

**ANTAGONISMO DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE  
POBLACIONES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi EN ARVEJA (*Pisum sativum* L.)  
EN LABORATORIO, INVERNADERO Y CAMPO\***

**JESSICA ANDREA DESCANCE VALLEJO  
MARIBEL XIOMARA TORO CRIOLLO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA  
SAN JUNA DE PASTO  
2014**

**ANTAGONISMO DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE  
POBLACIONES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi EN ARVEJA (*Pisum sativum* L.)  
EN LABORATORIO, INVERNADERO Y CAMPO\***

**JESSICA ANDREA DESCANCE VALLEJO  
MARIBEL XIOMARA TORO CRIOLLO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de ingeniera  
agrónoma**

**Asesor:**

Ph. D. Oscar Eduardo Checa Coral <sup>1</sup>

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA INGENIERÍA AGRONÓMICA  
SAN JUNA DE PASTO  
2014**

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2014

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
PRUEBA DE ANTAGONISMO EN CAMPO.....	25
CONCLUSIONES .....	35
BIBLIOGRAFIA .....	36

**ANTAGONISMO DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE  
POBLACIONES DE *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi EN ARVEJA (*Pisum sativum* L.)  
EN LABORATORIO, INVERNADERO Y CAMPO\***

Oscar Eduardo Checa Coral <sup>1</sup>  
Jessica Andrea Descance Vallejo<sup>2</sup>  
Maribel Xiomara Toro Criollo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, M.Sc, Ph.D. Universidad de Nariño.

<sup>2</sup> Estudiantes Ingeniería Agronómica, Universidad de Nariño.

---

**RESUMEN**

Se evaluó la efectividad antagónica *in vitro*, invernadero y en campo de 12 cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. agente causal del amarillamiento en el cultivo de arveja. Mediante la confrontación por cultivos duales se determinó los aislamientos que presentaron mayores resultados de antagonismo en cuanto a crecimiento micelial y halo de inhibición; de los cuales tres aislados (C2, C7, C12) más un testigo comercial C21(Perkins), evidenciaron mejor comportamiento y fueron seleccionados para ser evaluados bajo condiciones de invernadero; en esta fase se llevaron a cabo dos ensayos, el primero con el fin de establecer la capacidad antagónica de las cepas (C2, C7, C12 y C21), y el segundo con el fin de identificar las cepas, concentraciones y dosis más apropiadas. Las cepas C12 y C21 en dosis de 20 mL, y en concentraciones de  $10^8$  y  $10^6$  conidias/mL respectivamente mostraron mejor respuesta antagónica y se evaluaron en campo en tres municipios del departamento de Nariño, con un diseño BCA con cuatro tratamientos y 5 repeticiones. En las tres localidades la incidencia de afección fue mayor del 76%. En el municipio de Pupiales C12 mostró mayor capacidad antagónica medida por incidencia del patógeno en la raíz respecto al testigo, sin embargo la cepa C21 igualo en antagonismo y superó en rendimiento a la cepa C12. En las localidades de Gualmatán e Ipiales no se demostró el potencial antagónico de *Trichoderma* spp. medido a través de componentes de rendimiento.

**Palabras clave:** *Trichoderma* spp, *Fusarium oxysporum*, antagonismo, control biológico

## ABSTRACT

The antagonistic effectiveness has been in vitro, greenhouse and in the field of twelve native strains of *Trichoderma* spp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. which is the causal agent of yellowing in the peas crops. Through the comparisons of dual crops, it was established that the ones that present more results of antagonism in mycelial growth and halo of inhibition; of which, three isolated (C2,C7,C12) and one commercial control C21 (Perkins), have shown better behavior and were selected for being evaluated on greenhouse conditions. In this step. Two essays were carried out, the first one used for getting the antagonistic capacity of the four better strains and the second with the objective to identify the strains, concentrations and appropriate doses. The C12 and C21 strains in 20 ml doses, and concentrations of one hundred eight and one hundred and six conidias/ml. These showed better results and they were evaluated in fields in three towns of Nariño, with a BCA design, with four treatments and five repetitions. In all three locations there was a higher incidence of disease of 76%. In the municipality of Pupiales C12 showed higher antagonistic capacity measured by incidence of the pathogen in the root compared to control, but the C21 strain equal to or in antagonism and outperformed the C12 strain. In the towns of Gualmatán and Ipiales the antagonistic potential of *Trichoderma* spp was demonstrated. components measured by performance.

**Key words:** *Trichoderma* spp, *Fusarium oxysporum*, antagonism, biological control.

## INTRODUCCIÓN

La arveja (*Pisum sativum* L.), constituye actualmente un cultivo de alta importancia y gran demanda en el mercado nacional e internacional, debido al considerable número de familias que dependen de ella. En Colombia la arveja es cultivada en minifundios localizados en zonas de ladera, en alturas comprendidas entre los 2000 y 3000 msnm con temperaturas promedios de 12 a 17°C (Tamayo, 2002). En el país la producción de arveja se lleva a cabo principalmente en los departamentos de Nariño, Cundinamarca y Boyacá, con un área sembrada para el año 2013 de 14 817, 5449 y 5965 hectáreas respectivamente (DANE, 2013).

El amarillamiento causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. en arveja, es una de las enfermedades prevalentes, en cultivos intensivos y puede ocasionar pérdidas que varían del 30 al 50%, dependiendo de la incidencia, especialmente en variedades susceptibles y bajo condiciones climáticas favorables para el desarrollo del patógeno. Los síntomas de la enfermedad inician con una clorosis ascendente, seguida por el achaparramiento de las plantas, que luego se marchitan y finalmente, mueren (Tamayo, 2002; Buitrago *et al.*, 2006; FENALCE, 2007). El hongo provoca una muerte prematura de la planta por marchitamiento, al que también se asocia la obstrucción de haces vasculares, ataca diferentes variedades de plantas y es capaz de sobrevivir en los rastrojos de cultivos anteriores y permanecer en el suelo por varios años (Arguello *et al.*, 2007).

En el departamento de Nariño no existen variedades resistentes al amarillamiento y la rotación de cultivos junto a los sistemas de prevención tienen un valor limitado, mientras que el control químico, se ha convertido en uno de los métodos más utilizados, pero no suficiente, porque el hongo aún se encuentra ampliamente distribuido y es persistente en los suelos (Sañudo *et al.*, 2007). Sin embargo, esfuerzos de los agricultores para controlar este problema, no han sido satisfactorios. La utilización de agentes biocontroladores como *Trichoderma* spp. debe ser valorada como una opción para afrontar este disturbio, ya que mundialmente se ha registrado su acción con alta efectividad contra hongos fitopatógenos habitantes del suelo. (Anivies, 1998).

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos como *Fusarium* spp y otros (González *et al.*, 2005.). Este hongo actúa por competencia de nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y micoparasitismo. Además, de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Stefanova, 1996). *Trichoderma* tiene la capacidad de parasitar a otros hongos lo que se conoce como hiperparasitismo o micoparasitismo. El modo de acción de *Trichoderma* es complejo e incluye quimiotaxismo, antibiosis y parasitismo (Elósegui, 2006).

El control químico del patógeno es ineficiente y el manejo del patógeno debe hacerse en forma preventiva, debido a que una vez se presentan los síntomas de esta enfermedad, el problema se torna irreversible (González *et al.*, 2005). Frente a esta realidad el uso de control biológico con *Trichoderma*, puede ser una alternativa viable, siempre y cuando se identifiquen las cepas antagonicas más eficientes y se determine la metodología para su utilización.

Es por eso que el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo, evaluar la efectividad antagonica de aislamientos nativos y comerciales de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. causante de la marchitez y amarillamiento en el cultivo de arveja (*Pisum sativum* L.), en condiciones de laboratorio, invernadero y campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los bioensayos se realizaron en el laboratorio de sanidad vegetal e invernadero pertenecientes a la Universidad de Nariño, a una altitud de 2540 msnm, 01° 12' 13" LN y 77° 15' 23" LO, la fase de campo se estableció en la zona más afectada del departamento de Nariño, correspondiente a los municipios de Pupiales, Ipiales, y Gualmatan; ubicados respectiva y geográficamente: entre los 0° 52' de Latitud norte y 77° 38' de longitud al Oeste de Greenwich, 0° 54' 25" de latitud norte, 57° 41' 04" de longitud Oeste, y 0° 57' de Latitud norte y los 73° 35' de longitud al Oeste de Greenwich. Con una temperatura que oscila entre los 11 y 12°C y una precipitación anual entre 500 y 1100 mm que varía según la época del año.

Para obtener las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp se colectaron tres muestras representativas de 500g de suelo tomado de la rizósfera de plantas aparentemente sanas el método para el aislamiento de *Trichoderma* fue el método de dilución propuesto por Sanchez y Perez (2006). Para el aislamiento del fitopatógeno se empleó la metodología propuesta por Rojas (2011), se consideraron plantas de arveja que presentaban los síntomas de la enfermedad "amarillamiento", clorosis ascendente, bajo crecimiento y coloración rojiza en los haces vasculares.

### **Pruebas de antagonismo *in vitro***

Para las pruebas de antagonismo se utilizó la metodología descrita por Howell (2003):

En una caja Petri con PDA se colocó un disco de 5 mm de diámetro del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*. durante el tiempo necesario para que este inicie su crecimiento micelial (1 día), transcurrido éste periodo de acondicionamiento, se sembró al lado opuesto un disco de 5 mm de diámetro de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. Se realizaron nueve réplicas de cada enfrentamiento y se evaluó el crecimiento micelial y halo de inhibición a los 3, 5 y 9 días después de la siembra. El halo de inhibición se tomó cuando el crecimiento de las cepas del antagonico *Trichoderma* logró sobrepasar el crecimiento micelial del patógeno y se midió en cm.

Se usó un diseño irrestrictamente al azar con 13 tratamientos correspondientes a las cepas de *Trichoderma* spp. frente al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. siendo la unidad experimental una caja petri.

## **Pruebas de antagonismo en invernadero**

### **Primer ensayo**

Se efectuó con el fin de establecer la mayor capacidad antagónica de las cuatro cepas seleccionadas en la etapa de evaluación *in vitro*. Estas cepas se identificaron como C2, C7, C12 y C21 (Perkins); se incluyeron un testigo absoluto sin *Fusarium* y otro testigo con inoculación de *Fusarium* en concentración  $10^6$  conidias/mL; se utilizó un diseño DIA con seis tratamientos y dos repeticiones. La unidad experimental correspondió a cinco plantas sembradas en materos con 3 Kg de suelo estéril. La inoculación de las cepas de *Trichoderma* se hizo ocho días antes de la siembra y la inoculación de *Fusarium oxysporum* quince días después, en ambos casos se aplicó 20 mL de inóculo en drench.

### **Segundo ensayo**

Se realizó con el fin de identificar las cepas, concentraciones y dosis más apropiadas para ser evaluadas en la prueba posterior de campo. Se utilizó un diseño DIA con arreglo factorial para tres factores, el primer factor correspondió a las cepas C2, C7, C12 y C21. El segundo factor fue la concentración que tuvo cuatro niveles,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias /mL. El tercer factor fue la dosis a aplicar con dos niveles, 20 y 40 mL por planta, para un total de 32 tratamientos, con dos repeticiones; la unidad experimental correspondió a 5 plantas sembradas en materos con 3 kg de suelo estéril.

La obtención del inóculo se llevó a cabo preparando diferentes concentraciones para cada tratamiento. De cajas Petri con abundante crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp. se removieron los conidios con un haza, realizando diluciones seriadas en base 10 hasta  $10^6$  y  $10^9$ . Para *Fusarium* se utilizó la concentración  $10^6$  y para el caso de

*Trichoderma* spp. se utilizaron las concentraciones  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  finalmente se hizo el recuento de conidias en cámara de Neubauer (Vélez y col, 1997).

Igual que en el primer ensayo la inoculación de *Trichoderma* spp se llevó a cabo 8 días antes de la siembra. Cada tratamiento se aplicó en drench, según la dosis correspondiente; las inoculaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi se efectuaron cuando el total de las plantas tenían una altura aproximadamente 10 cm. A partir del momento de la siembra, las variables evaluadas tanto en el primer y segundo ensayo correspondieron a dos lecturas de altura, la primera a los 30 días de la siembra y la segunda a los 60 días; la incidencia, contando el número de plantas afectadas, con síntomas en el sistema radicular; observando minuciosamente la presencia del patógeno en los haces vasculares de la raíz y realizando su aislamiento para asegurar que el ataque haya sido ocasionado por *Fusarium Oxysporum* f. sp. pisi; finalmente se evaluó el peso fresco y seco de raíz.

### **Fase de campo**

Los ensayos se establecieron en lotes de los municipios: Pupiales, Ipiales y Gualmatán afectados por *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. En cada localidad se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos correspondieron a las dos cepas de mejor comportamiento en invernadero identificadas como C12 y C21, en concentración de  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^6$  conidias/mL respectivamente, un tratamiento químico constituido por la desinfección de semilla con oxicarboxin mas captan en dosis de 1 g de pc por kg de semilla y un testigo absoluto. La unidad experimental fue de dos surcos de cinco metros de largo, con distancia entre surcos de 1.2 m y distancia entre sitios de 0.10 m, depositando una semilla por sitio.

Se evaluaron los siguientes componentes de rendimiento:

Número de vainas por planta, se contó el número de vainas en 20 plantas y se obtuvo el promedio; número de granos por vaina contando el número de granos tomado en 20 vainas y sacando el promedio; el rendimiento en vaina verde, calculado a partir de dos surcos de la unidad experimental y llevado a  $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Al final del ensayo se determinó el porcentaje de

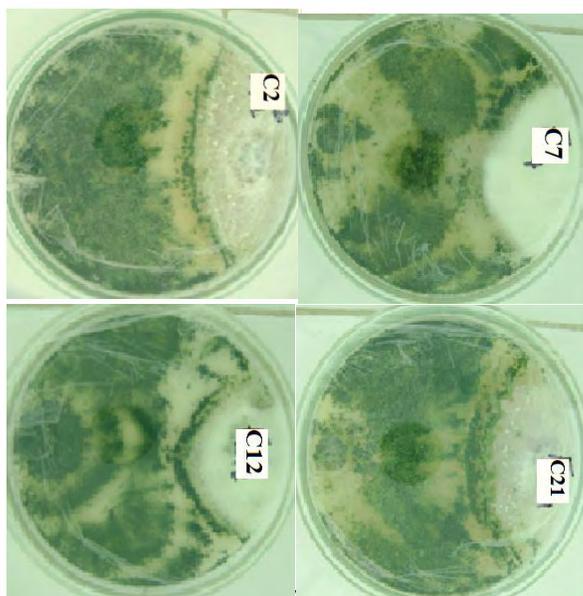
incidencia, evaluado por la presencia de coloración rojiza en la raíz. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza, y comparación de medias de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de antagonismo *in vitro*

Las pruebas de significancia de Tukey, muestran que la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi varió significativamente entre los 13 aislados, detectándose así niveles de significancia, tanto para crecimiento micelial como para halo de inhibición.

De acuerdo con el análisis de varianza se encontró diferencias estadísticas entre cepas con un P valor <0.0001. La prueba de comparación de promedios de Tukey (tabla 1) indica que las cepas C12, C7, C2 y C21 mostraron el mejor comportamiento presentando un crecimiento micelial que osciló entre 4.73 y 4.37 cm superando significativamente a las cepas C11, C5, C9, C6, C4 y C10, que registraron el más bajo crecimiento con promedios entre 3.38 y 3.18 cm (figura 1). El antagonismo a través del crecimiento micelial está definido en el micoparasitismo, como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares que corresponden a la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Díaz, 1994). Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Carsolio *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Enfrentamientos duales de cepas de *Trichoderma* sobre poblaciones de *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*.

El crecimiento del patógeno es detenido cuando el micelio de éste entra en contacto con el micelio de *Trichoderma* spp, y es en este punto cuando la capacidad del antagonista para sobrecrecer al patógeno fue variable para cada cepa, evidenciando así un efecto diferencial de los tratamientos sobre las cepas de *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*; Esto indica que probablemente los aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados pudieron tener variaciones en la tasa de incorporación de nutrientes, tasa de metabolismo, y en el crecimiento superior a *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*, para lo cual pudieron utilizar distintos mecanismos como los reportados por Michael (2001) que hace referencia a la secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xylasas y muchas veces las proteasas, las cuales pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol permitiéndole al antagonista en este caso *Trichoderma* spp. aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos.

**Tabla 1.** Comparación de Promedios de Tukey para la variable crecimiento micelial y halo de inhibición de *Trichoderma* spp, en enfrentamientos duales con *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi en evaluaciones en condiciones *in vitro*.

Cepa	Procedencia	Crecimiento Micelial	Cepa	Procedencia	Halo de Inhibición
C12	Ipiales	4,73 A	C12	Ipiales	4,55 A
C7	Gualmatán	4,62 AB	C7	Gualmatán	4,33 AB
C2	Pupiales	4,46 AB	C2	Pupiales	4,33 AB
C21	Perkins	4,37 ABC	C21	Perkins	4,00 ABC
C1	Pupiales	3,72 BCD	C3	Pupiales	3,44 BCD
C8	Gualmatán	3,49 CD	C11	Ipiales	3,33 CD
C3	Pupiales	3,46 CD	C9	Ipiales	3,22 CD
C11	Ipiales	3,38 D	C6	Gualmatán	3,22 CD
C5	Gualmatán	3,37 D	C1	Pupiales	3,22 CD
C9	Ipiales	3,36 D	C8	Gualmatán	3,22 CD
C6	Gualmatán	3,26 D	C4	Pupiales	3,11 CD
C4	Pupiales	3,24 D	C5	Gualmatán	3,99 D
C10	Ipiales	3,18 D	C10	Ipiales	3,77 D

Comparador Tukey  $\alpha$  0,05 = 0,934.

Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

La inhibición del crecimiento se observó en todos los tratamientos al sexto día, aun cuando el antagonista se encontraba distante del patógeno. Las pruebas de significancia de Tukey muestran que las cepas C12, C7 y C2 con halos de inhibición entre 4.55 y 4.33 cm mostraron diferencias respecto al 61.5 % de los tratamientos evaluados que tuvieron promedios por debajo de 3.34 cm. La cepa C21 mostró un halo de inhibición estadísticamente igual al presentado por las cepas C12, C7 y C2. Posiblemente la inhibición presentada por las cepas antes mencionadas se explica a través de antibiosis mecanismo característico para estas especies de biocontroladores. Al respecto Howell (2003) indica que la forma en que *Trichoderma* spp inhibe el crecimiento radial aun estando a distancia del patógeno, esta mediada por diversos mecanismos destacándose la antibiosis por producción

de metabolitos volátiles y no volátiles entre los cuales se encuentran pirones, isocianatos, pépticos y trichocinas, la antibiosis puede también asociarse con la producción de enzimas extracelulares difundibles tales como peptinasas, cutinasas, glucanasas, y quitinasas e inactivación de las misma hacia el patógeno, tal como lo sugieren Durán *et al.* (2003).

Por los resultados que se han obtenido hasta el momento, se ha llegado a la conclusión que la producción del factor inhibidor en *Trichoderma* depende más del aislamiento que de la propia especie. Aspecto este, que reafirma una vez más la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista. Teniendo en cuenta que una herramienta útil y confiable para conocer el potencial como agente de biocontrol de cepas de *Trichoderma* son los ensayos *in vitro* usados para determinar antagonismo (Larralde *et al.*, 2008), y que este tipo de ensayos se utilizan predictivamente para establecer la capacidad de inhibición del crecimiento antes de efectuar estudios que requieren más tiempo y costo económico (Lo *et al.*, 1998), fueron efectuadas estas pruebas de laboratorio que permitieron seleccionar las cepas C2, C7, C12 y C21 por su capacidad de inhibición. Sin embargo, es necesario realizar estudios a nivel de invernadero, no solo para comprobar su efectividad *in vitro*, sino para hallar la concentración de esporas/mL y dosis apropiada para la aplicación.

Solano (2004) reporta resultados similares al evaluar 3 cepas en cultivos apareados contra *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, donde en ambos casos se obtuvo antagonismo. Caso similar ocurrió con lo indicado por Michel (2001), donde para ambos hongos fitopatógenos se determinó antagonismo, con buenas perspectivas para ser utilizados en campo. En trabajo similar Bautista y Acevedo (1994) al utilizar 16 cepas de *Trichoderma* spp. en cultivos apareados contra *Sclerotium cepivorum*, cinco de ellas presentaron gran capacidad de antagonismo por su velocidad de crecimiento e inhibición de la formación de esclerocios. Contrariamente, Hernández (2005) encontró resultados opuestos, ya que al evaluar 6 cepas de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfsii* clasificó el antagonismo como mínimo. Asimismo Michel *et al.* (2005) reportaron que de 20 cepas evaluadas solo 3 detuvieron el crecimiento de *S. rolfsii* y en las cepas restantes el fitopatógeno fue más agresivo.

## Pruebas de antagonismo invernadero

### Primer ensayo

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para altura 2, incidencia peso fresco y seco de raíz. En la comparación de promedios las cuatro cepas, el testigo con *Fusarium* y el testigo absoluto para la variable 2 presentó mejor respuesta el testigo absoluto y C21 con promedios de 147.50 y 143.10 cm respectivamente, en comparación a C12 y C2 que tuvieron promedios de 134.90 y 125.50 cm; y una notable diferencia con C7 (115.55cm) y el testigo inoculado únicamente con *Fusarium oxysporum* (110.10 cm). Para la variable peso fresco de raíces los promedios que se destacaron fueron testigo absoluto, C12 y C21 con promedios de 4.57, 4.11 y 4.03 g y los tratamientos que evidenciaron menor altura fueron C2, C7 y testigo con *Fusarium*. En peso seco de raíces el tratamiento que indicó el mejor comportamiento fue el testigo absoluto (1.41 g), las cepas C21, C12 y C2 presentaron un comportamiento similar entre sí con promedios de 1.11, 1.07 y 1.02 g, respectivamente la cepa C7 y testigo solo *Fusarium* tuvieron los valores más bajos con respecto a esta variable con 0.67 y 0.45 respectivamente.

**Tabla 2.** Comparación de promedios de Tukey para las variables altura 2, peso fresco, peso seco e incidencia de *Trichoderma* spp. sobre poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. *sp. pisi*. En invernadero.

Tratamiento	Altura2	peso fresco	peso seco	incidencia
<b>T.absoluto</b>	147.50 A	4.57 A	1.41 A	0 C
<b>C21</b>	143.10 A	4.11 A	1.07 B	50 B
<b>C12</b>	134.90 B	4.03 AB	1.11 B	45 B
<b>C2</b>	125.50 C	3.75 B	1.02 B	70 AB
<b>C7</b>	115.55 D	3.58 B	0.67 C	95 A
<b>T.Fusa</b>	110.10 D	3.57 B	0.45 D	100 A
Comparador de tukey $\alpha$ 0,05 =	7.24	0.71	0.16	36.33
T.absoluto = Testigo absoluto				
T.Fusarium = Testigo fusarium				

La incidencia causada por *Fusarium oxysporum* sobre las plantas de arveja (tabla 2), muestra diferencias significativas entre los tratamientos. Las cepas C21 y C12 con promedios de 50 y 45% respectivamente mostraron incidencia significativamente menor que el testigo con *Fusarium* y la cepa C7 que presentaron 100 y 95% de incidencia. C2 tuvo una reacción intermedia con 70% sin diferencias con ninguna de las cepas en estudio ni con el testigo con *Fusarium*. El testigo absoluto no presentó ninguna incidencia del patógeno.

Lo anterior puede atribuirse a diferencias genéticas entre las distintas cepas de *Trichoderma* evaluadas, que permitieron a C12 y C21 el mayor efecto antagonico sobre *F. oxysporum* en comparación con las cepas C2 y C7. Al respecto Martínez *et al.* (2013) encontraron que las bondades como agente de control dependen más de las cepas de *Trichoderma*, que de la especie, pues estas pueden presentar diferencias en sus modos de acción, aún perteneciendo a una misma especie. Esto refuerza la necesidad de efectuar una correcta selección de los aislamientos respecto a sus dianas y ambientes, para obtener resultados consistentes en condiciones de campo.

### **Segundo ensayo**

Según los resultados del análisis de varianza (tabla 3), indican que la variable altura 1 presentó diferencias altamente significativas en los efectos simples de cepa y concentración así como también para la interacción cepa \* concentración.

**Tabla 3.** Cuadrados medios del análisis de varianza factorial combinatorio para los factores cepa concentración y dosis de *Trichoderma* spp para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi.

FUENTE DE VARIACIÓN	GI	Altura 1		Altura 2		Peso fresco de raíz		Peso seco de raíz		Incidencia	
Cepa	3	86.57	**	2536.99	**	1.08	**	0.60	**	6312.32	**
Concentración	3	171.46	**	412.33	**	0.14	**	0.03	*	676.61	**
Cepa*concentración	9	41.61	**	173.62	**	0.07	**	0,03	NS	54.77	NS
Dosis	1	3.75	NS	25.50	NS	0.002	NS	0.02	NS	62.86	NS
Cepa*dosis	3	17.43	NS	59.48	**	0.033	NS	0.007	NS	9.28	NS
Concentración*dosis	3	14.92	NS	27.83	*	0.04	*	0.01	NS	47.86	NS
Cepa*concentración*dosis	9	9.29	NS	25.35	**	0.008	NS	0.007	NS	54.27	NS
R <sup>2</sup>		0.85		0.97		0.91		0.86		0.93	
CV %		6.30		2.11		3.05		10.58		14.59	

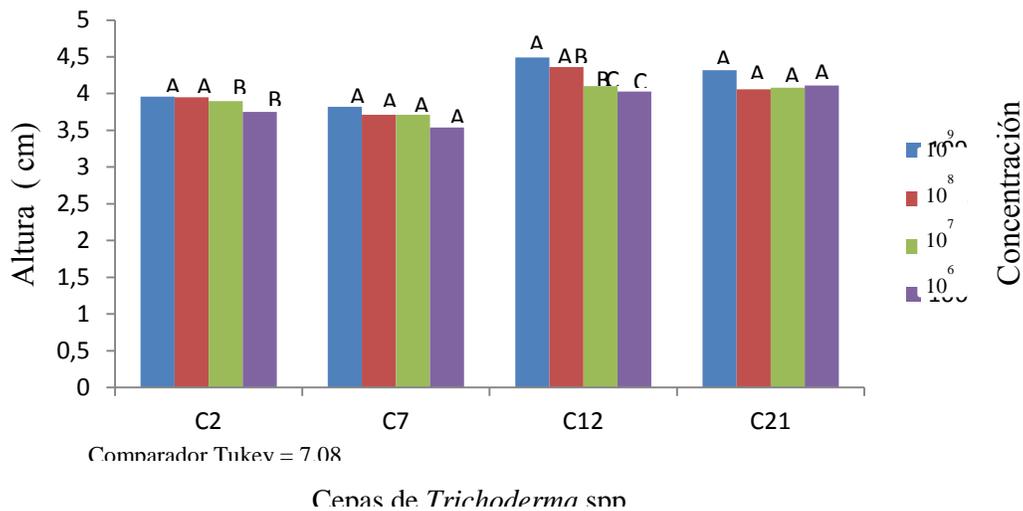
NS = Diferencias no significativas

\* = Diferencias significativas (p<= 0,05),

\*\* = Diferencias altamente significativas (p<= 0,01)

### Altura 1 de plantas

La comparación de medias en la interacción cepa\*concentración (figura 2) indican que para la cepa C2 de *Trichoderma* spp, procedente de Pupiales, las concentraciones de  $10^9$  y  $10^8$  mostraron mayor altura de las plantas al presentar promedios de 45.80 y 44.55 cm respectivamente, con diferencias frente a las concentraciones  $10^7$  y  $10^6$  que alcanzaron promedios de 35.15 y 35 cm. En la cepa C12 procedente de Ipiales, ocurrió un comportamiento similar siendo las concentraciones de  $10^9$  y  $10^8$  las que presentaron mayor altura de plantas con promedios de 48.75 y 47.05 cm mostrando diferencias significativas respecto a la concentración  $10^6$  que presentó una altura de 36.7 cm, la concentración  $10^7$  con una altura de 40.75 cm mostró un comportamiento intermedio al igualar la altura de las concentraciones  $10^6$  y  $10^8$ .



**Figura 2.** Comparación de promedios para la variable Altura 1 en la evaluación de cepas y concentraciones de *Trichoderma* spp por su antagonismo frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi en invernadero

Para las cepas C2 y C12, el aumento de concentración de *Trichoderma* de  $10^6$  a  $10^8$  contribuyó en la reducción del efecto del hongo *F. oxysporum* sobre la altura de la planta en esta primera lectura, no obstante en las cepas C7 y C21 (Perkins), el aumento de concentración de *Trichoderma*, no mostró evidencias de mejorar el efecto antagónico sobre *F. oxysporum*. Según Agrios (2002), las plantas afectadas por *Fusarium oxysporum* reducen su crecimiento debido a la capacidad del patógeno de colonizar raíces impidiendo una adecuada nutrición de la planta, sin embargo es necesario tener en cuenta que existe un comportamiento diferencial de las cepas de *Trichoderma* spp. a través de las distintas concentraciones del inoculo, lo cual permitió que algunas de ellas como C7 y C12 aumenten su capacidad antagónica cuando se incrementa la concentración.

### Altura 2 de plantas

De acuerdo con el análisis de varianza (tabla 3) la interacción triple cepa\*concentración\*dosis fue significativa indicando que los resultados de altura 2, fueron afectados por los tres factores en conjunto. Por lo tanto únicamente se analizó esta

interacción para definir dentro de cada cepa y en cada concentración, el comportamiento de las dos dosis evaluadas. En las cepas C2 y C7 (tabla 4) no se observó diferencias significativas entre las dosis de 20 y 40 mL dentro de cada una de las cuatro concentraciones del inoculo de *Trichoderma* ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$ ). En la cepa 12 se obtuvo diferencia al 5% de probabilidad entre la dosis de 20 mL con 146.7 cm y la dosis de 40 ml que presentó una altura de 134.8 cm. Lo anterior dentro de la concentración  $10^7$ .

En la cepa 21 para la concentración  $10^8$  conidias/mL de *Trichoderma* se obtuvo mayor promedio de altura en la dosis de 40 ml con 154 cm mostrando diferencias significativas sobre la dosis de 20 mL que alcanzó 140 cm. Salvo estas dos excepciones, el aumento de la dosis de 20 a 40 mL para las diferentes concentraciones evaluadas dentro de cada cepa no presentó un mejoramiento en su capacidad antagónica medida por la altura de la planta a los 60 días, en consecuencia la dosis de 40 mL constituye ventaja para favorecer el antagonismo en la concentración  $10^8$  de la cepa 21, medida por la altura de la planta a los 60 días de la siembra.

**Tabla 4.** Comparación de promedios de la variable altura 2 en la interacción cepa \* concentración \* dosis de *Trichoderma* spp.

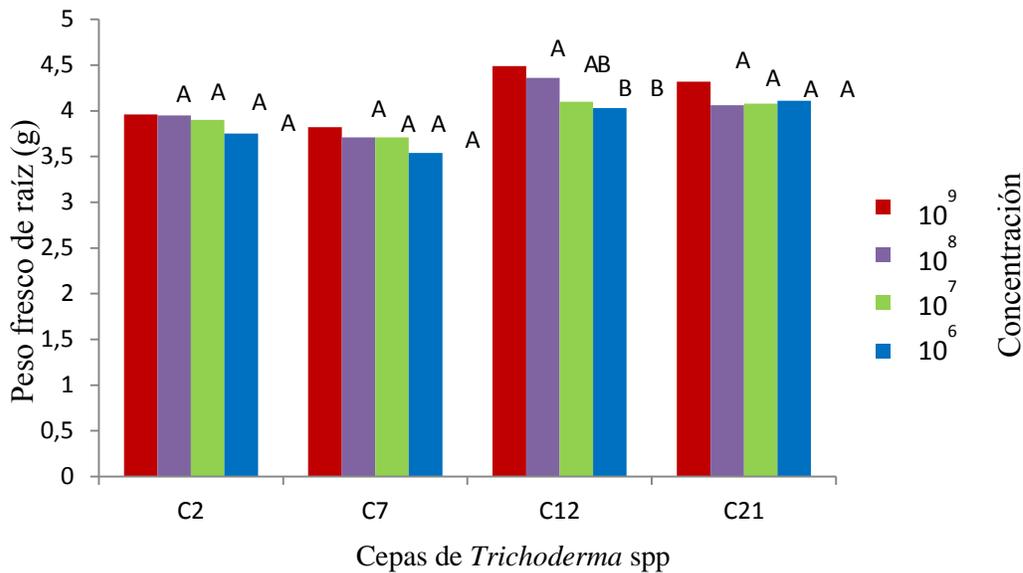
Cepa	Dosis (mL)	Concentración (conidias/mL)			
		$10^9$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
2	20	135,6 A	140,1 A	127.9 A	136.8 A
	40	136.5 A	140.1 A	136.4 A	133 A
7	20	121.9 A	116.9 A	113.2 A	116.2 A
	40	123.6 A	118.2 A	115 A	114.9 A
12	20	154.2 A	155,7 A	146.7 A	127.1 A
	40	155.7 A	156 A	134.8 B	123.9 A
21	20	139,3 A	140 A	142.7 A	142.3 A
	40	147,2 A	154.1 B	143.5 A	143.9 A

Comparador Tukey ( $\alpha$  0.05) = 5.84

Al respecto Lo et al 1994 afirma que la dosis de 20 mL de inóculo por planta aplicado en drench a la siembra y quince días después fue suficiente para medir la capacidad antagonista, lo cual coincide con los resultados de la mayoría de las cepas y concentraciones evaluadas, a excepción de la cepa C12 en concentración  $10^8$  que logra mejor antagonismo con dosis de 40 mL de inóculo esto puede atribuirse a su diferente constitución genética.

### **Peso fresco de raíces**

Teniendo en cuenta la significancia de la interacción cepa\*concentración (figura 3) no se evidenció diferencias significativas entre concentraciones para las cepas C2, C7 y C21, mientras que en la cepa C12 las concentraciones  $10^8$  y  $10^9$  con promedios de 4,36 g y 4.49 g mostraron diferencias significativas sobre la concentración  $10^6$  que alcanzó un promedio de 4.03 g. En general con excepción de la cepa C12 las concentraciones  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$ , tuvieron similar comportamiento en cada una de las cepas en estudio lo cual sugiere que no es necesario para estas tres cepas (C2, C7 y C21) aumentar la concentración de *Trichoderma* más allá de  $10^6$  conidias/mL. Estos resultados confirman lo reportado por Lo et al. (1994), quien encontró que la aplicación de *Trichoderma* a una concentración de  $10^6$  es efectiva para el control de un buen número de hongos del suelo. Sin embargo en el caso de C12 de la presente investigación las concentraciones  $10^8$  y  $10^9$  mejoraron su capacidad antagónica, medida a través de peso fresco de raíces, siendo esta una situación particular que puede considerarse si esta cepa resulta seleccionada para aplicación en campo.



**Figura 3.** Comparación de promedios para la variable Peso fresco de raíz en la evaluación de cepas y concentraciones de *Trichoderma* spp por su antagonismo frente a *Fusarium oxysporum f sp.* pisi en invernadero.

### Peso seco de raíces

Los resultados del análisis de varianza (tabla 3), muestran que la variable peso seco presentó diferencias altamente significativas en los efectos simples cepa y concentración. La Concentración  $10^6$  presentó diferencias significativas con un promedio de 1,07 gm frente a Concentración  $10^9$  que muestra un promedio para peso seco de 0,96 gm. Al respecto Reynaldi *et al.* (1998) al evaluar el peso seco de plántulas de tomate, observaron que este fue estimulado por la aplicación de *Trichoderma* spp a una concentración de  $10^5$  y  $10^6$  conidias/mL, pero no lo fue por la aplicación de concentraciones  $10^4$ ,  $10^7$  y  $10^8$  conidias/mL. Estos resultados indican que el estímulo del crecimiento producido por *Trichoderma* en plántulas de tomate solo ocurre con aislamientos particulares y rangos de concentración específicos.

**Tabla 5.** Comparación de los efectos simples de concentración y cepa para la variable peso seco de raíces e incidencias, en la evaluación de cuatro cepas de *Trichoderma* spp. por antagonismo frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi en condiciones de invernadero.

Concentración	Peso seco de raíces		Incidencia de <i>F. oxysporum</i>				
	Promedio	Cepa	Promedio	Concentración	Promedio	Cepa	Promedio
10 <sup>6</sup>	1.07A	C12	1.18A	10 <sup>6</sup>	55.44A	C7	75.05A
10 <sup>7</sup>	0.99AB	C21	1.10AB	10 <sup>7</sup>	44.93A	C2	54.72B
10 <sup>8</sup>	0.99AB	C2	1.01 B	10 <sup>8</sup>	45.83 B	C21	34.47C
10 <sup>9</sup>	0.96 B	C7	0.73 C	10 <sup>9</sup>	41.82 B	C12	32.82C

Para el efecto simple de cepa (tabla 5) se observaron diferencias significativas entre la cepa C12 con un promedio de 1,18 g y las cepas C2 y C7, con promedios de 1.01 y 0.73 g respectivamente. Cruz y Cisterna (1998) indican que *Trichoderma* incremento la longitud y peso seco de raíces ya que este hongo tiene la capacidad de crear un ambiente favorable al desarrollo radicular, (Harman *et al.*, 2004).

### Porcentaje de incidencia

Según el análisis de varianza (tabla 3) se presentó significancia para los efectos simples de cepa y concentración. En la comparación de cepas (tabla 5) evidenció diferencias significativas con un promedio de 75.05 % frente a las cepas C2 con un promedio porcentual de 54, 72, C21 con 34, 47, y C12 con 32,82 %. Del mismo modo la cepa C2 mostró diferencias significativas con respecto a la cepa C21 y C12, que fueron las que presentaron menor índice de enfermedad.

Según Yedida *et al.* (1999) la baja incidencia de *Fusarium Oxysporum* se presenta por la penetración de *Trichoderma* spp. en la epidermis y la corteza externa de las raíces, estimulando el sistema de defensa de la planta, llevando a la producción de compuestos bioquímicos y estructurales de defensa. Lo anterior pudo haberse presentado con mayor intensidad en las cepas C12 y C21.

Por otra parte la evaluación de concentración (tabla 5) indica que  $10^6$  y  $10^7$  conidias/mL con promedios de 55.44 y 53.93% mostraron diferencias significativas respecto a  $10^8$  y  $10^9$  que obtuvieron porcentajes de incidencia de 45.83 y 41.82 respectivamente.

A pesar de las diferencias observadas en el efecto simple del porcentaje de incidencia es importante tener en cuenta para definir la concentración de *Trichoderma* a aplicar en el campo, el efecto de las diferentes concentraciones sobre las otras variables evaluadas. Si bien el porcentaje de incidencia para las concentraciones  $10^8$  y  $10^9$  fueron menores en un 13.62 y 9.61 % respecto a  $10^6$ , en el caso de C21 estas diferencias no mostraron efecto positivo sobre la altura de la planta ni sobre el peso fresco de raíces, por lo tanto no se justificó usar en campo para esta cepa, una concentración mayor a  $10^6$  conidias/mL. En contraste en la cepa C12, la concentración  $10^8$  mostró efectos positivos en altura de plantas y peso fresco de raíces justificando su uso en el campo.

La potencialidad de *Trichoderma* en condiciones controladas ha sido resaltada por varios autores; García *et al.* (2006) evaluaron la efectividad de un biopreparado de *Trichoderma harzianum* Rifai, el cual mostró una alta capacidad antagónica contra *Rhizoctonia solani* en macetas. Por otro lado Martínez y Solano (1994), evaluaron dos aislamientos de *Trichoderma* sobre *Alternaria solani* en hojas de tomate y la efectividad del biocontrol estuvo entre 38 y 46%, argumentando que estos resultados son aceptables y se encuentran dentro de los amplios rangos de efectividad determinados para el antagonismo. Beltrán (2006), detectó una reducción de los daños por *Rhizoctonia* en papa tratadas con los aislados de *Trichoderma* Th003 y Th034 y observaron además plantas con mayor vigor, tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical de las plantas.

### **PRUEBA DE ANTAGONISMO EN CAMPO**

Los resultados del análisis de varianza (tabla 6), indica que se encontraron diferencias significativas en localidad para todas las variables evaluadas. De igual forma se encontró significancia en la interacción localidad\*cepa para las variables: número de vainas por planta, rendimiento y porcentaje de incidencia; estas variables se analizaron teniendo en

cuenta los niveles diferenciales significativos de la interacción. La variable número de granos por vaina fue la única que no evidencio un efecto significativo en la interacción, y por lo tanto se consideró analizar el efecto simple.

**Tabla 6.** Cuadrados medios de las variables: número de vainas por planta, número de granos por vaina, rendimiento y porcentaje de incidencia.

<b>Fuente de variación</b>	<b>% Incidencia decoloración raíz</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Numero vainas planta</b>	<b>Numero granos vaina</b>
Localidad	750,12 **	4936 **	438,75 **	40,00 **
Bloque (loc)	83,45 NS	2510039 NS	12,35 NS	0,4857 NS
Cepa	39255 NS	6430653 NS	30,45 NS	0,7044 NS
Loc*cepa	183,53 **	3860477 *	28,71 *	0,3543 NS
Error	45,18	1399296	5,72	0,3652

NS = No significativo

\* = Diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,05$ )

\*\* = Diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0,01$ )

### Porcentaje de incidencia

Los resultados indican que en la localidad de Gualmatán (tabala 7) el porcentaje de incidencia osciló entre 85,78 y 89,99%, sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. En la localidad de Pupiales la cepa C12 con 80% de incidencia presentó un promedio significativamente inferior al tratamiento sin control (100%), mientras que los tratamientos cepa C21 (Perkins) con 89% y control químico con 91% de incidencia no mostraron diferencia entre sí, ni con los tratamientos C12 y sin control. Es importante tener en cuenta que en las evaluaciones realizadas en las tres localidades (Gualmatán, Pupiales, Ipiales) se observó que a pesar de que la mayor parte de las plantas presentaron enrojecimiento vascular de la raíz, el cual permitió evaluar la incidencia del patógeno; dicho enrojecimiento o coloración vascular no es igual en todas las plantas, de tal forma que existen plantas con presencia del patógeno en la raíz, que son productivas, lo cual es posible cuando el hongo no afecta de forma severa los haces vasculares del xilema, en

consecuencia aun con la presencia del patógeno, la planta puede alimentarse y llegar a producción. A pesar de la alta incidencia de *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* en las tres localidades, es importante destacar el comportamiento de la cepa C12 en Pupiales, siendo el único tratamiento que mostró diferencia significativa con el tratamiento testigo.

**Tabla 7.** Comparación de promedios de Tukey, para la variable porcentaje de incidencia en la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp en tres localidades del departamento de Nariño.

Tratamiento	Gualmatán	Tratamiento	Ipiales	Tratamiento	Pupiales
S. Control	89,99 A	S. Control	89,9 A	S. Control	100 A
Químico	89,99 A	C21	88,04 A	Químico	91 A B
C21	87,68 A	C12	83,89 B	C21	89 A B
C12	85,78 A	Químico	76,35 B	C12	80 B
Comparador =	6,97		5,77		15,11

S. Control= Sin control

Es posible que la medida de incidencia realizada por presencia o ausencia del patógeno a través de la observación del enrojecimiento de la raíz, no sea un indicador preciso de la eficiencia de las dos cepas evaluadas porque, si bien el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* está dirigido a evitar la formación de polisacáridos del patógeno, es probable que a pesar del efecto de *Trichoderma*, el patógeno logre penetrar a la planta y manifestar el enrojecimiento de raíz, considerándose la planta como afectada, sin embargo la acción de *Trichoderma* spp. puede debilitar al patógeno el cual no logra colonizar suficientemente el área radical, permitiendo la reacción de la planta, para producir nuevas raíces o en su defecto simplemente cumplir su ciclo productivo, lo cual puede valorarse al evaluar los componentes de rendimiento. Es posible que en el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* evaluadas (C12 y C21) sobre el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*, estos eventos se hayan cumplido parcialmente debilitando al patógeno, pero sin evitar que este ingrese al sistema radical de las plantas.

Diaz *et al.* (2012) consideran que los niveles de incidencia dependen de la procedencia del terreno, característica de la variedad, temperatura y humedad, además esta variable no tiene

relación directa con algunos componentes de rendimiento por ende es necesario evaluar el grado de severidad lo que llevaría a determinar hasta qué punto la incidencia logra afectar el rendimiento de la planta.

### **Numero de vainas por planta**

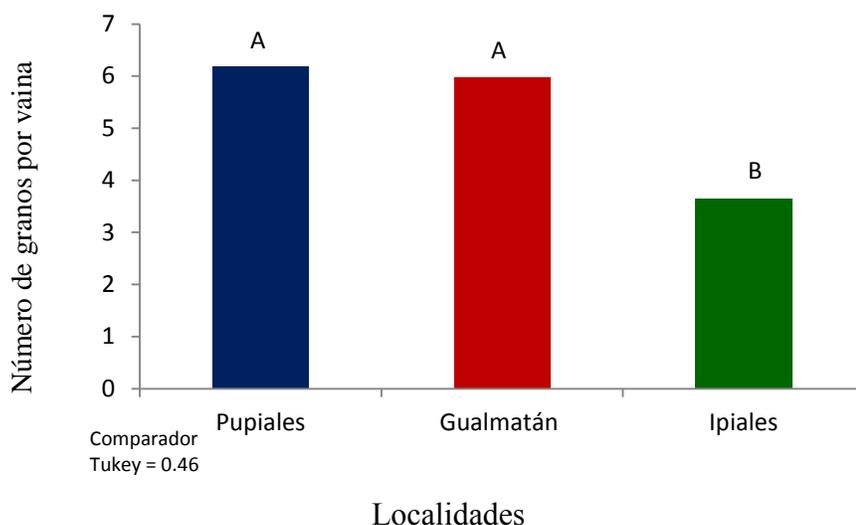
En las localidades de Ipiales y Gualmatán no se encontraron diferencias significativas (tabla 8) entre los tratamientos evaluados con promedios que oscilaron entre 4,83 y 5,39 para la localidad de Ipiales, y entre 8,33 y 15,9 vainas por planta para la localidad de Gualmatán. Para la localidad de Pupiales hubo diferencias significativas entre la cepa C12 con 16,50 vainas por planta, y los tratamientos sin control y químico con promedios de 12,02 y 11,82. Por su parte la cepa C21 perkins 14,90 no mostró diferencias estadísticas significativas, frente a ninguno de los tratamientos evaluados. El efecto de *Trichoderma* spp en este componente de rendimiento resultó positivo en Pupiales; el resultado obtenido en Pupiales para la cepa C12 que mostró mayor número de vainas respecto a los tratamientos químico y sin control están relacionados con la menor incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi obtenida para este tratamiento (cepa 12) respecto al tratamiento químico y sin control, discutida anteriormente. Se ha reportado que *Trichoderma* spp puede competir en la rizosfera con otros organismos por su propiedad de establecer interacción con la planta (Altomare *et al.*, 1999). Este hongo puede secretar moléculas llamadas sideroforos, los cuales son quelantes del hierro del medio ambiente, mineral que es necesario para la viabilidad de diversos hongos filamentosos, por lo cual cuando *Trichoderma* spp. absorbe este mineral impide que el hongo fitopatógeno lo utilice, teniendo así el crecimiento y desarrollo del mismo (Elad *et al.*, 1980). Sin embargo, debido a varios factores ambientales, la mayoría de los hongos antagonistas no muestran efectos consistentes de biocontrol, lo cual queda evidenciado en la localidad de Ipiales y Gualmatán por lo tanto es necesario reducir la variabilidad y garantizar su persistencia en el campo para convertir a los hongos biocontroladores en una alternativa atractiva al uso de pesticidas químicos (Thrane *et al.*,1995)

**Tabla 8.** Comparación de promedios de Tukey, para la variable número de vainas por planta en la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. en tres localidades del departamento de Nariño.

Cepa	Gualmatan		Cepa	Ipiales		Cepa	Pupiales	
C21	15,9	A	S control	5,39	A	C12	16,50	A
Químico	13,6	A	C12	5,20	A	C21	14,90	AB
C12	11,29	A	Químico	4,90	A	S control	12,02	B
S control	8,33	A	C21	4,83	A	Químico	11,82	B
Comparador=	5,54			3,21			4,41	

### Numero de granos por vaina

Teniendo en cuenta el análisis de varianza (tabla 6) los resultados encontrados en número de granos por vaina permiten evidenciar diferencias significativas entre las localidades, con un P valor <0.0001. Según la prueba de significancia de Tukey (figura 4), la localidad de Pupiales con 6,19 y Gualmatán con 5,98, presentaron un promedio superior con respecto a la localidad de Ipiales con 3,64 granos por vaina, efecto que está directamente relacionado con la presencia del patógeno en la planta, puesto que a medida que este coloniza el área radical, los nutrientes se obstaculizan y su ascenso es impedido, debilitando todas las estructuras, internas y externas de la planta. Es importante destacar que el ataque por parte del patógeno en la localidad de Ipiales fue realmente muy agresivo dejando evidencias notables. No obstante, y a pesar de conocer los efectos positivos generados por las cepas de *Trichoderma* spp, los fenómenos en la rizosfera son complejos y las diferencias obtenidas entre los tratamientos evaluados son difíciles de atribuir a un solo factor. Debido a que las variables de rendimiento presentan baja heredabilidad, por lo tanto muestran alta interacción con el ambiente (Muñoz, 2012).



**Figura 4.** Comparación de promedios para la variable número de granos por vaina para tres localidades en la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp por su antagonismo frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi en campo.

En investigaciones realizadas por González *et al.* (2005) en frijol, se encontró que en condiciones de campo usando la cepa C-66 de *Trichoderma*, en tratamientos de inmersión a la semilla, y al suelo antes y después de la siembra, la mejor alternativa fue el tratamiento al suelo en siembra y dos subsiguientes cada 15 días, comprobando así el funcionamiento y efectividad del este hongo como antagónico del suelo. Del mismo modo en el cultivo de haba (*Vicia faba*) los resultados reportados por Espinal *et al.* (2010), para peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano verde, peso de grano verde y peso de grano seco, demostraron el predominio de la actividad de *T. inhamatum* BOL 12 QD. Está claro que este hongo produce un efecto no sólo de biocontrol por parte de los metabolitos activos, sino que también las moléculas participan como mediadoras en la activación de factores relacionados con la respuesta inmune de la plántula y ciertos factores de crecimiento.

## Rendimiento en verde

La comparación de promedios para la interacción localidad\*cepa (tabla 9) muestra que para las localidades de Gualmatán e Ipiales no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados correspondiente a las cepas C21 y C12, al control químico y el testigo sin control. En Gualmatán los rendimientos oscilaron entre 6077 y 3678 kg.ha<sup>-1</sup>, mientras que en Ipiales estuvieron entre 1782 y 820 kg.ha<sup>-1</sup>. En Pupiales se observó que el tratamiento perkins con un promedio de 16138 kg.ha<sup>-1</sup> presentó diferencias significativas con el tratamiento testigo sin control que obtuvo 13044 kg.ha<sup>-1</sup>; los tratamientos químico y C12 con 14740 y 14699 kg.ha<sup>-1</sup>, no mostraron diferencias respecto a C21 y químico. Los rendimientos obtenidos en Gualmatán pueden considerarse intermedios si se tiene en cuenta el potencial productivo de la variedad Andina usada en esta evaluación que supera las 12 toneladas por hectárea, tal como se observa en la localidad de Pupiales.

**Tabla 9.** Comparación de promedios de Tukey, para la variable rendimiento en la evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. en tres localidades del departamento de Nariño.

Tratamiento	Gualmatán	Ipiales	Pupiales
C21	6077.3 A	824 A	16138,3 A
Químico	3678.3 A	1782 A	14740 A B
C12	4887.0 A	997 A	14699,9 A B
S. control	4393.0 A	820 A	13044 B
Comparador =	2910,1	981,51	2316,8
S. control = Sin control			

Esta reducción general en el rendimiento observada en Gualmatán puede atribuirse a la presencia del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi, como se observa en la (tabla 7) donde la incidencia estuvo entre 85.78 y 89.99 %. Tanto en porcentaje de incidencia como en rendimiento no se observó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (cepas, control químico y testigo sin control). Lo anterior sugiere que aun cuando la incidencia medida por la presencia del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi, en la raíz fue alta, las plantas lograron llegar a producción, no obstante hubo efecto sobre el

rendimiento. Por otra parte no se pudo demostrar la eficiencia de las cepas de *Trichoderma* C21 y C12 en el antagonismo sobre *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* para esta localidad.

En Ipiales se observaron los menores rendimientos de las tres localidades evaluadas, los cuales no sobrepasaron los 1800 kg.has<sup>-1</sup> en los diferentes tratamientos. La menor incidencia de *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* observada en C12 y control químico sobre C21 y testigo sin control no se reflejó en el rendimiento para esta localidad, en donde todos los tratamientos presentaron bajos rendimientos sin diferencias estadísticas entre sí.

Estos resultados indican que el patógeno para esta localidad (Ipiales) fue altamente agresivo y que además de estar presente en las raíces de las plantas con valores de incidencias entre 76.35 y 89.9 % (tabla 7) pudo afectar severamente los haces vasculares del xilema lo cual produjo la obstrucción de los mismo reduciendo el paso de nutrientes lo cual se reflejó en la drástica disminución de rendimiento observado en esta localidad. Al igual que en la localidad de Gualmatán en Ipiales no se pudo demostrar la capacidad antagonica de las cepas C12 y C21 medida a través del rendimiento obtenido. Es posible que las condiciones de mayor deterioro del suelo y la escasas de materia orgánica del mismo presentes en el ensayo de Ipiales hayan contribuido a reducir la eficiencia de las cepas C12 y C21 y a incrementar el efecto del patógeno sobre los rendimientos obtenidos.

Por otra parte las diferencias observadas en rendimiento en Pupiales entre la cepa C21 y el testigo sin control (tabla 9), no fueron evidentes en la evaluación de incidencia en donde los dos promedios son estadísticamente iguales. Es posible que la cepa C21 de *Trichoderma* haya afectado al patógeno el cual logró entrar a las raíces de la planta de la misma manera que en el testigo sin control, pero a diferencia de este, no alcanzó su máximo desarrollo y en consecuencia fue menos agresivo permitiendo a las plantas mayores promedios en número de vainas y rendimiento, en el tratamiento C21 que en el testigo sin control. Sin embargo y en general para Pupiales los valores de rendimiento en los cuatro tratamientos son relativamente altos lo cual sugiere que el nivel del inóculo natural de *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* pudo ser más bajo que en las otras dos localidades pero a pesar de ello el patógeno logra ingresar a las raíces de las plantas y marcar alta incidencia por

decoloración vascular, sin afectación severa de los haces vasculares, permitiendo a la planta alcanzar niveles aceptables de rendimiento, no obstante la cepa C21 logró destacarse sobre el testigo sin control.

Cozzi y Gasoni (1995), indican que aunque se conocen las interrelaciones de organismos biocontroladores con diferentes hospedantes y patógenos, su aplicación como biofungicidas es inestable y aún no completamente implementada debido en parte a que se requiere la selección de un aislamiento “intrínsecamente antagónico”; así como de su producción y formulación en grandes cantidades y a bajo costo que garantice su supervivencia en el suelo o en la semilla. Pineda y Tortolero (1995) señalan igualmente que el Control Biológico de patógenos con antagonistas potenciales es un proceso a largo plazo que se debe implementar con el manejo habitual del cultivo.

Es conveniente realizar nuevas investigaciones tendientes a lograr que los resultados obtenidos en campo sean reflejo de lo observado en *in vitro* y en invernadero. Para ello sería necesario estudiar nuevas técnicas de aplicación del antagonista que permitan potencializar su eficacia, como la aplicación de materia orgánica, el uso de sustratos para la multiplicación y aplicación del antagonista, lo cual concuerda con lo afirmado por Cupull *et al.* (2010), quienes demostraron que al adicionar materia orgánica se mejoró considerablemente la riqueza nutricional del suelo, incrementando la producción de *Trichoderma* ya que los microorganismos heterótrofos actúan sobre los compuestos orgánicos, transformándolos en compuestos orgánicos simples y sustancias inorgánicas. De igual manera es necesario estudiar las condiciones de humedad y temperatura que permitan un mejor desarrollo de *Trichoderma* para lograr un eficiente control del patógeno Según Chávez (2006) el efecto de la temperatura sobre las especies de *Trichoderma* en el desarrollo de procesos biológicos es de gran importancia influyendo en la germinación de esporas, crecimiento de micelio y tubo germinal, encontrándose la temperatura óptima entre los 15 y 30 °C. El contenido de agua en el suelo es una de las limitaciones más importantes del uso de *Trichoderma*, porque este hongo crece mejor en humedades moderadas que en altas, debido a que la aireación del suelo es limitada cuando el contenido de humedad es alto. El pH del suelo juega un papel importante en la producción de enzimas extracelulares;

en un rango de 2 a 6 con un óptimo de 4. Finalmente la aireación es un factor a tener en cuenta en las especies de *Trichoderma* que como anaerobios facultativos tienen la habilidad para crecer en hábitats como suelos profundos, donde el oxígeno es relativamente insuficiente.

## CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* las cepas C2, C7, C12 Y C21 presentaron alta capacidad antagonica sobre *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*. Medida por crecimiento micelial y halo de inhibición.

En condiciones de invernadero las cepas C12 y C21 con concentraciones de  $10^8$  y  $10^6$  conidias/mL respectivamente, sobresalieron por su comportamiento antagonico frente a *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*.

En Ipiates, Pupiales y Gualmatán hubo una incidencia de *Fusarium oxysporum f. sp. pisi*, medida por enrojecimiento vascular de raíz superior del 76%. En Ipiates ninguna cepa mostrò capacidad antagonica y las plantas no llegaron a producción. En Gualmatán los rendimientos fueron intermedios y las cepas evaluadas no mostraron diferencias con el testigo sin *Trichoderma*.

En el municipio de Pupiales C12 mostrò mayor capacidad antagonica medida por incidencia del patògeno en la raíz respecto al testigo, sin embargo la cepa C21 igualo en antagonismo y supero en rendimiento a la cepa C12.

La capacidad antagonica de los aislamientos de *Trichoderma* observada en condiciones *in vitro* y en invernadero no fue confirmada en los ensayos de campo, siendo necesario atenuar la técnica de inoculación del antagonico para la zona productora de arveja a nivel de agricultor.

## BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G. 2002. Fitopatología. México: Limusa. 850 p.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJORMAN, T. & HARMAN. 1999. Solubilization of Phosphates and Micrinutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. Disponible en [http://www.gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/22506/3/DMG\\_.pdf](http://www.gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/22506/3/DMG_.pdf). Consultado 11 de agosto 2014.

ANIVIES. 1998. Asociación Nacional de Universidades e Intituciones de educacion superior. Avances y perspectivas. Disponible en [www.hemerotecadigital.unam.mx/ANVIES.html](http://www.hemerotecadigital.unam.mx/ANVIES.html). Consultado Julio-Agosto, 2013.

ARGÜELLO, A.; CASTRO, N.; CAPOTE, J. & SOLOMON, M. B. 2007. The influence of artificial rearing and live weight at slaughter on kid carcass characteristics. Journal Advances, 6(1), 20–25.

BARNETT & HUNTER. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. EE. UU. Burgess Publ. Co. 241 p.

BAUTISTA & ACEVEDO. 1994. Antagonismo in vitro de 16 aislamientos de *Trichoderma spp.*, contra *S. cepivorum*. Fitopatologia Venezolana 6:42-68.

BELTRÁN, C. 2006. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn. en papa bajo condiciones de casa de malla. Acta Biológica Colombiana. ;10:1-79.

BUITRAGO, J.; DUARTE, C. Y SARMIENTO, A. 2006. El cultivo de la arveja en Colombia, Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas-FENALCE y Fondo Nacional Cerealista. Ed. Produmedios. Bogotá, Colombia. 102 p.

CUPULL, R.; SANTANA, A.; ORTIZ, A.; SÁNCHEZ, A. 2010. Efecto de *Trichoderma viride* Rifai en el desarrollo de los injertos hipocotiledonares de café.

CARSOLIO, C.; BENHAMOU, N.; HARAN. S.; CORTÉS, C.; GUTIERREZ, ANA.; CHET, I.; & HERRERA, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl Environ Microbiol;65:929-935.

COZZI, J. & GASONI, L. 1995 Producción de Biomasa de *Trichoderma harzianum* en distintos Medios de Cultivo y condiciones. (Resumen). Revista Forestal Venezolana 1 (1): 27.

CRUZ, M. Y CISTERNA, O. 1998. Control integrado de *Phytophthora capsici* en pimiento. I. Efecto de hongos antagonistas sobre el crecimiento de las plantas. Agricultura Técnica 58:s/p.

CHÁVEZ, M. 2006. Produccion de *Trichoderma* sp. y Evaluacion de su Efecto en Cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana Bogota , Colombia.

ELAD, I.; CHET, I. & KATAN, J. 1980. *Trichoderma harzianum* : Un agente de control biológico eficaz contra *Sclerotium rolfisii* y *Rhizoctonia solani* . Fitopatología 70 (2): 119-121.

DANE. 2013. Encuesta Nacional Agropecuaria. Disponible en <http://www.dane.gov.co/index.php/agropecuario-alias/estadisticas-agricolas-y-pecuarias-ena>. Consultado julio 23 2014.

DÍAZ, J. 1994 Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.

DÍAZ, C.; RODRÍGUEZ, R.; AGUAYSOL, C.; JUÁREZ, P.; SALEME, Y L.D. PLOPER. 2012. Relación entre incidencia de *Fusarium verticillioides* y variables de calidad de grano bajo condiciones de almacenamiento de maíz en Tucumán, Argentina.

DURÁN, E.; ROBLES, J.; MARTÍNEZ, & BRITO, M. 2003. *Trichoderma* Un hongo combatiente de patógenos. Revista Técnico Ambiental Teorema Ambiental 42: 23-26.

ELÓSEGUI, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. En: Memorias del Curso Internacional "Producción y uso de Bioplaguicidas en Diferentes Agroecosistemas". INISAV, La Habana, Cuba.

ESPINAL, C.; HUANCA, M.; TERRAZAS, E. y GIMENEZ, T. 2010. Alberto. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD,

frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). *BIOFARBO* [online]. 2010, vol.18, n.1 [citado 2014-09-10], pp. 13-30.

FENALCE. 2007. Especificaciones Técnicas de Semillas. Semillas de Arveja. Arveja Santa Isabel. Disponible en <http://www.finagro.com.co/html/cache/HTML/SIS/Arveja/EspecificacionesTecnicasdesemillas.pdf>. Consultado marzo 13 de 2014.

GARCÍA, R.; RICA, R.; ZAMBRANO, C.; GUTIÉRREZ, L. 2006. Desarrollo de un fungicida biológico con base a una capa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región Andina Venezolana. En memorias del taller Latinoamericano. Biocontrol con *Trichoderma* y otros antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana.

GONZÁLEZ, C.; MARURI, M.; GONZALEZ, A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. Facultad de Ciencias Biologicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana. Revista UDO Agrícola. 45-47 p.

Harman GE. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* 2004;84:377-393.

HARMAN, G.; HOWELL, A.; VITERBO, I.; CHET & M. LORITO. 2004 . *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plantsymbionts. *Nature Rev. Microbiol.*, 2:43-56.

HERNÁNDEZ, N. 2005. Control biologico de *sclerotium rolfsii* sacc, en el Cultivo de cacahuate, con *Trichoderma* spp. Tesis de Maestria, Universidad Autonoma de Guerrero. Unidad Academica de ciencias Agropecuarias y Ambientales. Maestria en Ciencias en Produccion Agricola. Iguala, Guerrero, México. 107p.

HOWELL, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1): 4-10.

LARRALDE, C.; SANTIAGO, M.; SIFUENTES, R.; RODRÍGUEZ, I.; RODRÍGUEZ, P.; SHIRAI, K.; & NARVÁEZ, J. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80: 167-177.

LO, T.; NELSON, E; & HARMAN, G.. 1994. Biological control of Fusarium wilt of greenhouse grown chrysanthemums. Plant Disease 69: 167-169.

LO, T.; NELSON, E.; HAYES, C.; & HARMAN, G. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. Phytopathology 88: 129-136.

MARTÍNEZ, B. & SOLANO, T.1994. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. Protección Vegetal.10:221-225.

MICHEL, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma*spp. (Eufungi:hyphales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). MEXICO: Universidad de Colima.

MICHEL, A.; REYES, A.; OTERO, A.; REBOLLEDO, O.; & LEZMA, R. 2005. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in vitro e invernadero. revista mexicana de Fitopatología 23:248-291.

MUÑOZ, M. 2012. Interacción genotipo ambiente de 20 líneas de arveja arbustiva *Pisum sativum* l. Para cinco municipios de la zona sur del departamento de Nariño. Pasto, Colombia. 34-41 p.

PINEDA, J. & TORTOLERO, O. 1995. Estrategias Para el uso de *Trichoderma* en el control de hongos fitopatógenos en el suelo. Revista Forestal Venezolana 1 (1): 47.

REYNALDI, S.; GÓMEZ, S.; GILCHRIST, E. 1998. Importancia del aislamiento y del rango de concentración de conidias en el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre el crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* L.. Revista Colombiana de Biotecnología, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 118-125, Fecha de acceso: 7 agosto. 2014

ROJAS, A. 2011. Conceptos y Prácticas de Microbiología General. Universidad Nacional Sede Palmira, Colombia. 155 p.

SÁNCHEZ & PEREZ. 2009. Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. Nativos del norte de Tamaulipas. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional, 187 p.

SAÑUDO, B.; ARTEAGA, G.; BETANCOURTH, C.; CORAL, S.; OROZCO, C. 2007. La arveja como opción competitiva en la Region Andina. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto, 92 p.

SOLANO, P. 2004. Control biológico de la escoba de bruja en mango con *Trichoderma* spp. Tesis de licenciatura Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero Centro de Estudios Profesionales. Cocula, Guerrero, México. 82 p.

STEFANOVA, M.; LEIVA, A.; LARRIGANAGA, L.; CORONADO, MF. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía. 16:509-516 p.

TAMAYO, M. 2002. Enfermedades del cultivo de arveja en Colombia: Guia de reconocimiento y control Boletín 14. Corpoica Regional 4. Colombia. 49 p.

THRANE, C.; LÜBECK, M.; DEGEFU, Y.; ALLERUP S., TRANE, U. & FUNCK-JENSEN, D. 1995. Una herramienta para el seguimiento de *Trichoderma harzianum*: . Yo transformación con el gen GUS por la tecnología de protoplastos Fitopatología 85 (11) :1428-1435.

VELEZ, A.; POSADA, F.; MARIN, M.; GONZALES, G.; OSOIO, V. & BUSTILLO, P. 1997. Tecnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatogenos. Boletín técnico CENICAFE. N.17:1-34, Colombia.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; & CHET, I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plantas (*Cucumis sativus* L) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environment Microbiology. Vol. 65 No. 3. P. 1061-1070. En <http://aem.asm.org/content/65/3/1061.abstract>. Consultado mayo 24 de 2013.