hebert. (1982). *Métodos de investigación fitopatológica*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 135 p.
- Galluser, S. (2005). *Identificación de Muestras Botánicas del Género Plukenetia (Euphorbiaceae)*. Informe Final de Consultoria. AMC N° 012- 2004/INIA-E.E.POV/CEP. Sub-Proyecto. Identificación de Material Promisorio, Recuperación Y Recolección de Germoplasma de Plukenetia volubilis L. (Sacha Inchi). Co-Financiado por el Proyecto INCAGRO. Editorial Cordillera. 2da Edición. Tarapoto-Perú.
- Gelpud, C., Mora, E., Salazar, C. y Betancourth, C. (2011). *Susceptibilidad de Genotipos de Solanum spp. al nemátodo causante del nudo radical Meloidogyne spp.* Universidad Nacional de Colombia (UNAL). Bogotá, Colombia. 19 págs.
- Guerrero, J. (2006). *El Sacha Inchi -Investigaciones y Nociones Generales sobre la especie*. Universidad Nacional de San Martín - Facultad de Ciencias Agrarias. Tarapoto-Perú. Pág. 10.
- Harman, E. and Chet, I. K.(1981). Factors affecting Trichoderma hamatum applied to seed of bio-control agent. *Phytopatology* 71: 579-582.

- Harman, E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. (2004). Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2:43-56.
- Harman, E. (2006). Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Hasén y Stoewesand. (1980). *Resultados de análisis del aceite y proteína del cultivo de sachá inchi*. Universidad de Cornell. Editorial USA. México. 1ra Edición. México.
- Hussey, S; Williamson, M. (1998). Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In Barker, KR; Pederson, GA; Windham, GL. eds. *Plant and Nematode Interactions*. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. p. 87-108.
- Inbar J, Abramsky M, Coen D, Chet I, (1994). Plant growth enhancement and disease control by Trichoderma harzianum in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *Eur J Plant Pathol* 100: 337-346.
- Jatala, P., (1986). Biological-control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 24: 453-489.
- Lamari L. (2002). *ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*. A P S Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Leiva, P., (2009). *Evaluación del hongo nemátófago Pochonia chlamydospora, en el control del nemátodo del nudo Meloidogyne sp, en el cultivo de sachá inchi Plukenetia volubilis bajo condiciones de vivero*, para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín (UNSM-T). Tarapoto.
- Madail, S., (2008). *Potencial do uso dos fungos Trichoderma spp. e Paecilomyces lilacinus no biocontrole de Meloidogyne incognita em Phaseolus vulgaris*. Tesis presentada para la obtención de grado de Doctor en Fitotecnia, Universidad Federal Do Rio Grande Do Soul. Porto Alegre, Brazil.

- Manco, E. (2005). *Informe de Resultados de Investigación*. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. E.E – “El Porvenir”. Años 1996 – 2005.
- Márquez-Dávila; Cayotopa, J.; Arévalo, E.; Vivanco, U.y Arévalo, J. (2007). *Diagnóstico y niveles de inóculo del nematodo que afecta a la raíz de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) en el Perú*.
- Mendoza, G., Wilson H., Colina, J. (2013). *Efecto de Trichoderma atroviride, Trichoderma harzianum y Trichoderma viride sobre huevos de Meloidogyne sp. en condiciones de laboratorio*. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo.
- Meneses, A. (2003). *Utilización de hongos endofíticos provenientes de plantaciones de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador (Radopholus similis Cobb) Thorne*. Turrialba – Costa Rica.
- Moore, E. (1996). *Fundament's of the Fungi*. Fourth edition. Prentice Hall. New Jersey. 574 p.
- Mousain, (1997). Le Role Des Mycorhizes Dans La Nutrition Phosphateé Des Arbes Forestiers. *Rev. For.* XLIX: 67-81.
- Nico, A. (2002). *Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (Olea europea L.) en viveros de Andalucía y estrategias para su control*. Tesis Grado de Doctor. Córdoba, España. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales ETSIAM, Universidad de Córdoba. Instituto de Agricultura Sostenible CSIC. 291 p.
- Núñez, M., Pocasangre., L. E., (2011). *Hongos endófitos como promotores de crecimiento en Maíz (Zea mays) y Arroz (Oryza sativa)*, Guacimo, Limón - Costa Rica.
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma y Gliocladium*. Biology, Ecology and potential for bio-control. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54.

- Pérez, D., Pérez, N., Acosta, O., Gandarilla, H., Pérez, A., (2006). *Control biológico de nematodos con microorganismos antagonistas*. Centro de investigaciones agropecuarias. Villa Clara, Cuba.
- Piedra, N. (2008). *Manejo biológico de nemátodos Fitoparásitos con hongos y bacterias*.
- Pocasangre, E. (2000). *Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode Radopholus similis and the Panama disease (Fusarium oxysporum f.sp. cubense)*. Ph.D. Thesis. University Bonn, DE. 95 p.
- Poskuta, W; Dropkin, H; Nelson, J. (1986). Photosynthesis, photorespiration, and respiration of soybean after infection with root nematodes. *Photosynthetica* 20:405-410.
- Ramos, M. (2006). *Efecto de Hongos Endofíticos sobre Promoción Crecimiento in Vitro de plantas de Banano y Piña*. Zamorano, Honduras.
- Reátegui, J. (2014). *Importancia de los hongos endófitos en el biocontrol de las enfermedades de las plantas*, tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional de San Martín (UNSM-T) Tarapoto.
- Requena, C., (2013) *Control Biológico de Meloidogyne incognita en Pimiento (Capsicum annuum)*. Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Sánchez, J. (2010). "Efecto de quitina y quitosano sobre huevos juveniles de nemátodos formadores de nódulos radiculares, Nacobbus aberrans y Meloidogyne incognita, bajo condiciones in vitro e in vivo".
- Sánchez, M, (2009). *Aislamiento y Caracterización Molecular y Agronómica de Trichoderma spp. Nativos del Norte de Tamaulipas*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biotecnología Genómica.
- Shapiama, A. (2008). *Diagnostico poblacional de Nematodos Fitoparásitos en el cultivo de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.)*, Tesis para optar el título

- profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín (UNSM-T). Tarapoto.
- Shi, Y.; Lou, K.; Li, C. (2009). Promotion of plant growth by phytohormone producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils*. 45:645-653.
- Talavera, M. (2003). *Manual de nematología agrícola*. 23 pp.
- Taylor, L., Sasser, J N., (1983). *Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz*. Universidad del Estado de Carolina del Norte .Carolina del Norte – Estados Unidos.
- Tomatore, A., Rodríguez, I., Sobrero M., Cucciufu, E., (2011). *Producción sustentable de Eucalyptus globulus Labill en viveros forestales: Uso de Trichoderma harzianum Rifai como promotor de crecimiento*. Universidad Nacional de Lujan, Argentina.
- Tovar, C. (2008). *Evaluación de la capacidad antagonista “in vivo” de aislamientos de Trichoderma spp frente al hongo fitopatógeno Rhizoctonia solani*, tesis para optar el título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia.
- Trigozo, E. (2012). *Influencia del Trichoderma spp. endofítico sobre el crecimiento en inducción de resistencia al estrés hídrico en Cacao (Theobroma cacao L.)*, para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de San Martín (UNSM-T). Tarapoto.
- Valles, R. (1991). *Cultivo de Sacha Inchi*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto – Perú
- Vega, M. (2011). *Identificación de micorrizas versículo – arbusculares en Especies Agrícolas Y Forestales En La Zona De Tingo María*. Universidad Nacional Agraria De La Selva (UNAS). Tingo María, Perú.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, L.; Marra, R.; Woo, L.; Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Bioloy & Biochemistry* 40:1-10.

## ANEXOS.

### Anexo 1: Proceso para determinar el porcentaje de colonización de *Trichoderma* en plántulas de sachá inchi.



### Anexo 2: Colonización endofítica de *Trichoderma* en tejidos de sachá inchi.



**Anexo 3: Proceso para inoculación de *Meloidogyne incognita* en plántulas de sachá inchi.**



**Anexo 4: Variables estudiadas durante el trabajo de investigación.**

