

**UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Identificación del agente patógeno del marchitamiento de *Caesalpinia spinosa* “tara” y el efecto antagónico de *Bacillus sp.* y *Trichoderma sp.* Huamanguilla–Ayacucho 2012.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO EN LA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Presentado por el:  
Bach. PEREZ FLORES, Dayvi Giomar

**AYACUCHO – PERÚ  
2016**



A mi madre, guía y motor de mi vida.



## **AGRADECIMIENTO**

A la plana laboral, en general, de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga por haberme acogido y brindado la oportunidad de formarme profesionalmente y desarrollar capacidades y competencias para el éxito personal y profesional.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, principalmente de la Especialidad de Biotecnología, por su dedicada labor y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia durante mi formación profesional.

A la plana laboral de la Municipalidad Distrital de Huamanguilla por apoyar este proyecto en la recolección de muestras.

A mi asesora, Mg. Paula García Godos Alcázar por su preocupación y constante exigencia.



## ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	6
2.3. <i>Caesalpinia spinosa</i> “tara”	7
2.4. Organismos antagonistas	12
2.5. Características del género <i>Bacillus</i>	13
2.6. Características del género <i>Trichoderma</i>	15
2.7. Características del género <i>Fusarium</i> como patógeno de la tara	17
2.8. El marchitamiento vascular progresivo o “seca seca”	18
2.9. Control biológico	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Ubicación de la zona de estudio	21
3.2. Metodología	22
3.2.1. Recolección de muestras	22
3.2.2. Aislamientos de fitopatógenos	22
3.2.3. Identificación de fitopatógenos	23
3.2.4. Pruebas de patogenicidad	24
3.2.5. Aislamiento de <i>Bacillus sp</i> de muestras de suelo	25
3.2.6. Aislamiento de <i>Trichoderma sp</i> de muestras de suelo	25
3.2.7. Evaluación del efecto antagónico	25
3.2.8. Análisis estadístico	26
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	63





## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas aisladas de las diferentes muestras de suelo y plantas colectadas en campo. Noviembre 2012.	27
Tabla 2: Especies identificadas de cepas fúngicas aisladas del suelo y plantas de tara según las claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter (1988), descritas por Carillo L. (2003). Diciembre 2012. <sup>57</sup>	28
Tabla 3: Síntomas características del marchitamiento vascular identificados a partir de las pruebas de patogenicidad mediante postulados de Koch, según lo descrito por Valencia-Botín, 2002. <sup>58</sup>	29



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Resultados de las pruebas antagónicas por contacto directo entre 18 cepas de <i>Bacillus sp.</i> (Antagonistas) frente a <i>Fusarium sp</i> (Patógeno), en diez días de incubación.	30
Figura 2:	Tasa de crecimiento micelial (TC) de <i>Fusarium sp</i> frente a las cinco cepas más efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por contacto directo.	31
Figura 3:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp</i> frente a las cinco cepas más efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por contacto directo.	32
Figura 4:	Resultados de las pruebas antagónicas por cultivos duales entre 18 cepas de <i>Bacillus sp.</i> (Antagonistas) frente a <i>Fusarium sp</i> (Patógeno), en diez días de incubación.	33
Figura 5:	Tasa de crecimiento micelial (TC) de <i>Fusarium sp</i> frente a las cinco cepas más efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por cultivos duales.	34
Figura 6:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp</i> frente a las cinco cepas más efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por cultivos duales.	35
Figura 7:	Comparación de los resultados de las cinco cepas de <i>Bacillus sp</i> más efectivas en dos pruebas antagónicas, por contacto directo y cultivos duales, frente a <i>Fusarium sp.</i>	36
Figura 8:	Efectividad de dos pruebas antagónicas diferentes, por contacto directo y por cultivos duales, entre <i>Bacillus sp</i> frente a <i>Fusarium sp.</i>	37
Figura 9:	Resultados de las pruebas antagónicas por cultivos duales entre dos cepas de <i>Trichoderma sp.</i> (Antagonistas) frente a <i>Fusarium sp</i> (Patógeno), en diez días de incubación.	38
Figura 10:	Tasa de crecimiento micelial (TC) de <i>Fusarium sp</i> frente a dos cepas de <i>Trichoderma sp</i> en prueba antagónica por cultivos duales.	39
Figura 11:	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp</i> frente a dos cepas de <i>Trichoderma sp</i> en prueba antagónica por cultivos duales.	40
Figura 12:	Efectividad del antagonismo entre <i>Bacillus sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> frente a <i>Fusarium sp</i> en diez días de incubación.	41



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Resultados del análisis de varianza unidireccional de las pruebas de antagonismo por contacto directo entre el diámetro de <i>Fusarium sp</i> en cm frente a cepas de <i>Bacillus sp.</i> a los 10 días de incubación con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$	65
Anexo 2.	Resultados de las comparaciones en parejas de Tukey de las variaciones mostradas en las pruebas de antagonismo por contacto directo entre las diferentes cepas de <i>Bacillus sp</i> frente al crecimiento en diámetro de <i>Fusarium sp</i> , con un nivel de confianza de 95%.	66
Anexo 3.	Resultados del análisis de varianza unidireccional de las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre el diámetro de <i>Fusarium sp</i> en cm frente a cepas de <i>Bacillus sp.</i> a los 10 días de incubación con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$	67
Anexo 4.	Resultados de las comparaciones en parejas de Tukey de las variaciones mostradas en las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre las diferentes cepas de <i>Bacillus sp</i> frente al crecimiento en diámetro de <i>Fusarium sp</i> , con un nivel de confianza de 95%.	68
Anexo 5.	Resultados del análisis de varianza unidireccional de las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre el diámetro de <i>Fusarium sp</i> en cm frente a cepas de <i>Trichoderma sp.</i> a los 10 días de incubación con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$	69
Anexo 6.	Resultados de las comparaciones en parejas de Tukey de las variaciones mostradas en las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre las diferentes cepas de <i>Trichoderma sp</i> frente al crecimiento en diámetro de <i>Fusarium sp</i> , con un nivel de confianza de 95%.	70
Anexo 7.	Planta en vivero con evidentes síntomas de marchitez vascular (hojas decoloradas, rojizas, secas y adheridas al tallo).	71
Anexo 8.	Micelios de hongos filamentosos aislados con la técnica de cámara húmeda a partir de trozos de raíz.	72
Anexo 9.	Cepario de hongos fitopatógenos aislados de muestras de plantas y suelo (arriba). Cepario de varias especies de <i>Bacillus sp</i> aislados de muestras de suelo (abajo).	73
Anexo 10.	Placas Petri sembradas con cepas fúngicas mediante el método de Pitt para su identificación según claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter <sup>56</sup> (1988).	74
Anexo 11.	Observación microscópica de macroconidios de <i>Fusarium sp.</i> (arriba). Conidios de <i>Trichoderma sp.</i> obtenidos por Microcultivo (abajo).	75

Anexo 12. Inoculación de la suspensión de esporas de hongos fitopatógenos en plantas de Tara sanas según técnica de Monzón, <sup>61</sup> 2000.	76
Anexo 13. Comparación de una planta de Tara con raíz podrida en la cuarta semana después de la inoculación con <i>Fusarium sp</i> (izquierda) y un testigo (derecha).	77
Anexo 14. Prueba antagónica por contacto directo, <i>Bacillus sp</i> sembrado por diseminación y <i>Fusarium sp</i> en el centro sembrado con sacabocado de 0.5 cm.	78
Anexo 15. Prueba antagónica por cultivo dual, <i>Bacillus sp</i> sembrado por estrías y <i>Fusarium sp</i> sembrado en frente con sacabocado de 0.5 cm.	79
Anexo 16. Prueba antagónica entre <i>Trichoderma sp</i> y <i>Fusarium sp</i> . ambos sembrados por cultivo dual con sacabocado de 0.5 cm.	80
Anexo 17. Curva de crecimiento radial de <i>Fusarium sp</i> frente a las cinco cepas más efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por contacto directo.	81
Anexo 18. Curva de crecimiento radial de <i>Fusarium sp</i> frente a las tres cepas menos efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por contacto directo.	82
Anexo 19. Tasa de crecimiento micelial (TC) de <i>Fusarium sp</i> frente a las tres cepas menos efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por contacto directo.	83
Anexo 20. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium sp</i> frente a las tres cepas menos efectivas de <i>Bacillus sp</i> en prueba antagónica por contacto directo.	84
Anexo 21. Curva de crecimiento radial de <i>Fusarium sp</i> frente a dos cepas de <i>Trichoderma sp</i> en prueba antagónica por cultivos duales.	85
Anexo 22. Comparación de las curvas de crecimiento de <i>Fusarium sp</i> frente a los antagonistas estudiados, <i>Bacillus sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> según la prueba antagónica realizada.	86
Anexo 23. Comparación de la Tasa de crecimiento de <i>Fusarium sp</i> frente a los antagonistas en estudio, <i>Bacillus sp</i> y <i>Trichoderma sp</i> según la prueba antagónica realizada.	87
Anexo 24. Medios de cultivo generales.	88
Anexo 25. Medios comunes para identificación de mohos.	89
Anexo 26. Protocolos de experimentación.	90
Anexo 27. Matriz de consistencia.	92

## RESUMEN

Con el objetivo de identificar al agente patógeno causante de la enfermedad de marchitamiento vascular en los cultivos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y determinar el efecto antagónico de *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* para este patógeno, se realizó la recolección de muestras de plantas de tara enfermas y de suelo de campos de cultivo de la localidad de Huamanguilla; la parte del análisis experimental y pruebas *in-vitro* se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Se aislaron 27 cepas de hongos filamentosos que fueron identificados mediante el método de Pitt basado en las claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter. La etiología de la enfermedad se realizó aplicando los postulados de Koch. Las pruebas de efecto antagónico *in vitro* se realizaron por contacto directo y por enfrentamiento dual en el medio APD con 10 días de incubación, enfrentando a *Fusarium sp* con 2 cepas de *Trichoderma sp* y 18 cepas de *Bacillus sp* como antagonistas, al cabo de los cuales se evaluó la tasa de crecimiento micelial (TC) y el porcentaje de inhibición (% Inhibición). Los resultados obtenidos mostraron que el género causante del marchitamiento vascular progresivo fue *Fusarium sp*. La evaluación del efecto antagónico por contacto directo mostró que las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 y TBa 18 de *Bacillus sp* tuvieron mayor efecto antagónico ( $p < 0.05$ ), alcanzando 91.11%, 88.89%, 92.22%, 93.33%, y 91.11% de %inhibición respectivamente. Las pruebas antagónicas por cultivos duales mostraron que las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 11 y TBa 18 tuvieron mayor efecto antagónico sobre el resto de cepas evaluadas ( $p < 0.05$ ), alcanzando 92.22%, 91.11%, 90.00% y 91.11% de %inhibición respectivamente. Las cepas de *Trichoderma sp*, alcanzaron 77.78% de inhibición y 74.44% para *Trichoderma viridae*. Por lo anterior, la destrucción micelial y el grado de inhibición mostrados, hicieron que *Bacillus sp* sea considerado como el mejor antagonista para *Fusarium sp* en condiciones de laboratorio.

**Palabras clave:** marchitamiento vascular, efecto antagónico, *Bacillus sp*, *Trichoderma sp*, *Fusarium sp*.





## I. INTRODUCCIÓN

La especie *Caesalpinia spinosa* "tara" es una especie forestal que viene adquiriendo una demanda creciente por sus múltiples usos, ya sea medicinal, alimenticio e industrial; productora de taninos y de la que se obtienen tintes con fines comerciales.<sup>1</sup>

El avance en las investigaciones sobre el comportamiento de la dinámica biológica de plagas y su interacción con el medio ambiente ha sido determinante para el desarrollo de métodos de control que de mayor énfasis al manejo sostenible del predio agrícola a través del control integrado de las plagas. Las plagas presentes en la *Caesalpineia spinosa* aún no son significativas, pero con el incremento de las áreas de cultivo, que se están estableciendo progresivamente determinará un entorno, para que la plaga sea más nociva, por tanto es muy importante conocer las características de cada una de las plagas para poder prevenir y contrarrestar los daños al cultivo, una diagnosis correcta de las enfermedades es el componente básico para desarrollar una estrategia, manejo y control.<sup>2</sup>

Una de las enfermedades que está empezando a diseminarse es el marchitamiento vascular progresivo. El marchitamiento de las plantas de tara es la principal enfermedad en vivero y con menor incidencia en plantaciones en campo. En vivero, la incidencia y *severidad* puede ser alta, en dependencia del origen y calidad de sustrato utilizado y humedad del suelo. En plantación en campo, las plantas infectadas pueden llegar a marchitarse completamente a los dos años de su plantación. Las enfermedades de la planta son causadas por hongos, los cuales se encuentran diseminados en el suelo, por esta razón, el manejo y control es complejo.<sup>3</sup>

El agente causal posible, observados a partir de raíces de plantas afectadas, podrían ser los hongos del género *Fusarium spp*, aunque, también puede estar involucrado hongos del género *Verticillium spp*.<sup>3</sup>

Es por esta razón que es necesario buscar alternativas en el uso de organismos antagonistas, los cuales pueden reducir el nivel de daño de las enfermedades en la tara, como también ayudar a disminuir el uso de fungicidas sintéticos y otros.<sup>1</sup>

La investigación se centra en la identificación del principal agente patógeno de la enfermedad de marchitamiento progresivo (“seca seca”) de la planta de tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Distrito de Huamanguilla, Provincia de Huanta, Región de Ayacucho; y la posterior evaluación del efecto antagónico de *Bacillus sp.* y *Trichoderma sp.* frente al hongo patógeno causante de dicha enfermedad.

Para este efecto, se han trazado los siguientes objetivos

**Objetivo General:**

Identificar el agente causante de la enfermedad de marchitamiento vascular progresivo de la tara en el Distrito de Huamanguilla, Provincia de Huanta y evaluar el efecto antagónico de cepas de *Bacillus sp.* y *Trichoderma sp* frente al patógeno de la tara.

**Objetivos Específicos:**

- a. Aislar e identificar el agente causante de la enfermedad de marchitamiento vascular progresivo en plantas de tara del Distrito de Huamanguilla.
- b. Comparar el efecto antagónico entre *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* frente al patógeno de la tara.
- c. Aislar e identificar bacterias del género *Bacillus* de suelos de cultivo de tara del Distrito de Huamanguilla.
- d. Aislar e identificar hongos del género *Trichoderma* de suelos de cultivo de tara del Distrito de Huamanguilla.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1. Antecedentes

Coca<sup>3</sup> en 2009, realizó una serie de investigaciones sobre enfermedades de la tara y señala que las enfermedades causadas por hongos, protistas, bacterias, virus y nemátodos son causa de grandes pérdidas, en cultivos anuales, forestales, frutales y ornamentales. De todos estos microorganismos fitopatógenos, los hongos, son los de mayor importancia. Estas pérdidas resultan ser de mayor impacto porque involucran la ecología y el medio ambiente. Este efecto en cadena de las enfermedades, gradualmente, en el largo plazo, deteriora la sostenibilidad de la producción. En la tara, algunas enfermedades están afectando su cultivo y pueden llegar a ser “destructivas” y otras alcanzan a mantenerse como enfermedades “crónicas”, pero, potenciales.

Avendaño, *et al.*<sup>4</sup> en 2008, señaló que la economía rural del departamento de Ayacucho se basa en la actividad agropecuaria de 581 comunidades campesinas que producen cerca de 50% de los diez principales alimentos básicos (papa, maíz, trigo, cebada, haba, arveja, oca, olluco, quinua y kiwicha), que constituyen la base de la seguridad alimentaria de la población involucrada; mientras que, el aprovechamiento de los recursos forestales y otros recursos potenciales en esta parte del país, es aún muy deficiente, por la escasa y limitada asistencia técnica apropiada.

Durante los últimos cinco años, según Avendaño, *et al.*<sup>4</sup> en 2008, IDESI Ayacucho ha promovido la organización de productores en Comités con el fin de propagar plantones de tara, fortalecer capacidades y facilitar la articulación al mercado. En la actualidad existen 42 organizaciones entre Comités y Asociaciones con 800 productores de tara aproximadamente.<sup>4</sup>

Según Agrios<sup>5</sup> en 2002, el crecimiento y el rendimiento de las plantas dependen de la disponibilidad del agua y de los nutrientes del suelo donde se desarrollen y

del mantenimiento, dentro de ciertos límites, de algunos factores del ambiente como la temperatura, la luz y la humedad. Dependen también de la protección que tengan contra el ataque de parásitos, plagas y enfermedades. Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los fitopatógenos. Aunque no hay pruebas de que las plantas sufran dolores o molestias, el desarrollo de sus enfermedades sigue las mismas etapas y es, por lo común, tan complejo como el desarrollo de las enfermedades en los animales y el hombre.

Cadenas<sup>6</sup>, en 2007, señala que los fitopatógenos difieren en base al tipo de planta que atacan, a los órganos y a los tejidos que infectan y a la edad del mismo órgano de una misma planta sobre la que puedan desarrollarse. Algunos patógenos son específicos para una especie de plantas, otras para cierto género, para una familia; mientras que otras tienen un rango más amplio de hospedantes, que incluyen plantas de diversos grupos taxonómicos. Existen patógenos que sólo desarrollan en tallos, otros principalmente en hojas, frutos carnosos, etc. Otros son patógenos vasculares o de raíces y sólo son específicos en estos tejidos. Las investigaciones de Contreras, *et al.*<sup>7</sup> en 2010, han determinado que la enfermedad de marchitamiento vascular o “seca seca” afecta principalmente a estos dos últimos órganos mencionados según lo señalado en el módulo 4 de la cartilla para productores de tara de la región Ayacucho elaborado en 2010 por OPD Solid, IDESI y Productos del país S.A., además menciona que esta enfermedad es producida por una diversidad de hongos que habitan los suelos agrícolas, sin ahondar más en su investigación.

En una serie de publicaciones fitopatológicas publicadas por la Universidad Mayor de San Simón<sup>3</sup> - Bolivia en 2009, señalan que el agente causal posible de esta enfermedad, observados a partir de raíces de plantas afectadas, podrían ser los hongos del género *Fusarium sp*, aunque, también puede estar involucrado hongos del género *Verticillium sp*.

Ciampi y Silva<sup>8</sup>, 1991, en su publicación: Perspectivas para el control biológico de *Botrytis cinérea* en frambueso; señalaron que el manejo convencional de estos problemas fitosanitarios por parte de los agricultores se basa en la aplicación de químicos, generando deterioro en los suelos y disminución en la calidad del producto agrícola. Razón por la cual en los últimos años las investigaciones están encaminadas a plantear sistemas de control de fitopatógenos, usando biocontroladores como alternativa para mantener el

equilibrio en los ecosistemas agrícolas. La utilización de microorganismos saprófitos, especialmente seleccionados, pertenecientes a la flora de los suelos agrícolas para controlar fitopatógenos, representa una importante herramienta y una alternativa de control biológico.

Martin y Travers<sup>9</sup> en 1989 y Meadows, *et al.*<sup>10</sup> en 1992, señalaron en sus investigaciones que entre los microorganismos más utilizados para el control de fitopatógenos fúngicos se encuentra el género *Bacillus* spp; por otro lado, Bernal, *et al.*<sup>11</sup> en 2002, en su trabajo “Aislamiento y purificación parcial de un metabolito de una cepa mutante de *Bacillus* sp.” determinó que este género tienen la facilidad de digerir la quitina, además de la producción de antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina, entre otros.

Además están los hongos del género *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. Según lo señalado por Fernández-Larrea<sup>12</sup> en 2001, el efecto principal de *Trichoderma* es por hiperparasitismo, aunque algunas especies y cepas pueden producir metabolitos bioactivos que incrementan su acción. Además algunos aislamientos controlan Nemátodos.

Fernandez<sup>13</sup> en 2001, señaló en su publicación: Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario, que *Fusarium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* son los más utilizados para el control de un grupo importante de patógenos del suelo.

Las potencialidades del género *Bacillus* sobre *P.fluorescens* han sido señaladas por Kim *et al.*<sup>14</sup> (1997), en su trabajo: *Bacillus* sp. L324-92 para el control biológico de tres enfermedades de trigo en cultivos reducidos, quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

Larralde<sup>15</sup> en 1996, demostró que la tendencia de crecimiento de los hongos filamentosos se realiza de forma lineal y su tasa de crecimiento con tendencia parabólica, esto lo señala en su trabajo: Cinética de crecimiento de hongos filamentosos, Morfometría de los micelios de *A. niger* y *G. fujihmi* y su posible utilización en la predicción de la tasa específica de crecimiento.

Corrales, *et al.*<sup>16</sup> en 2010. Concluye que el género *Bacillus* es potencialmente un microorganismo que le brinda protección a la planta y funcionalmente podría considerarse un controlador biológico porque produce sustancias antibióticas, solubilizador de fosfato porque facilita a la planta la disponibilidad de nutrientes o

porque ejerce funciones como sideróforo, esto lo señaló en su trabajo de investigación titulado: Efecto biocontrolador de *Bacillus spp* frente a *Fusarium sp* bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris L.*).

Hernández, *et al.*<sup>17</sup> en 2008 realizó un estudio sobre el comportamiento de *Trichoderma spp* frente a hongos fitopatógenos en plantas de piña; donde determinó que los niveles de antagonismo y competencia por parte de las especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium subglutinans* en general fueron inferiores a la inhibición que alcanzaron los otros fitopatógenos a prueba, sin embargo de forma particular *T. atroviride* y *T.harzianum* se distinguieron significativamente de los restantes.

Por otro lado, Bonilla<sup>18</sup> en 1990, señaló que aislados de *T. harzianun* alcanzaron valores hasta de 84 % y en pruebas realizadas in vitro con diferentes especies de *Trichoderma* se pudo observar la capacidad de hiperparasitismo que muestran *T. viride* y *T. harzianun* sobre *F. subglutinans*, donde se observó que las hifas de *Trichoderma* entran en contacto íntimo con las del fitopatógeno.

## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. Control biológico**

El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.<sup>19</sup>

### **2.2.2. Antagonismo**

Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida o disminución de la actividad metabólica o la muerte de uno de ellos.<sup>20</sup>

### **2.2.3. Fitopatología**

Es la ciencia del diagnóstico y control de las enfermedades de las plantas. Cubre el estudio de los agentes infecciosos que atacan plantas y desórdenes abióticos o enfermedades fisiológicas, pero no incluye el estudio de daños causados por herbívoros como insectos o mamíferos.<sup>6</sup>

### **2.2.4. *Bacillus sp.***

Género de bacterias en forma de bastón y Gram positivas. El género *Bacillus* pertenece a la división *Firmicutes* Son aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que no deforma la estructura de la célula.<sup>21</sup>

### **2.2.5. *Trichoderma sp.***

Género de hongo muy común del suelo, también se encuentra en troncos caídos y estiércol, pertenece a la subdivisión *Deuteromycete*. Es utilizado en la agricultura como agente de control biológico debido a sus propiedades como biopesticida, biofertilizante y bioestimulante.<sup>22</sup>

### **2.2.6. *Fusarium sp.***

Extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprófitas aunque algunas pueden ser fitopatógenos de cultivos importantes. Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa.<sup>22</sup>

### **2.2.7. *Caesalpinia spinosa***

Comúnmente conocida como *tara*, es una leguminosa de porte arbóreo o arbustivo natural del Perú y se distribuyen en Chile y norte de América del sur. Esta especie es cultivada como fuente de taninos. *Caesalpinia spinosa* se encuentra en la familia de las *Caesalpinaceae*.<sup>23</sup>

### **2.2.8. Marchitez**

Estado de las plantas que se caracteriza por la flaccidez de sus tejidos. Puede ocurrir por causas biológicas (infección con patógenos) o por causas ambientales.<sup>24</sup>

### **2.2.9. Marchitamiento progresivo (seca seca)**

También conocida en otros lugares como marchitamiento vascular o fusariosis, es una enfermedad fitopatológica cuyo agente causal son hongos del género *Fusarium* y se caracteriza por generar marchitamiento progresivo en ramas y tallos, pudrición de la raíz y muerte de la planta afectada.<sup>24</sup>

## **2.3. Características de *Caesalpinia spinosa* “tara”**

El género *Caesalpinia*, pertenece a la familia *Caesalpinaceae*, de distribución pantropical en bosques, sabanas y semidesiertos, e incluye alrededor de 150 especies, de las que 40 están presentes en Sudamérica.<sup>23</sup> Hoy en día se aceptan dos subgéneros: subg. *Caesalpinia* con especies en América, África y Asia, caracterizado por un fruto no alado, y subg. *Mezoneuron*, con especies exclusivamente distribuidas en Europa y con frutos alados.

La tara es un arbusto o árbol siempre verde, con espinas en el tallo y ramas, de 3 a 8 m de altura, y es conocido por otros nombres vernaculares como: tara,

tanino, taya o caranca.<sup>25</sup> El tronco redondo, espinoso y a veces torcido de *C. spinosa* posee una corteza gris y se ramifica ampliamente en ejes foliosos y espinosos. En varios casos los ejes se ramifican desde cerca de la base del tronco, produciendo la impresión de que son varios troncos. Las hojas son verde oscuras, lisas o laxamente espinosas y de hasta 10 cm de largo; son bipinnaticompuestas paripinnadas, con 2 a 5 pares de foliolos, los que poseen 5 a 8 pares de foliolulos opuestos, elípticos u ovados, de 1,4 a 4,5 cm de largo y 1 a 2,5 cm de ancho. Los foliolulos tienen nerviación reticulada, con el envés pubescente o no, y el ápice obtuso hasta emarginado. Las flores se disponen en racimos terminales multifloros, finamente pubescentes y algo espinosos, de 15 a 20 cm de largo. Las flores, de 9 a 15 mm de largo, tienen un pedúnculo de 5 mm de largo, finamente pubescente. El cáliz es pentámero, asimétrico, con sépalos fusionados en la base, de hasta 6 mm de largo, con el sépalo ventral más grande, en forma de canoa y con dientes conspicuos en el ápice. Los pétalos son rojo-amarillentos, que con 8 a 9 mm de largo, son menos del doble del largo del cáliz y casi tan largos como los 10 estambres, que son amarillos. Sólo en raras ocasiones los estambres sobrepasan la corola.<sup>26-23</sup> El fruto es rojizo-café claro, plano, y con frecuencia finamente pubescente; es una legumbre coriácea indehiscente, de 6 a 10 cm de largo y 1 a 2,5 cm de ancho; en la madurez posee 4 a 8 semillas redondas y negras.<sup>27-28</sup>

Aparte de *C. spinosa*, se reconoce la presencia de otras seis especies en Perú: *C. ancashiana* (Ulibarri), *C. cassioides* (Willd), *C. decapetala* (Roth), *C. glabrata* (Kunth), *C. pulcherrima* (L.) y *C. trichocarpa* (Griseb).<sup>29-23</sup> Las especies son, sin embargo, diferenciables con la ayuda de algunos caracteres, como largo de la flor, grado de división de la hoja y la naturaleza de tronco y ramas, donde, por ejemplo, sólo el tronco y ramas de *C. spinosa* son conspicuamente espinosas.

### **2.3.1. Distribución**

En Perú, *C. spinosa* está distribuida a lo largo de toda la costa, desde Piura hasta Tacna, y en la sierra en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho Cajamarca, Cusco, Huánuco, Huancavelica, Junín y Pasco.<sup>30</sup> En la vertiente occidental de los Andes se encuentra en las laderas andinas, valles y orilla de ríos, desde el nivel del mar hasta los 3.000 msnm.<sup>31</sup> Climáticamente, el área de distribución se extiende desde templado cálido seco hasta tropical muy seco y bosque tropical húmedo.<sup>27</sup> *Caesalpinia spinosa* es cultivada sobre todo en



los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Ancash y Huánuco, desde 1.000 a 2.900 msnm.<sup>31</sup>

### **2.3.2. Ecología y posibles áreas de cultivo**

*C. spinosa* crece naturalmente en territorios semiáridos, con una precipitación media anual de 230 a 500 mm y temperaturas medias anuales de 14,7 a 27,5°C. Es muy utilizada como cerco vivo o como árbol de sombra (para animales domésticos) en cultivos de secano, e incluso como árbol ornamental.<sup>26-31-23</sup> La edad media que alcanza la tara es de 60 años, pero puede llegar hasta 100 años.

Los principales productores de tara en el Perú son los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huánuco y Lambayeque.<sup>32</sup>

### **2.3.3. Cultivo y Explotación**

La producción nacional se ha ido incrementando desde 4 mil toneladas en 1998 hasta 25 500 toneladas que se alcanza en el 2006, año que se registra la máxima producción. Para este periodo se alcanza un total de más de 125 mil toneladas. Los departamentos que alcanzan mayor producción, en este mismo período, son Cajamarca con más de 51 mil toneladas, la Libertad con 25 mil toneladas, Ayacucho con 14 mil toneladas y Huánuco con 10 mil toneladas. La tara es colectada en áreas naturales y en cultivos. Las poblaciones naturales están frecuentemente restringidas a grupos semi domesticados y hay generalmente algo de tala en poblaciones naturales.<sup>7</sup>

En Ayacucho, la tara desarrolla a una altitud de 2,000 a 3,200 m.s.n.m., en una extensión de 810 hectáreas (35% nuevas instalaciones, 22% producción natural manejado y 43% producción natural sin manejo), con rendimiento promedio de 24.44 Kg/planta/año (10-60 Kg/planta/año), contenido de tanino mayor a 65% y una empresa (Productos del País S.A) que compra y procesa tara en polvo y goma.<sup>4</sup>

Para el cultivo de tara, los suelos silíceos o arenosos (pH típicamente 6,8 a 7,1) son los más aptos, como ocurre en Ayacucho, pero también en Ancash (Cordillera Negra) y en otros lugares.<sup>20</sup> Los mejores desarrollos se verifican en suelos profundos.<sup>33</sup>

Excepto en estado de plántula, hay pocas enfermedades serias, con excepción de algunos insectos, que atacan las semillas maduras.<sup>26</sup> Se indica que las principales plagas de la tara son los pulgones, el salivazo (insecto), la polilla, la

rata y la hormiga. En investigaciones sobre el manejo de bosques naturales de tara en Cajamarca se presentaron mayormente problemas con plantas parásitas, pulgones y el hongo *Oidium*.<sup>32</sup> Estas plagas se trataron mediante control biológico, mayormente con mezclas de biol (abono orgánico líquido) y azufre (además de detergente de ropa).

#### **2.3.4. ¿Por qué invertir en la producción e investigación de la tara?**

Es un cultivo que el 97% de la producción mundial proviene de los bosques naturales y algunas áreas sembradas principalmente en el Perú. Además la producción se da casi todo el año, es un cultivo que con manejo intensivo entra en producción a los dos años y medio, pero que la cosecha comercialmente se da al cuarto año, también se caracteriza por tener los mayores niveles de taninos, que otros cultivos sucedáneos, además de que los costos de las plagas y enfermedades no son aún poco significativas por no existir grandes áreas de manejo intensivo, hace que este cultivo sea una buena alternativa de inversión a mediano plazo. Esta planta nativa del Perú es uno de los cultivos más sorprendentes por el uso intensivo de sus derivados en varios campos de la industria mundial.<sup>4</sup>

#### **2.3.5. Usos industriales y comerciales de la tara**

Cáscara del fruto (vaina), es allí donde se concentra los mayores niveles de taninos, tradicionalmente se presentaban niveles de hasta 62%. El tanino, es definido como compuesto orgánico polihidroxifenólico o ésteres de un azúcar (comúnmente glucosa), con un variable de ácidos fenólicos que por lo general es el ácido gálico o el ácido elágico. Se utiliza en curtiembre, tintorería, medicina, en la fabricación de plásticos y adhesivo, fabricación de resinas, protección de metales, mantenimiento de pozos petrolíferos, conservación de aparejos de pesca, clarificador de vinos y cervezas, sustituto de la malta, cosmetología, componente de las pinturas, antioxidante en la industria del aceite y manufactura de papel.<sup>4</sup>

En la semilla de la tara, porcentualmente en peso presenta: germen, goma y cascara 26-37%, 24-34%, 28-39% respectivamente. La goma o hidrocoloide son biopolímeros, es decir moléculas de polisacáridos asociada con cationes metálicos que pueden ser de calcio, potasio o magnesio. La goma de tara se usa en la industria alimentaria y farmacéutica.<sup>4</sup>

### 2.3.6. Fitopatología de la tara

Las enfermedades más frecuentes son las fungosas ocasionadas frecuentemente por fumagina, oidium y la chupadera (en almácigos).<sup>3</sup>

- Chupadera fungosa, es causado por *Rhizoctonia solani*, origina las pudriciones de la raíz y de la corona de las plántulas; retarda su crecimiento, produce un marchitamiento y en el cuello de la plántula se observa, lesiones hundidas de color marrón rojizo o grisáceo ; todo esto trae como consecuencia el tumbado de la plántula y su posterior muerte.<sup>3</sup>
- Oidum, es causado por *Erysiphe poligoni*, se desarrolla en los racimos de taras, en las hojas; el síntoma se presenta en forma de ceniza blanca cubriendo parte o totalmente las vainas y las hojas, en vainas no permitiendo que alcancen su tamaño y peso normal. Esta enfermedad se queda en el fruto hasta el momento de la cosecha.<sup>3</sup>
- Fumagina, es causado por *Capnodium sp.*, es el ennegrecimiento de los brotes tiernos, flores o frutos; no permitiendo el desarrollo de los brotes, estos se mueren o se caen, o no cuajan los racimos de flores en desarrollo, como también en las hojas sus funciones fotosintéticas se ven disminuidas, trayendo consigo que estas hojas se sequen.<sup>3</sup>

Por otro lado y en menor frecuencia, están las enfermedades virósicas, en la tara no se han evidenciado la presencia de nemátodos en el suelo que causen daño a las raíces o tallos.<sup>2</sup>

También existen plantas y criptógamas parásitas, las cuales se observan en árboles de mayor edad. Las epífitas, que conviven con la tara y que mayormente no hacen daño. En cambio, las cúscutas, parásitas cubren la superficie por donde respira la planta y la ahogan hasta matarla.<sup>2</sup>

### 2.3.7. Biotecnología en la tara

Es un aspecto fundamental que se está desarrollando con el objetivo de dar solución a los problemas de campo, como es la alta variabilidad generada por la segregación genética y a las variantes del medio ambiente. Se ha observado en las diferentes zonas productoras variaciones en el número de vainas, contenido de metabolitos (taninos y goma), así como en la forma de la planta, vigorosidad y tolerancia a enfermedades, etc.<sup>4</sup>

## 2.4. Organismos antagonistas

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales.<sup>34</sup>

Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros, *Pseudomonas* y *Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*.<sup>34</sup>

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas.<sup>12</sup>

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.<sup>12</sup>

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción.<sup>12</sup>

La competencia constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia.<sup>12</sup>

La competencia más común es por nutrimentos, oxígeno o espacio. *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de poscosecha típicamente dependientes de los nutrimentos, como hongos necrotróficos sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Esos nutrimentos se encuentran en las

heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos.<sup>12</sup>

La competencia por espacio es otro tipo de interacción antagónica muy eficaz. Las levaduras y mohos son eficaces colonizadoras de la superficie de plantas y se destaca la producción de materiales extracelulares (especialmente polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por otros microorganismos.<sup>12</sup>

Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo.<sup>12</sup> El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ 1,3-glucanasas y proteasas, que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los cuales tiene un rol importante el parasitismo. Los hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos.

Las bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens* y las del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces.<sup>35</sup>

Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizósfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Las potencialidades del género *Bacillus* sobre *P. fluorescens* han sido señaladas por Kim *et al.*<sup>14</sup> (1997), quienes encontraron mayor emergencia y control de patógenos del trigo cuando utilizaron este género.

## **2.5. Características del género *Bacillus***

Los bacilos en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos y productores de catalasa. Pueden ser Gram positivos o Gram negativos, en general producen endosporas.<sup>21</sup>

Los miembros del grupo *Bacillus* son fáciles de aislar de la tierra y el aire y se encuentran dentro de los organismos más frecuentes que aparecen cuando se

siembran en placas e incuban en forma aeróbica, las colonias que se desarrollan son casi exclusivamente las de *Bacillus*.<sup>21</sup>

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimioheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2 a 1,0  $\mu\text{m}$  y un rango de temperatura de crecimiento entre 15 a 55 °C. Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos.<sup>22</sup>

Las bacterias del género *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Dada la diversidad genética en este grupo, tanto en el suelo como en la rizósfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces.<sup>12</sup>

Este género de microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.<sup>36</sup>

Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.<sup>12</sup>

**2.5.1. Modo de acción:** Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo el empleo de estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones, muchos bacilos, además, producen antibióticos y son ejemplos de estos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina; los cuales debilitan la pared celular de las hifas de los hongos y le producen la muerte.<sup>21</sup> Friddaman y Rossal<sup>37</sup> (1994), observaron vacuolización y deformación de las hifas de *R. solani* y *P. ultimum* provocadas por la formación de un compuesto volátil con propiedades fungicidas.

Las Iturinas producidas por *Bacillus*, tienen una acción destacada como antifúngico contra una variedad de levaduras y hongos. El mecanismo mediante el cual provoca la muerte de las células blanco, está relacionado con la capacidad de Iturina de interactuar en forma directa, sobre los lípidos de la membrana celular. Parámetros importantes que parecen determinar la acción de Iturina sobre la membrana celular, incluyen la composición de esteroles y/o de fosfolípidos de esta, la concentración de Iturina y su capacidad de autoasociación. Experiencias en bicapas lipídicas demuestran que, a concentraciones muy bajas de Iturinas A, induce la formación de poros voltaje-independiente, que se caracterizan por ser anión selectivo y de tamaños variables. Esto apoya la idea de un modelo en que las moléculas de Iturina, primero penetran la capa lipídica y después de una difusión lateral, se autoasocia y/o se asocia con lípidos formando estructuras conductantes (poros) a través de la membrana.<sup>37</sup>

## **2.6. Características del género *Trichoderma***

*Trichoderma* es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycetes y al orden Moniliales (clasificación asexual), entre las especies más destacadas de este género están *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, y *T. hamatum*. El género *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en varios tipos de suelos agrícolas y otros tipos de medios. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras áreas económicas.<sup>38</sup>

Este hongo crece y se ramifica en hifas que pueden medir entre 3 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, según las condiciones del sitio en donde se esté reproduciendo. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares de color verde, generalmente tienen 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Como mecanismo de acción, *Trichoderma* al ser aplicado a las raíces forma una capa protectora, haciendo una simbiosis: el hongo se alimenta de los exudados de las raíces y las raíces son protegidas por el hongo; al mismo tiempo, reduce o elimina las fuentes de alimento del patógeno, y actúa como una barrera para prevenir la entrada de patógenos a las raíces.<sup>38</sup>

Las especies de *Trichoderma* que frecuentemente se utilizan para el biocontrol, son las especies *T. harzianum* y *T. viride*, de las cuales la primera es la que ha sido más estudiada.

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros.

**2.6.1. Modo de acción:** Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen enzimas hidrolíticas y metabolitos antifúngicos volátiles y no volátiles que impiden colonización por microorganismos antagonizados; entre estos metabolitos, la producción de ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, peptaiboles, antibióticos, 6-pentyl pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperonas, ácido heptédico a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa.<sup>39</sup>

*Trichoderma sp* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped. El proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas. Comienza por el crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma* hacia el hospedador, estimulado por moléculas procedentes del mismo, de naturaleza desconocida. Las únicas que se han detectado hasta ahora son aminoácidos y azúcares, por lo que no cabe esperar que la inducción sea específica del hospedador. Los hongos del género *Trichoderma* se adhieren con carbohidratos unidos a lectinas en la pared celular del patógeno. Una vez *Trichoderma* es adherido se enrosca alrededor del patógeno y forma el apresorio. El paso siguiente consiste de la producción de CWDE's, peptaiboles y enzimas hidrolíticas CWDE's, lo cual facilita la entrada de la hifa de *Trichoderma* dentro del lumen del hongo parasitado y la asimilación del contenido de la pared celular.<sup>39</sup>

La competencia por el espacio y los nutrimentos es más favorable, principalmente para los hongos que se desarrollan en la superficie de las hojas antes de efectuar la penetración, no actuando sobre aquellos que penetran



rápidamente; un ejemplo claro de este mecanismo de acción se encuentra representado en *Trichoderma*, donde la toma de hierro es esencial para la viabilidad del mismo bajo condiciones de deficiencias de hierro, el hongo excreta agentes quelantes específicos de bajo peso molecular llamados sideroforos, que le permiten tomar el hierro en forma reducida. En algunos casos *Trichoderma* actúa sobre algunos patógenos debido a su capacidad de colonizar rápidamente el follaje; también puede colonizar extensivamente una superficie foliar intacta.<sup>12</sup>

## **2.7. Características del género *Fusarium* como patógeno de la tara**

*Fusarium* es el principal agente patógeno relacionado con este tipo de enfermedades, aunque en algunos casos también pueden relacionarse hongos del género *Verticillium*.<sup>3</sup>

*Fusarium sp.*, es un patógeno que puede catalogarse como universal. Este es un hongo típico de suelo, que en zonas cálidas y húmedas causa marchitamiento de follaje. Las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad son: suelos moderadamente ácidos, sueltos y arenosos; temperaturas moderadas a elevadas (15 °C a mas) y humedad suficiente. La sintomatología general observada se debe a que el hongo penetra por las raíces y se localiza en los vasos leñosos de éstas y del tallo, impidiendo o dificultando la ascensión y circulación de la savia, produciendo el pardeamiento del tejido leñoso.<sup>5</sup>

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de *Fusarium*. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodocios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie.<sup>40</sup>

La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium* pero varios géneros de Coelomycetes también la tienen. A su vez unas pocas especies de *Fusarium* presentan conidios pluriseptados sin esa célula basal y se las llama mesoconidios.<sup>41</sup>

Las colonias de los distintos fusarios que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un filtro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es

limoso. Hay fusarios con pionotos de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH.<sup>41</sup>

Las especies *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides* y *F. tricinctum* se encuentran en cereales, *F. nygamai*, *F. subglutinans* y *F. verticilloides* en maíz, *F. thapsinum* y *F. chlamydosporum* en sorgo, mientras que *F. nygamai* y *F. fujikuroi* se hallan en arroz. En legumbres se observan *F. chlamydosporum* y *F. tumidum*, y en papa *F. solani*. Las especies *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum* y *F. solani* se encuentran en diversos sustratos.<sup>42-43</sup>

## **2.8. El marchitamiento vascular progresivo o “seca seca”**

Los fitopatógenos son importantes para el hombre debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Los marchitamientos vasculares son enfermedades destructivas producidas por diversos agentes etiológicos y se encuentran ampliamente distribuidos en poblaciones y cultivos de un sin número de especies de plantas.<sup>5</sup>

Independientemente del agente etiológico que lo genere o de la planta afectada, los marchitamientos presentan un grupo común de síntomas; en principio, las hojas pierden su turgencia, se debilitan y adquieren una tonalidad que va de verde claro a amarillo verdoso o rojizo, decaen y finalmente se marchitan, luego se necrosan y mueren; estas hojas pueden enrollarse o permanecer extendidas.<sup>24</sup>

Esta sintomatología va progresando hacia la parte superior de la planta a veces sólo toma un sector de la misma, es decir generalmente se vuelve una enfermedad unilateral. Al comienzo las plantas muestran marchitez en las horas más calurosas del día recuperándose al final del mismo pero finalmente se marchitan y mueren. En los estadios finales, las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón.<sup>5-44</sup>

El tallo cortado transversalmente, presenta muerte y deshilachamiento de sus tejidos, sin afectarse la médula; este es un aspecto muy importante para diagnosticar la enfermedad y distinguirla de otras enfermedades vasculares.<sup>5</sup>

El marchitamiento de las plantas de la *Caesalpinia spinosa* “tara” es la principal enfermedad en vivero y en plantación en campo, aunque, con menor incidencia. En vivero, la incidencia y severidad puede ser alta, en dependencia del origen y calidad de sustrato utilizado y humedad del suelo. Los síntomas característicos,

en este caso, se presentan como decoloración de los folíolos y marchitamiento de la planta. Sin embargo, el amarillamiento es el síntoma inicial, que se observa en las hojas basales y generalmente pasa desapercibido; gradualmente, estas hojas se marchitan y las hojas superiores van tomando un color rojizo hasta que los folíolos van cayendo. Cuando la planta tiene los síntomas descritos, estos son fácilmente extraíbles de la bolsa de enraizamiento, debido a que el sistema radicular se encuentra completamente descompuesto y destruido.<sup>3</sup>

En campo, las plantas infectadas pueden llegar a marchitarse lentamente, comienzan por algunas ramas, hasta quedar completamente secas, las plantas jóvenes presentan síntomas característicos de amarillamiento y una muerte gradual.<sup>3</sup>

Las enfermedades del suelo son causadas por hongos, los cuales se encuentran diseminados en el suelo, por esta razón, el manejo y control es complejo.<sup>3</sup> El agente causal en la tara en el Distrito de Huamanguilla, no está plenamente identificado, sin embargo, algunos estudios han mostrado a partir de raíces de plantas afectadas dos hongos que podrían ser los responsables de dicha enfermedad, uno de los cuales son los del género *Fusarium sp*, asociado principalmente a este tipo de enfermedades, pero también podría estar involucrado hongos del género *Verticillium sp*.<sup>3</sup>

## **2.9. Control biológico**

El control biológico de enfermedades en plantas o insectos con agentes microbianos es una posibilidad atractiva, si se tiene en cuenta que los costos respecto al uso de otras prácticas de control tradicionales pueden resultar menores y de mayor eficiencia, pues, aunque los antagonistas pueden actuar en forma más lenta y en menor escala, su acción puede ser más estable y duradera que el control químico.<sup>39</sup>

El conocimiento concerniente al comportamiento de algunos microorganismos como antagonistas es esencial para su efectivo uso, debido a que pueden actuar contra organismos blanco de varias formas constituyéndose en una alternativa biológica al empleo de compuestos químicos convencionales, considerados nocivos para el medio ambiente.<sup>45</sup>

En el control biológico, se debe reducir la densidad del inóculo o la virulencia del patógeno ya sea en su estado activo o latente, realizarlo con uno o más organismos en forma natural o mediante el manejo de las condiciones ambientales del hospedero o de los organismos antagonistas y/o la introducción

masiva de uno o más de estos últimos. Por lo expuesto, los componentes principales del control biológico son el patógeno, los antagonistas y el hospedero.<sup>46</sup>

Mediante el uso de hongos y bacterias antagonistas se han podido conocer estrategias con mayor potencial para el control de enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo.<sup>47</sup> Por otra parte, sobreviven durante periodos relativamente largos como formas de resistencia, haciendo innecesaria la reinfección continua con el agente biocontrolador.<sup>48</sup>

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación de la zona de estudio

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Para las pruebas de patogenicidad en condiciones controladas, se utilizó las instalaciones del vivero del Área académica de Biotecnología.

Las muestras de suelo, raíz y plantas de *Caesalpinia spinosa* se tomaron de campos de cultivo del Centro Poblado de Yanapampa del Distrito de Huamanguilla.

#### Ubicación Política:

Zona de estudio: Campos de cultivo  
Centro Poblado: Yanapampa  
Distrito: Huamanguilla  
Provincia: Huanta  
Región: Ayacucho.

#### Ubicación Geográfica:

Latitud: 13° 1' 4" S  
Longitud: 74° 11' 51" W  
Altitud: 2990 m.s.n.m.

#### Características de la zona de muestreo

Los campos de cultivo eran mixtos, las plantas de tara fueron cultivadas combinándolos con maíz o haba en extensiones de hasta uno o dos hectáreas. El riego se da por arrastre con aguas estancadas de reservorios abiertos.

### **3.2. Metodología**

#### **3.2.1. Recolección de muestras, descrito por Huamán,<sup>49</sup> 2010.**

##### **a. Muestras de la planta**

- Se identificaron las plantas de *Caesalpinia spinosa* afectadas por el marchitamiento vascular (seca seca), tanto en campos de cultivo como en viveros.
- Se recolectaron partes aéreas y radicales de 15 plantas infectadas (hojas, tallos, raíz) de diferentes campos de cultivo.
- Las partes aéreas como hojas y tallos se recolectaron con la ayuda de una tijera desinfectada, el tamaño de las muestras no fueron mayores a 10 cm.
- Las partes radicales se recolectaron con ayuda de un pico esterilizado desenterrando las plantas completamente y evitando dañar la raíz.
- Los plantines infectados de viveros se tomaron en su totalidad.
- Todas las muestras se colocaron en bolsas de polietileno individuales, herméticamente selladas y rotuladas adecuadamente evitando mezclarlas bajo ninguna circunstancia.

##### **b. Muestras de suelo**

- Las muestras de suelo se recolectaron de las partes circundantes de la zona radicular de las plantas de tara infectadas.
- Se tomaron aproximadamente 50 g de tierra y se transportaron en bolsas de polietileno color negro.
- Las muestras se señalaron con datos e información correspondientes a la fecha y hora de muestreo, localidad y tipo de muestra.

#### **3.2.2. Aislamiento de fitopatógenos, descrito por French y Herbert,<sup>50</sup> 1980.**

##### **a. A partir de trozos vegetales (raíz, tallo y hojas)**

- Se desinfectaron previamente con hipoclorito de sodio (5%) y alcohol en una placa Petri por 20 min, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.
- Parte de los trozos vegetales desinfectados se sembraron en placas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) y se incubaron por 5 días a 25 °C.
- La otra parte se sembró en cámaras húmedas esterilizadas que se incubaron a temperatura ambiente con alternancia de luz y oscuridad durante 10 días.

**b. A partir de muestras de suelo**

- Se realizó por diluciones sucesivas hasta  $10^{-3}$  en agua peptonada al 0.1% y sembradas luego por incorporación 5 mL de la última dilución en placas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD), luego se incubaron a 25 °C por 5 días.
- Luego del tiempo de incubación se seleccionaron las colonias con características macroscópicas distintas y se repicaron en frascos viales con medio APD y que conformaron el cepario fúngico.

**3.2.3. Identificación de fitopatógenos, desarrollado por Fox,<sup>51</sup> 1993.**

**a. Método de Pitt, descrito por Pitt y Klich,<sup>52-53</sup> 1988; Pitt y Hocking,<sup>54</sup> 1997.**

- Cada cepa del cepario fúngico se sembró por puntura en tres puntos equidistantes para cada placa Petri con medios Malta-Glucosa, Czapek-Levadura y Czapek-Glicerol.
- Las placas Petri se incubaron a 25°C durante 7 días y algunas hasta 14 ó 21 días para afianzar su crecimiento.
- En algunas cepas, por indicación del método en mención, fue necesario además sembrar dos placas Petri con medio Czapek que se incubaron a 5 y 37°C, respectivamente, durante 7 días.

**b. Técnica de Microcultivo, descrito por Dade y Gunnell,<sup>55</sup> 1969.**

- Se depositó un cuadrado del medio APD estéril sobre un portaobjetos previamente flameado y frío.
- Se sembró el hongo por puntura en los bordes del cuadrado de APD.
- Sobre el cuadrado de APD se colocó un cubreobjetos previamente flameado y enfriado.
- Se apoyó el conjunto sobre dos varillas de vidrio, dentro de una placa de Petri estéril en cuyo fondo se colocó un papel absorbente embebido en agua. Se incubó a temperatura ambiente con alternancia de luz solar indirecta y oscuridad durante 10 días.

**c. Identificación propiamente dicha**

- Para este fin se emplearon colonias de 7 días de incubación.
- Se realizó usando las claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter<sup>56</sup> (1988), descritas por Carrillo<sup>57</sup> (2003), de acuerdo con los criterios de morfología y color de colonia, picnidios, arreglo de las células conidiogénicas, tipo de conidiogénesis y largo y ancho de conidios.

### 3.2.4. Pruebas de patogenicidad

- Mediante los Postulados de Koch, siguiendo lo descrito por Valencia-Botín<sup>58</sup> (2002).
- Se prepararon suspensiones de esporas de cada cepa sembradas en tubos de ensayo con medio APD que se incubaron por 10 días a 25 °C y luego se cosecharon las esporas con solución de agua peptonada al 0.1%.<sup>59</sup>
- El inóculo se preparó a partir de 5 mL de la suspensión de esporas vertidos en un matraz con 150 mL de Caldo Papa Dextrosa (CPD), se incubó a 25 °C en agitación y aireación constante por 5 días.<sup>59</sup>
- Los especímenes de experimentación fueron plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) conservadas en vivero.
- Todos los especímenes del ensayo se trasplantaron a macetas de plástico nuevas con tierra estéril y se pusieron en cuarentena por 4 semanas en un vivero cerrado, garantizando las condiciones adecuadas de humedad, luz, temperatura y nutrientes óptimos para el desarrollo normal de las plantas.
- Se realizaron recuentos de esporas del inóculo preparado a partir de la suspensión, fijándolo en una concentración de 10<sup>4</sup> esporas por mL de inóculo, según la técnica descrita por Mujica *et al.*<sup>60</sup> 2008.
- Para la inoculación se utilizó 50 mL del inóculo, se realizó por contacto directo mediante lesión de la epidermis, corteza, endodermis y parte de la médula de la raíz y el tallo por un tiempo aproximado de 5 minutos; además se roseó con el inóculo parte del suelo circundante a los pelos radicales de la planta.<sup>61</sup>
- Las evaluaciones de los especímenes se realizaron diariamente hasta evidenciar los signos y síntomas característicos de la enfermedad de marchitamiento vascular, descartando aquellos que no cumplieron con dichas sintomatologías.
- Las plantas que mostraron los signos y síntomas del marchitamiento progresivo se llevaron al laboratorio para el reaislamiento y la recuperación del patógeno inicialmente inoculado,<sup>62</sup> esto mediante el cultivo de trozos vegetales y cámara húmeda descritas anteriormente.
- Una vez realizada la identificación microscópica del patógeno, se procedió con las pruebas de antagonismo con cepas de *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* aisladas de los mismos campos de cultivo.



### 3.2.5. Aislamiento de *Bacillus sp* de muestras de suelo

- Las cepas de *Bacillus sp* se obtuvieron a partir de muestras de suelo de las partes circundantes de la zona radicular de las plantas de tara.
- De cada muestra se realizaron diluciones sucesivas hasta  $10^{-3}$  en agua peptonada al 0.1%, se tomó 1 mL de la última dilución y se sembró por incorporación en Agar Nutritivo.
- Se incubaron a 37 °C por 24 horas hasta observar el desarrollo de las colonias con morfología característica del género (forma estrellada o circular, borde entero, elevación convexa, superficie rugosa, color blanquecino).
- Se realizó la caracterización microscópica de las colonias mediante tinción Gram y se procedió a realizar el cepario. Todo según las especificaciones de la técnica descrita por Mujica *et al.*<sup>60</sup> 2008.

### 3.2.6. Aislamiento de *Trichoderma sp* de muestras de suelo

- Se realizó con la misma metodología de aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos descritos anteriormente por Carrillo,<sup>57</sup> 2003.

### 3.2.7. Evaluación del efecto antagónico

- a. Por contacto directo: propuesta por Mitidieri,<sup>63</sup> 1988.
- La cepa de *Fusarium sp* se cultivó por puntura en el centro de una placa Petri con medio APD, se incubó por 10 días a 25 °C hasta cubrir toda la placa con los micelios del hongo, estas placas sirvieron para tomar muestras del fitopatógeno con un sacabocado.
  - Se prepararon cultivos en suspensión de cada cepa de *Bacillus sp* en caldo nutritivo, se incubaron durante 48 h.
  - La concentración celular bacteriana se ajustó por diluciones sucesivas a  $10^8$  bacterias/mL aproximadamente, contadas en cámara de Neubauer, previamente coloreadas con azul de lactofenol.
  - Se sembró por diseminación 0.25 mL de esta suspensión diluida en una placa con medio APD.
  - Con un sacabocado de 0.5 cm se retiró una porción del micelio del hongo fitopatógeno del borde de la placa y se colocó boca abajo sobre el centro de la placa sembrada con *Bacillus sp*.
  - Se incubaron a 25 °C por 10 días evaluando cada 24 h el crecimiento del diámetro del hongo.

- Para cada cepa antagónica se realizó la prueba por triplicado.
- b. Por cultivos duales: propuesta y modificada por Acosta *et al.*<sup>64</sup> 2007.
- Se colocó en un extremo de la placa Petri un disco de 0.5 cm de diámetro del hongo fitopatígeno tomado con un sacabocado.
- En la misma placa a 2.5 cm de separación se sembró frente a frente el antagonista bacteriano mediante estrías.
- Las placas se incubaron a 25 °C durante 10 días y se evaluó cada 24 h el crecimiento del diámetro del hongo.
- Para el control de ambas pruebas, se hizo crecer en una placa con medio PDA el hongo fitopatígeno en las mismas condiciones pero sin antagonista hasta obtener un crecimiento del micelio que llegó a cubrir toda la placa en 10 días de incubación y que fue el tiempo de evaluación de las pruebas antagónicas.
- Los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron la tasa de crecimiento micelial y el porcentaje de inhibición.
- La tasa de crecimiento micelial se dio en centímetros por día, se determinó teniendo en cuenta el radio de crecimiento de la colonia fúngica calculando su magnitud mediante la expresión sugerida por Mead.<sup>65</sup> Donde Cf y Ci resultó el diámetro final e inicial del fitopatígeno en el ensayo, Tf y Ti el diámetro final e inicial en el testigo.

$$T.C = (Cf - Ci) / (Tf - Ti)$$

- El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó empleando la fórmula de Samaniego y colaboradores, citado por Acosta y Avellaned.<sup>64</sup> Donde R1 fue el crecimiento radial del testigo y R2 el crecimiento radial del fitopatígeno en tratamiento.

$$\% \text{ inhibición} = ((R1 - R2) / R1) * 100$$

### 3.2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las pruebas antagónicas se evaluaron mediante un Análisis de Varianza de una vía con un nivel de confianza del 95% para determinar la existencia de significancia del enfrentamiento directo entre las cepas antagónicas de *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* y las del hongo patógeno y aplicando luego la prueba de Tukey a los resultados que presentaron diferencias significativas.

#### IV. RESULTADOS

**Tabla 1: Cepas de hongos y bacterias aisladas de las diferentes muestras de suelo y plantas de tara colectadas en campo.**

CEPAS AISLADAS	PLANTAS		SUELO	
	TALLO/HOJAS	RAÍZ	SUPERFICIAL	PROFUNDO
HONGOS	M1P2	M1R1	M1S-S1	M1S-P1
	M1P3	M1R2	M2S-S1	M2S-P1
	M2P1	M2R1		M3S-P1
	M2P2	M2R2		M3S-P2
	M2P3			
	M2P4			
	M2P5			
	M3P1			
	M4P1			
	M5P1			
	M5P2			
	M5P3			
	M5P4			
	M5P5			
	M6P1			
	M6P2			
	M6P3			
	BACTERIAS			TBa 1
			TBa 2	TBa 10
			TBa 3	TBa 11
			TBa 4	TBa 12
			TBa 5	TBa 13
			TBa 6	TBa 14
			TBa 7	TBa 15
			TBa 8	TBa 16
				TBa 17
			TBa 18	

Tabla 2: Especies identificadas de cepas fúngicas aisladas de suelos y plantas de tara según las claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter (1988), descritas por Carillo L.<sup>57</sup> (2003).

CEPAS	ESPECIE
M1P1	<i>Alternaria sp.</i>
M1P2	<i>Alternaria sp.</i>
M2P3	<i>Alternaria sp.</i>
M4P1	<i>Alternaria sp.</i>
M2P2	<i>Alternaria sp.</i>
M2P1	<i>Alternaria sp.</i>
M5P1	<i>Alternaria sp.</i>
M5P2	<i>Alternaria sp.</i>
M5P3	<i>Alternaria sp.</i>
M5P4	<i>Alternaria sp.</i>
M6P2	<i>Alternaria sp.</i>
M6P3	<i>Alternaria sp.</i>
M5P5	<i>Alternaria sp.</i>
M1P3	<i>Chrisosporium sp.</i>
M2P4	<i>Chrisosporium sp.</i>
M2P5	<i>Trichothecium sp.</i>
M3P1	<i>Verticillium sp.</i>
M6P1	<i>Epicoccum sp.</i>
M1R1	<i>Fusarium sp.</i>
M1R2	<i>Fusarium sp.</i>
M2R1	<i>Trichoderma sp.</i>
M2S-S1	<i>Trichoderma sp.</i>
M2R2	<i>Trichoderma sp.</i>
M1S-S1	<i>Mucor sp.</i>
M1S-P1	<i>Mucor sp.</i>
M2S-P1	<i>Rhizopus sp.</i>
M3S-P1	<i>Penicillium sp.</i>
M3S-P2	<i>Penicillium sp.</i>

**Tabla 3: Síntomas característicos del marchitamiento vascular identificados a partir de las pruebas de patogenicidad mediante postulados de Koch, según lo descrito por Valencia-Botín,<sup>58</sup> 2002.**

SÍNTOMAS DEL MARCHITAMIENTO VASCULAR PROGRESIVO	CEPAS FÚNGICAS									
	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Chrisosporium sp.</i>	<i>Trichothecium sp.</i>	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
Flacidez foliar	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Hojas amarillentas	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Hojas rojizas	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Hojas y ramas secas adheridas a la planta	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Hojas enrolladas y/o extendidas (secas)	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Haces vasculares del tallo color marrón	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Tallo muertos con médula intacta	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sistema radicular descompuesto	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

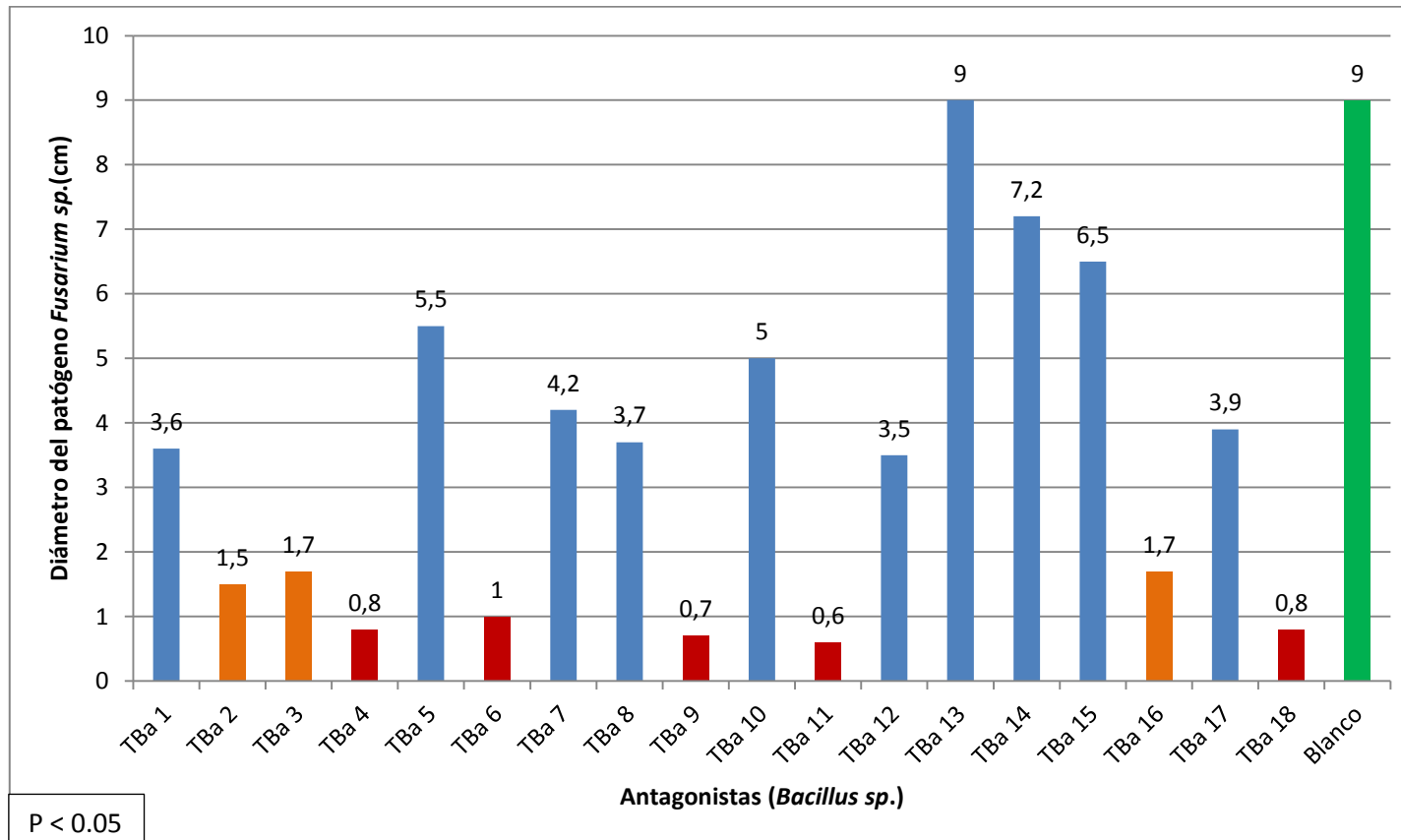


Figura 1: Resultados de las pruebas antagónicas por contacto directo entre 18 cepas de *Bacillus sp.* (Antagonistas) frente a *Fusarium sp.* (Patógeno), en diez días de incubación.

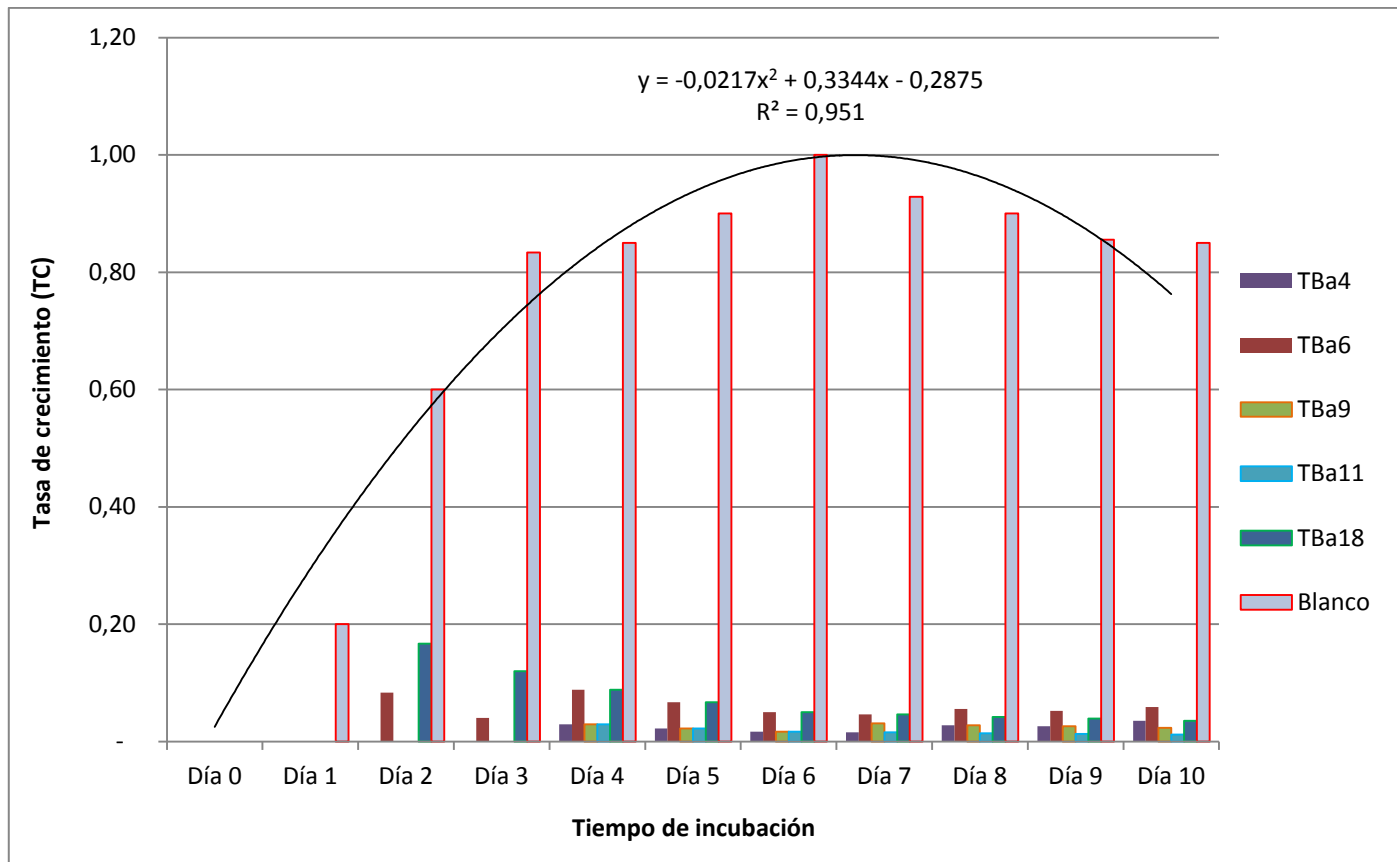


Figura 2: Tasa de crecimiento micelial (TC) de *Fusarium sp* frente a las cinco cepas más efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagónica por contacto directo.

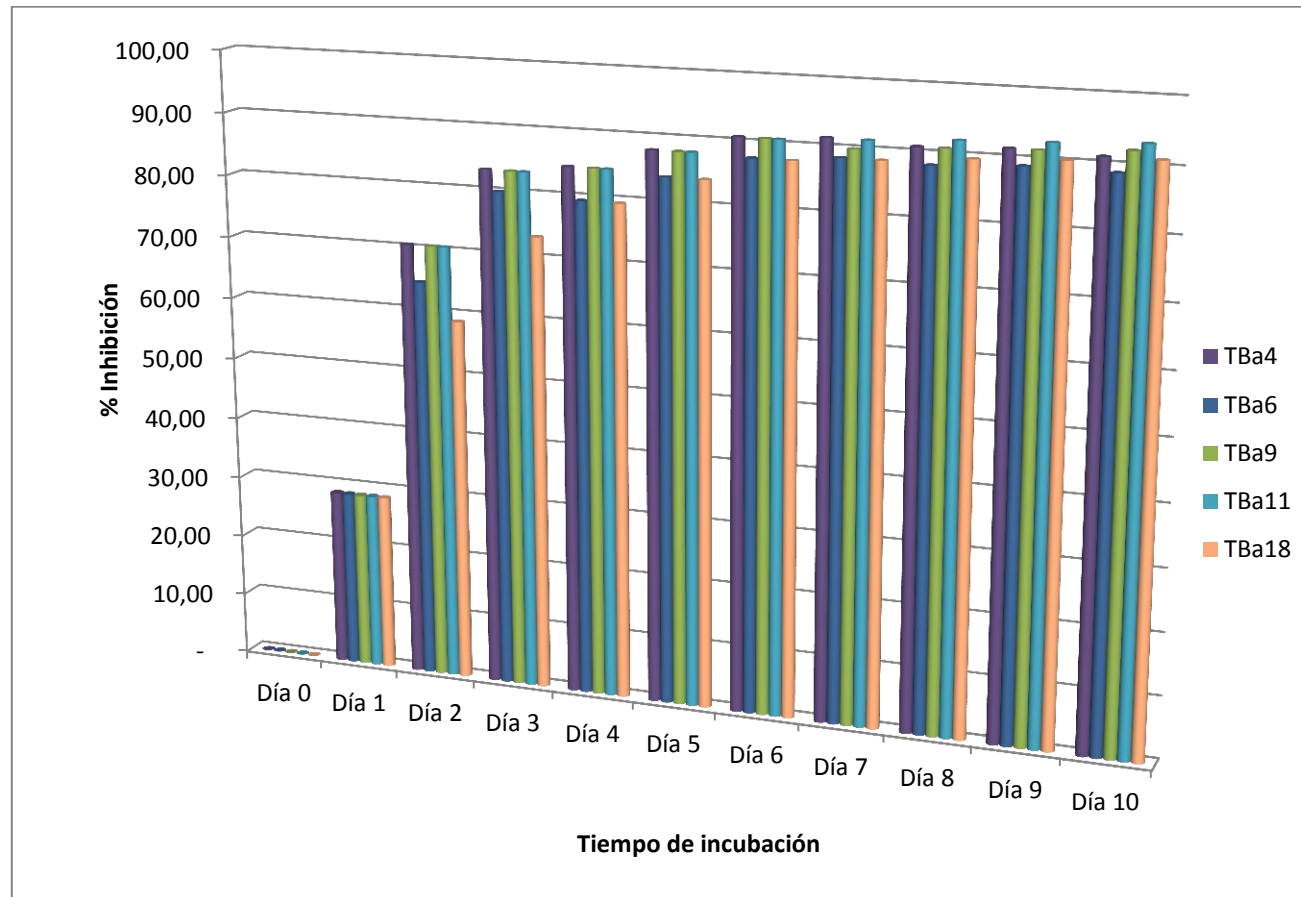


Figura 3: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp* frente a las cinco cepas más efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagonica por contacto directo.



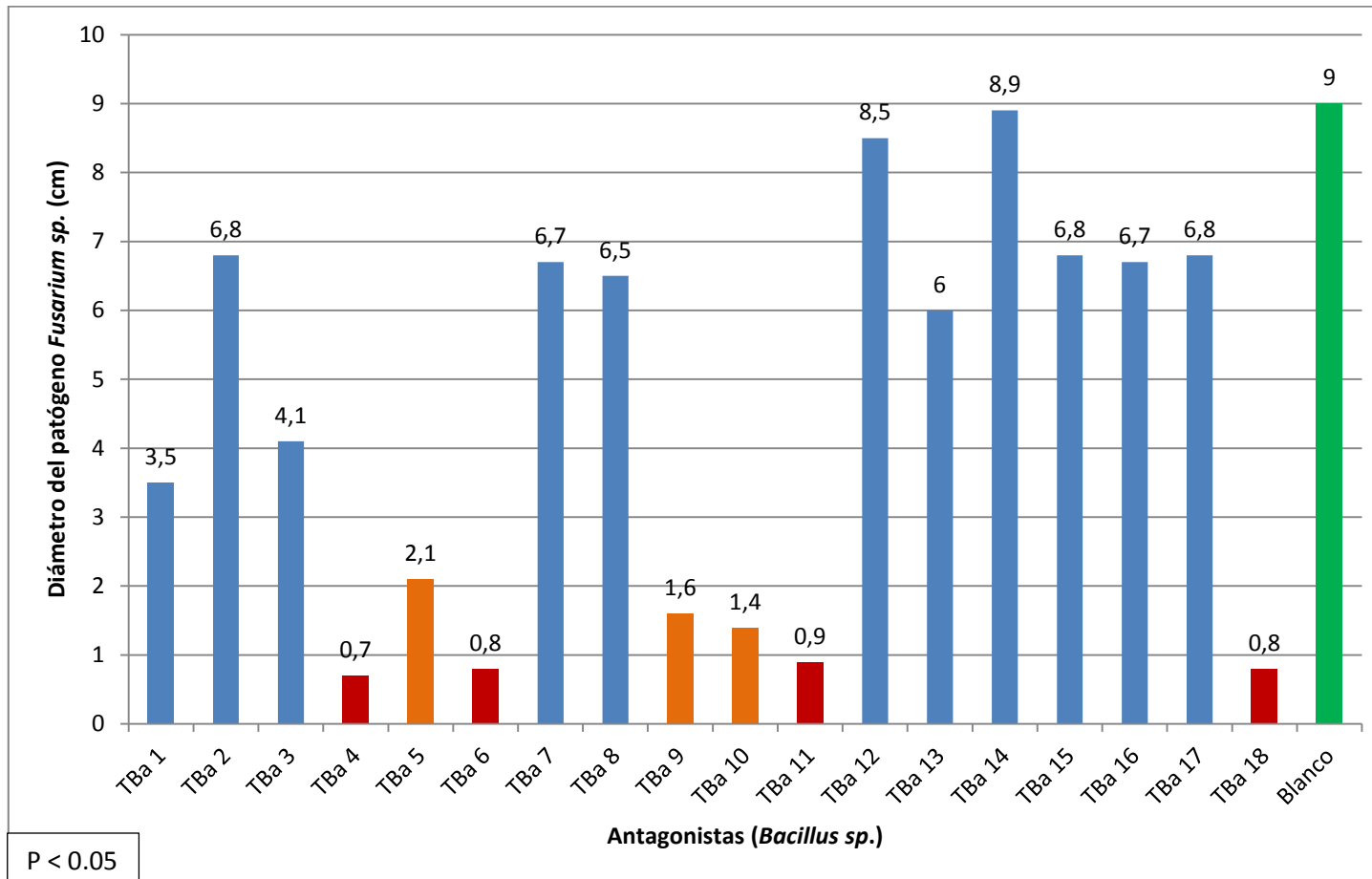


Figura 4: Resultados de las pruebas antagónicas por cultivos duales entre 18 cepas de *Bacillus sp.* (Antagonistas) frente a *Fusarium sp* (Patógeno), en diez días de incubación.

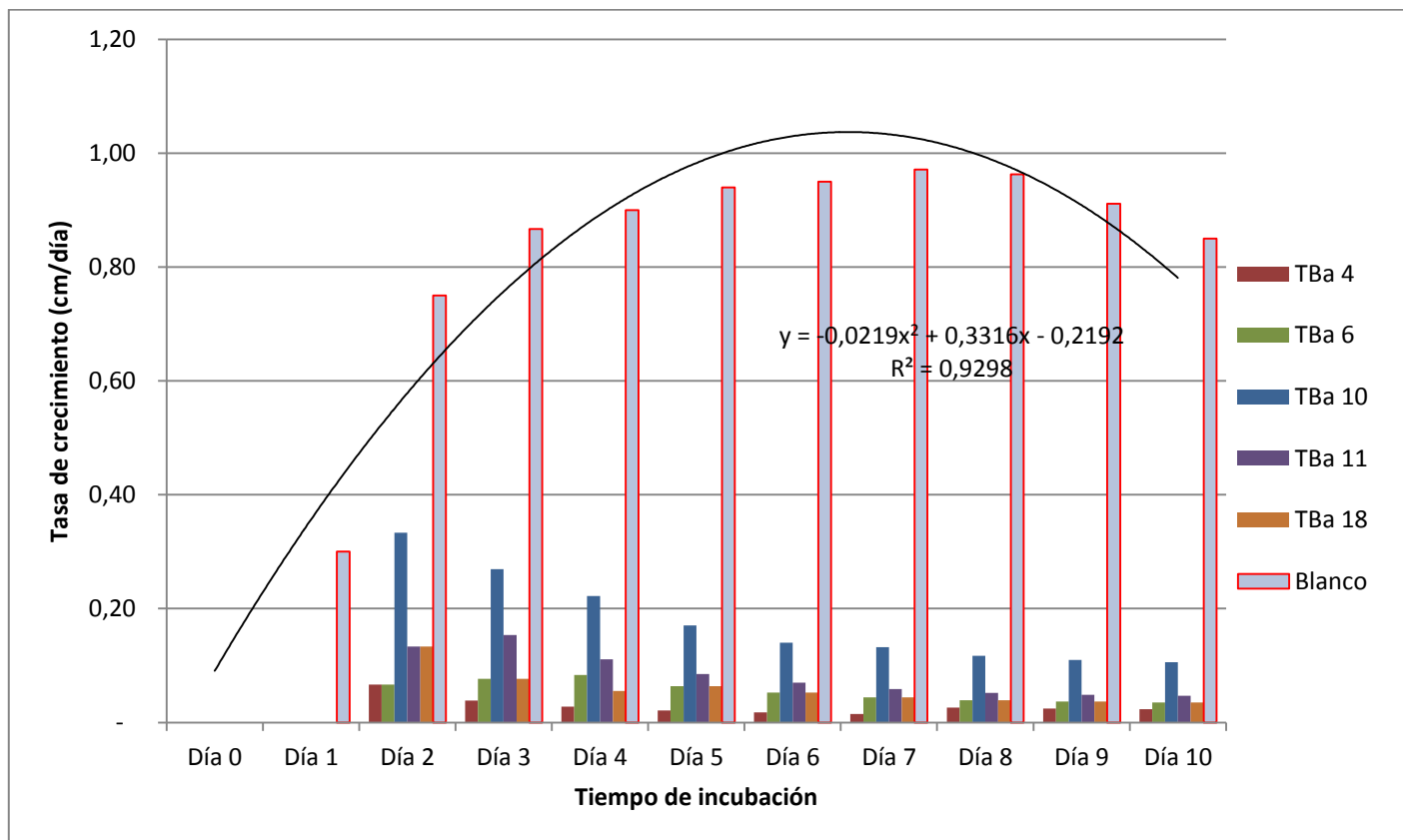


Figura 5: Tasa de crecimiento micelial (TC) de *Fusarium sp* frente a las cinco cepas más efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagónica por cultivos duales.

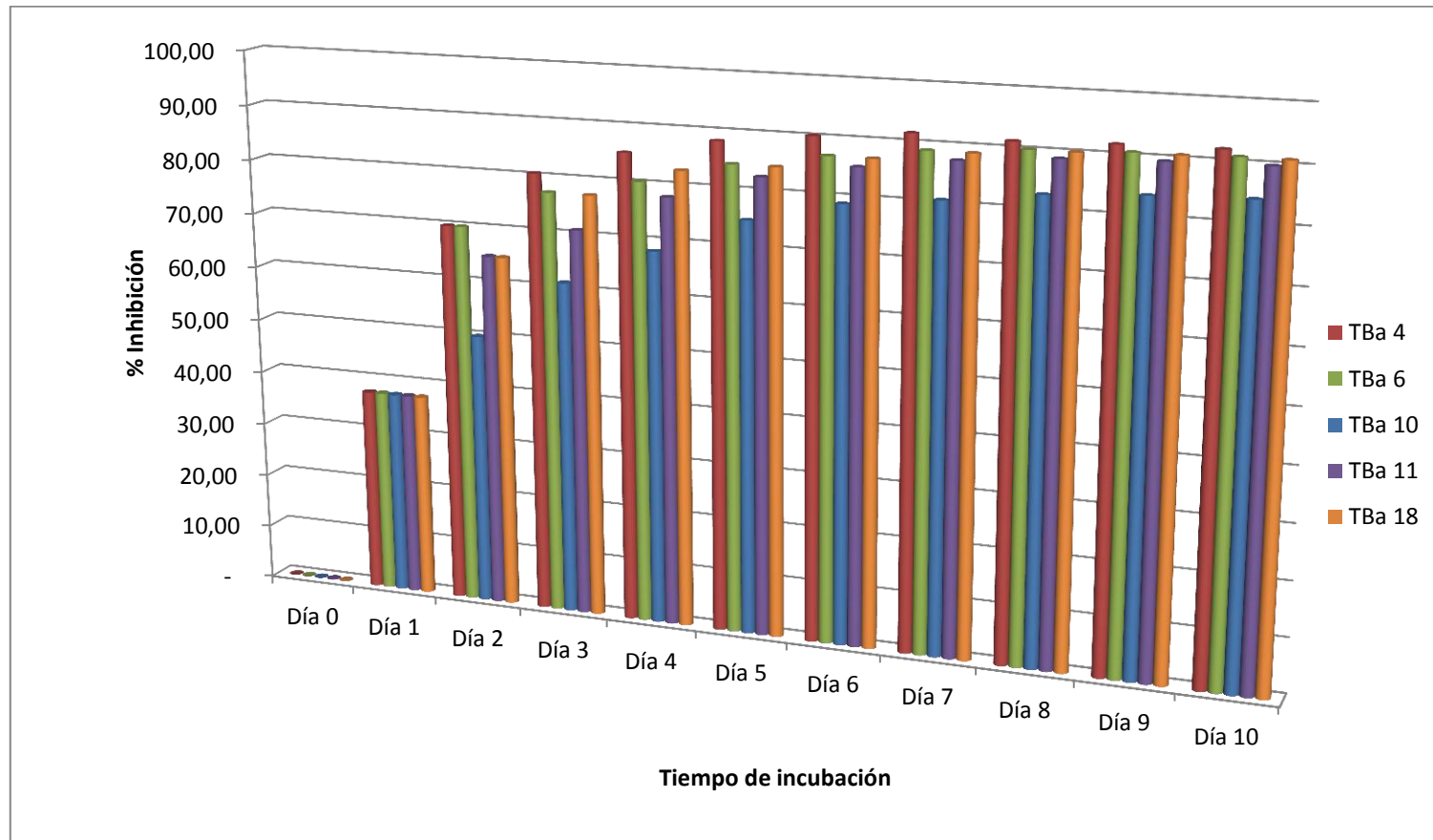


Figura 6: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp* frente a las cinco cepas más efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagonista por cultivos duales.

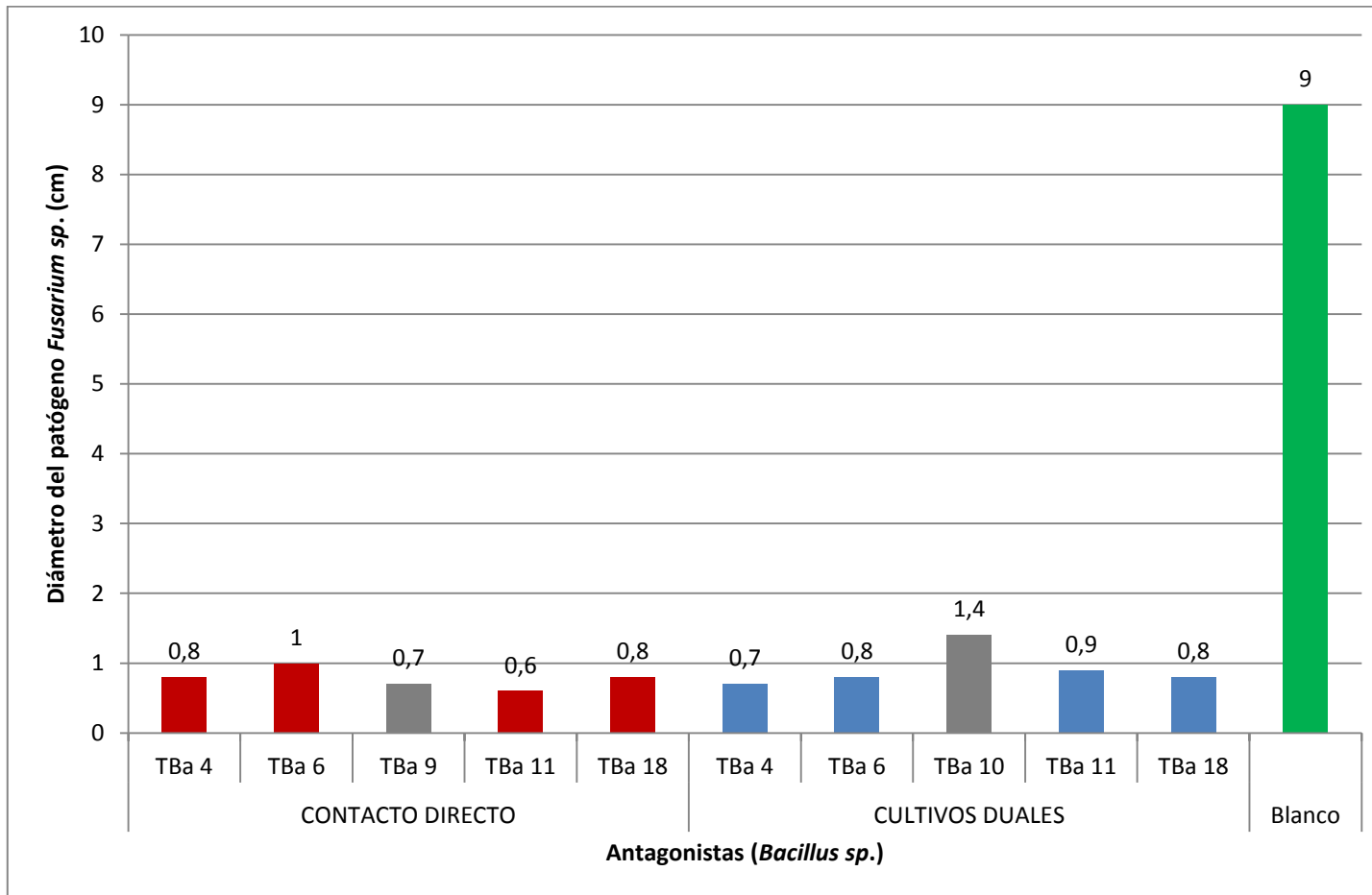


Figura 7: Comparación de los resultados de las cinco cepas de *Bacillus sp.* más efectivas en dos pruebas antagónicas, por contacto directo y cultivos duales, frente a *Fusarium sp.*

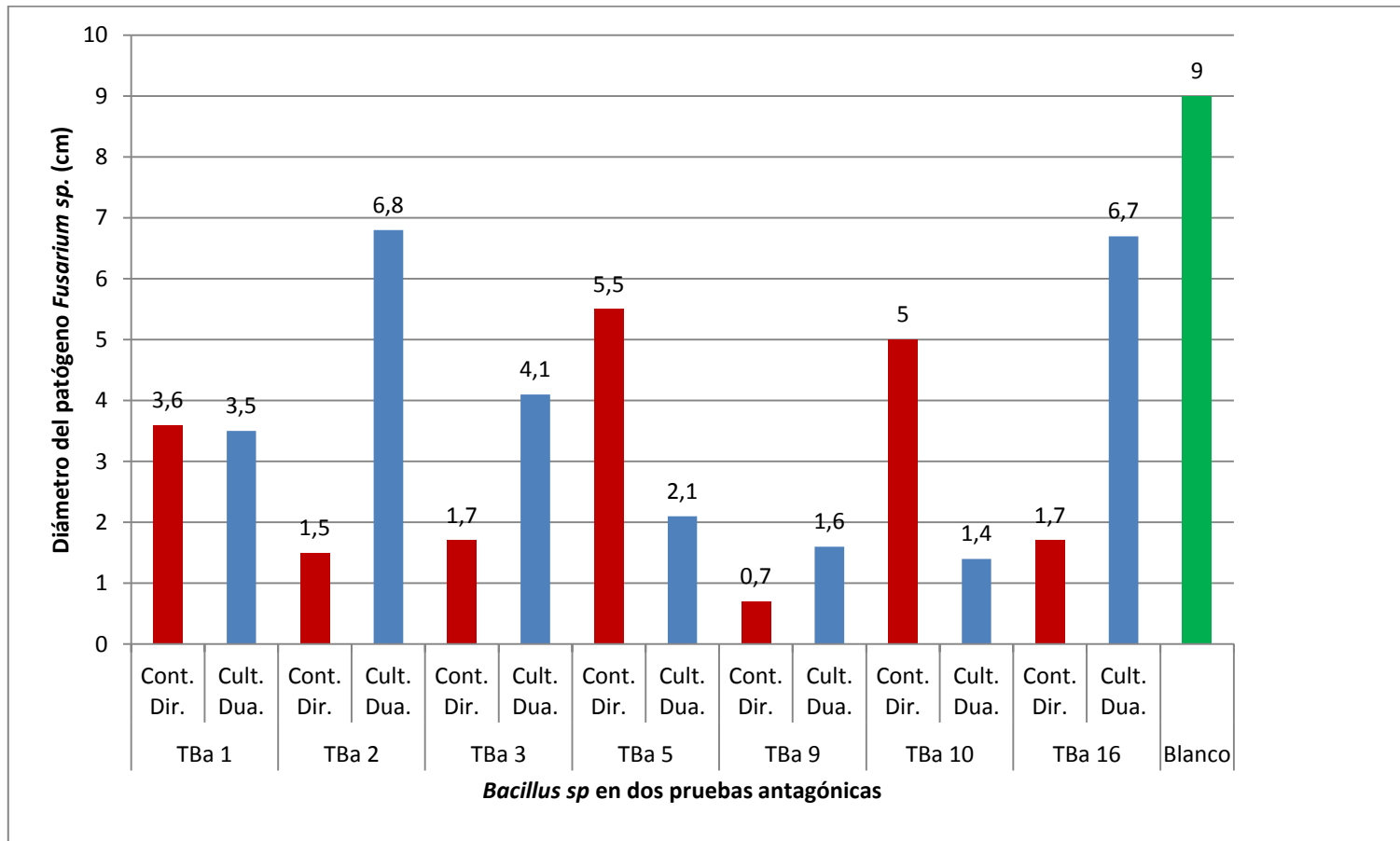


Figura 8: Efectividad de las cepas de *Bacillus sp* en dos pruebas antagónicas diferentes, por contacto directo y por cultivos duales, frente a *Fusarium sp*.

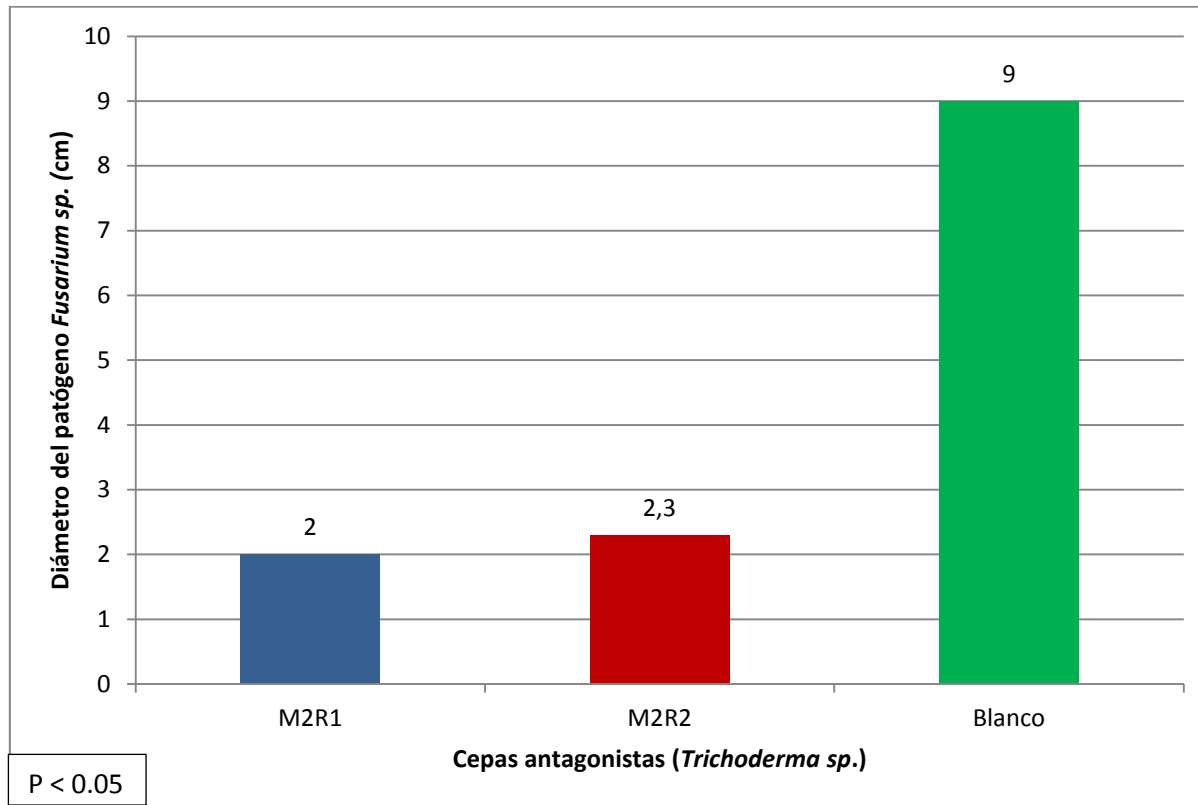


Figura 9: Resultados de las pruebas antagónicas por cultivos duales entre dos cepas de *Trichoderma sp.* (Antagonistas) frente a *Fusarium sp.* (Patógeno), en diez días de incubación.

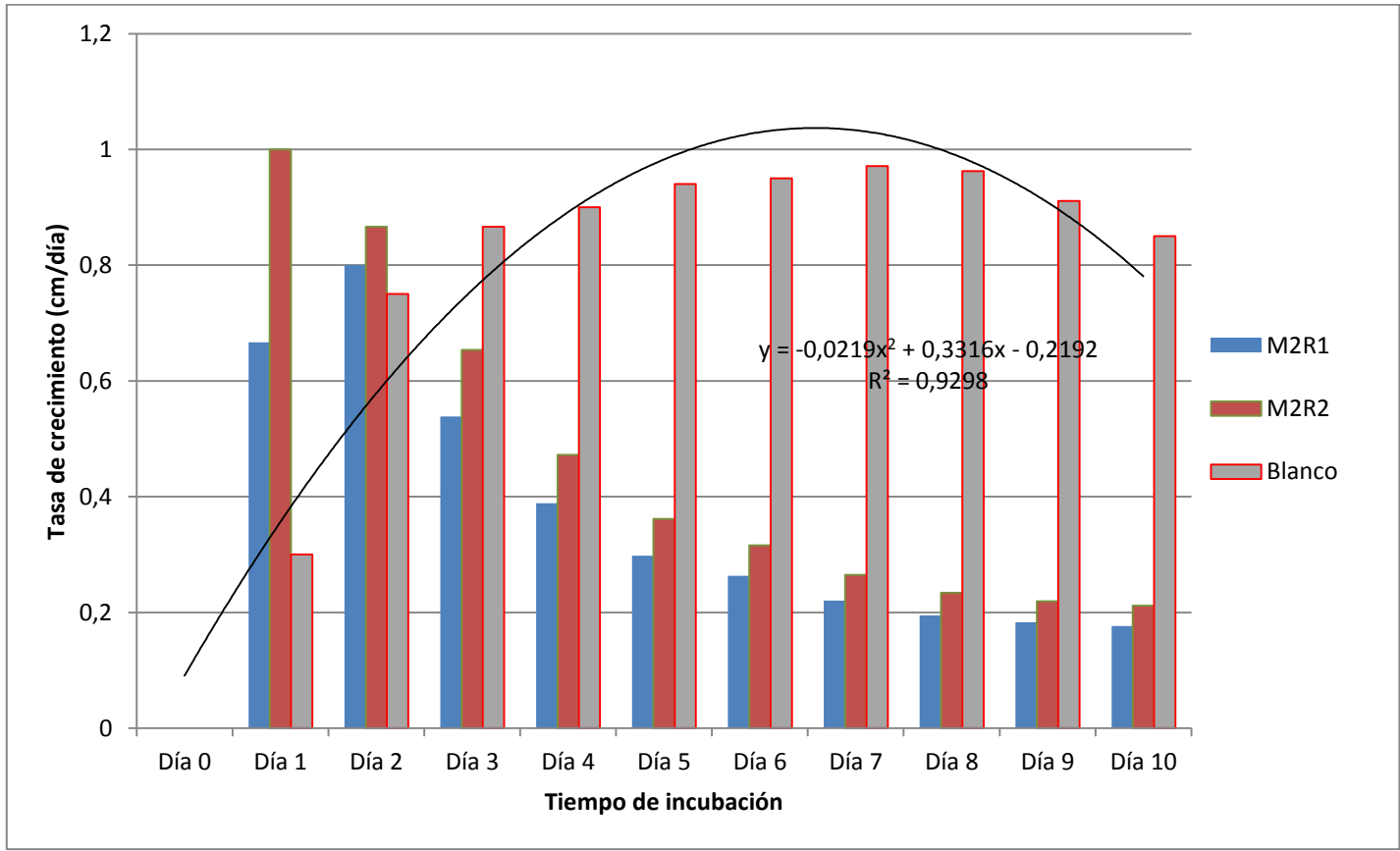


Figura 10: Tasa de crecimiento micelial (TC) de *Fusarium sp* frente a dos cepas de *Trichoderma sp* en prueba antagónica por cultivos duales.

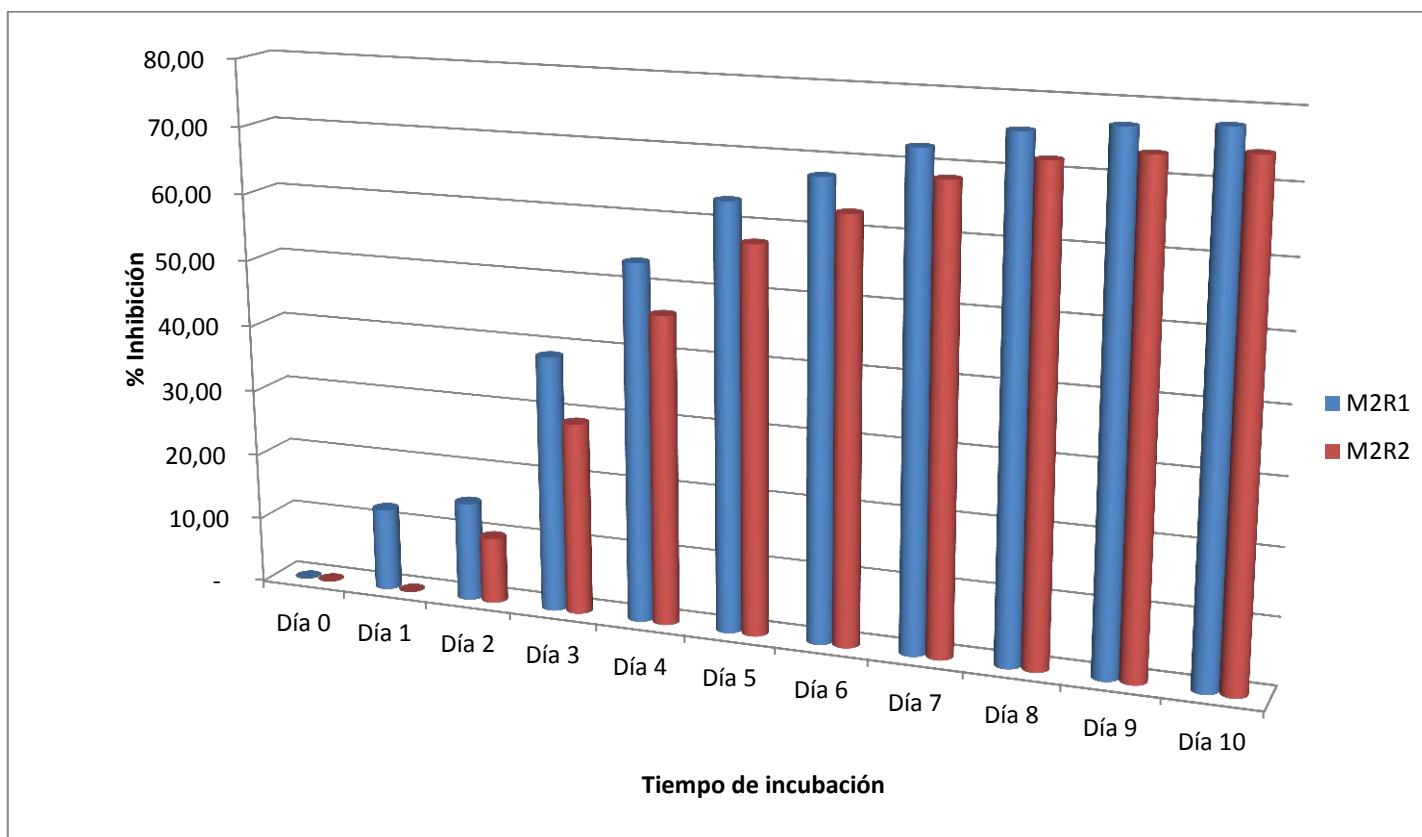


Figura 11: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp* frente a dos cepas de *Trichoderma sp* en prueba antagónica por cultivos duales.



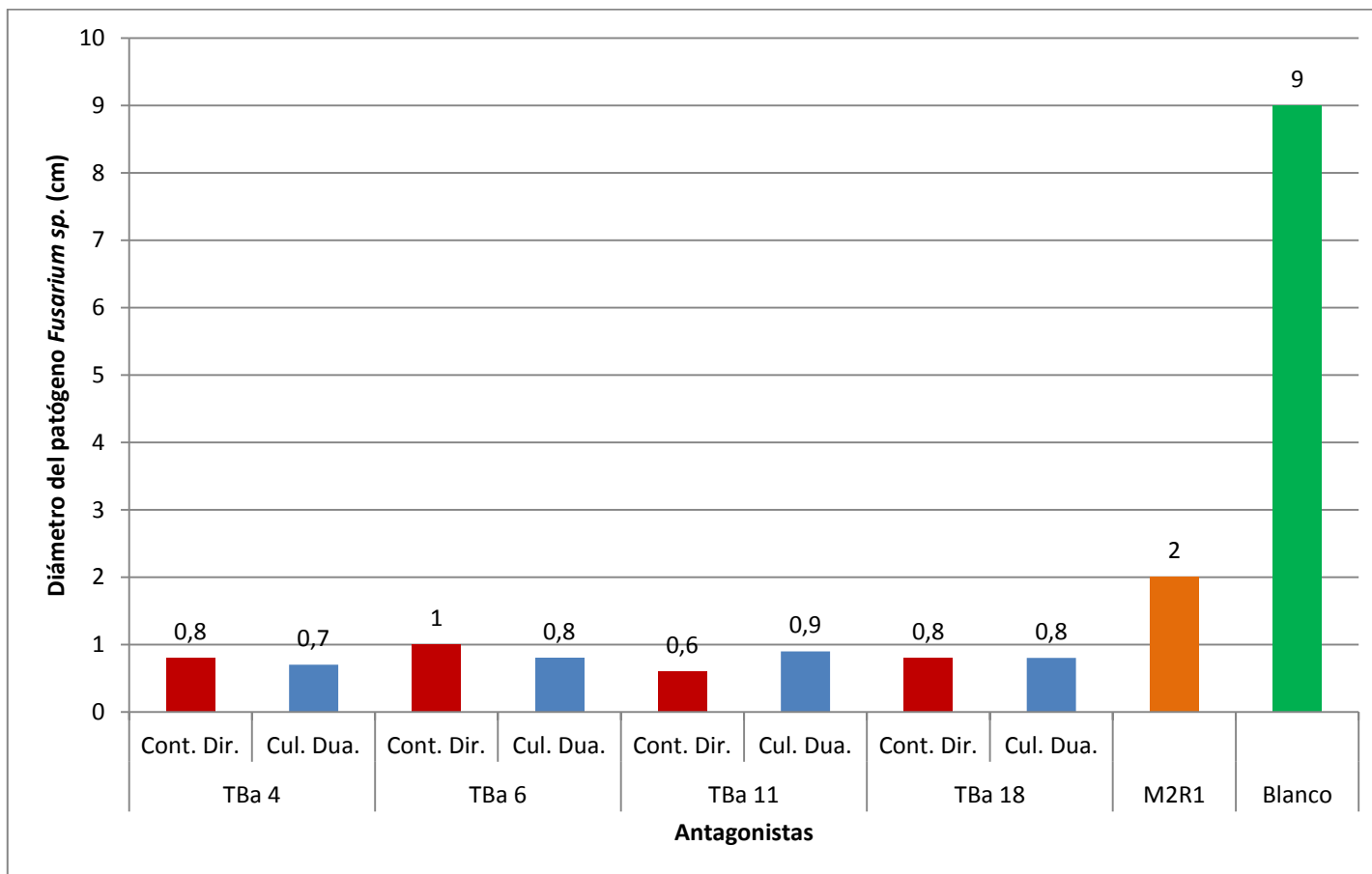


Figura 12: Efectividad del antagonismo entre *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* frente a *Fusarium sp* en diez días de incubación.



## V. DISCUSIÓN

Luego de una evaluación macroscópica, en total se consiguió 28 especies fúngicas con características relativamente diferentes aisladas de las muestras de plantas de tara infectadas (anexo 7) y suelo de la zona radicular, estas cepas fueron aisladas por técnicas de cultivo en trozos y por cámara húmeda (anexo 8).

Se aislaron las especies con diferentes características en frascos separados constituyéndose así el cepario de hongos fitófagos y el cepario de bacterias antagónicas del género *Bacillus* (anexo 9), estas cepas fueron catalogadas según la muestra y el lugar donde fueron aisladas (Tabla 1). A partir de estas cepas se iniciaron las pruebas respectivas de identificación y antagonismo.

La identificación de los hongos mediante el método de Pitt<sup>52</sup> (anexo 10) y las claves taxonómicas de Barnett y Hunter<sup>56</sup> (1988), mostró en total 10 cepas cuyos géneros fueron identificados (Tabla 2), entre las cuales, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Verticillium* y *Alternaria* constituyeron las más importantes (anexo 11). Para la identificación del género *Bacillus sp* se tomó en consideración las características macroscópicas de las colonias, características de la especie (colonias medianas, convexas, blanquecinas, cerosas, forma fusiforme y circular, bordes redondeados), microscópicamente se las identificó como bacilos Gram (+) y químicamente como catalasas positivas.

En las pruebas de patogenicidad (anexo 12), al final de las 4 semanas de evaluación, los especímenes mostraron características de decoloración foliar, defoliación, marchitez en ramas secundarias, destrucción de raíces secundarias y pelos radicales, coloración marrón oscura en haces vasculares de los tallo sin afectación de la médula; estos síntomas se desarrollaron específicamente para las cepas M1R1 y M1R2 correspondientes a *Fusarium sp* (Tabla 3). Para demostrar la presencia de este patógeno en la planta enferma, se procedió a

recuperarlo de las partes marchitas de la planta mediante cultivo de trozos en APD y por cámara húmeda de las partes radicales y aéreas afectadas (anexo 13), logrando aislar esta especie en todos los casos. Según Coca,<sup>3</sup> un causante de marchitamiento vascular también podría ser *Verticillium sp*, pero las pruebas de patogenicidad no mostraron sintomatología similar con esta cepa.

El microorganismo que se encontró causando marchitez vascular en plantas de tara en el Distrito de Huamanguilla fue el hongo identificado como *Fusarium sp*, lo que concuerda con algunos estudios señalados por Coca.<sup>3</sup> que han identificado, a partir de las raíces de plantas de tara afectadas, dos hongos que presuntamente podrían ser los responsables de dicha enfermedad, uno de los cuales fue precisamente el género *Fusarium sp*. Esta última no es propia de la tara, en México se han registrado infecciones graves en plantas de maíz causando pudrición en sus raíces,<sup>66</sup> en el Perú es frecuente la infección del maíz por *Fusarium sp* diseminadas a partir de la semilla principalmente.<sup>67</sup> Esto explicaría la fácil infestación de las plantas de tara por este fitopatógeno ya que en el Distrito de Huamanguilla las plantaciones de tara se realizan en cultivos mixtos con plantas de maíz principalmente.

De acuerdo con los resultados de las pruebas de antagonismo *in vitro*, la mayoría de las cepas de *Bacillus sp* mostraron ser buenos antagonistas frente a *Fusarium sp* fitopatógeno de la tara, algunas en mayor grado que otras corroborando lo reportado por Fernandez O.<sup>13</sup> donde *Bacillus* tiene efecto antagónico frente a *Fusarium* a través de la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas; los cuales debilitan la pared celular de las hifas de los hongos produciendo inhibición en su crecimiento. Las cepas de *Trichoderma sp* resultaron altamente competitivas en espacio y nutrientes inhibiendo de esta manera el crecimiento de *Fusarium sp* en tan solo 48 h de incubación, algunos trabajos como los de Benítez,<sup>68</sup> Harman<sup>69</sup> y Limon,<sup>70</sup> sugieren la presencia de metabolitos difusibles y altamente tóxicos de carácter enzimático (celulasas, quitinasas y proteasas) acompañados por otros compuestos encargados de la inhibición del crecimiento como ácido harzianico, alamenticinas, peptaiboles, antibióticos, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisoperinas, ácido hepteldico y otros, estas características hacen que estas especies sean hiperparásitos de estructuras fúngicas.

Las imágenes mostradas en el anexo 14, 15 y 16 muestran las diferentes pruebas antagónicas realizadas tanto con *Bacillus sp* como con *Trichoderma sp* aislados del campo de cultivo. La imagen del anexo 14 muestra la cepa TBa 9 de *Bacillus sp* frente a *Fusarium sp* en una prueba antagónica por contacto directo luego de 10 días de incubación, notándose una fuerte inhibición en el crecimiento del fitopatógeno en comparación con el blanco mostrado en la imagen D. La imagen del anexo 15 muestra la cepa TBa 10 de *Bacillus sp* frente a *Fusarium sp* en una prueba antagónica por cultivos duales luego de 10 días de incubación, notándose también una fuerte inhibición en el crecimiento del fitopatógeno en comparación con el blanco. La imagen del anexo 16 muestra la cepa M2R1 de *Trichoderma sp* (parte superior) frente a *Fusarium sp* (parte inferior) en una prueba antagónica por enfrentamiento dual, notándose la inhibición del fitopatógeno por la competencia de espacio y nutrientes donde predomina el antagonista. El efecto antagónico se catalogó como muy efectivas aquellas cepas que lograron inhibir el crecimiento del patógeno a menos de 1 cm de diámetro, regularmente efectivas aquellas que la mantuvieron entre 1 a 2 cm de diámetro y poco efectivas aquellas que dejaron sobrepasar los 2 cm de diámetro del patógeno. Estos resultados se detallan en las figuras descritas a continuación.

La figura 1 muestra las cepas más efectivas de *Bacillus sp* en una prueba antagónica por contacto directo frente a *Fusarium sp*. Resultando la TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 y TBa 18 como las cinco cepas con mayor efectividad antagónica, respecto de las 18 evaluadas, frente al patógeno con un crecimiento menor a 1 cm de diámetro en 10 días de incubación en comparación con el blanco que alcanzó un diámetro de 9 cm en el mismo tiempo; además las cepas TBa 2, TBa 3 y TBa 16 también mostraron efectividad antagónica catalogado como grado regular pero bastante considerable, llegando a un promedio de 1.6 cm de diámetro. Los resultados obtenidos en la evaluación estadística de ANOVA (anexo 1) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos aislamientos donde se pudo detectar variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *Bacillus sp* sobre el crecimiento del patógeno; al aplicar la prueba de Tukey (nivel de significancia de 0.05) a estas variaciones mostró que las cepas de *Bacillus* TBa 4, 11, 9, 18, 6, 2, 16 y 3 resultaron con mayor efectividad antagónica (en ese orden) con respecto al resto de las cepas (anexo 2).

Las curvas de crecimiento de *Fusarium sp* frente a las 5 mejores cepas antagónicas de *Bacillus sp* se muestran en el anexo 17. El blanco muestra una tendencia lineal de crecimiento ( $R^2= 0.98$ ) medido por el cambio en la longitud del radio de la colonia en el tiempo, tal como reporta los trabajos de Larralde,<sup>15</sup> 1996. Las cepas de *Fusarium sp* sometidas a las pruebas antagónicas mostraron un ritmo de crecimiento mínimo de tendencia lineal las primeras 48 horas seguidas de un estancamiento casi total hasta el último día de prueba. Las cepas de *Fusarium sp* enfrentadas a las cepas TBa 13, TBa 14 y TBa 15 de *Bacillus sp* muestran un ritmo de crecimiento similar al blanco (anexo 18), catalogándolas como poco efectivas en su capacidad antagónica, sin embargo la tendencia de las gráficas que se extienden por debajo del testigo muestran rastros mínimos de antagonismo. Las variaciones en el potencial biocontrolador in vitro de *Bacillus sp* están ligadas generalmente a las características genéticas de la especie,<sup>71</sup> siendo las especies más antagónicas en diferentes condiciones *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis* reportados en diversos trabajos<sup>72</sup> y las cepas de *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. circulans* y *B. amyloliquefaciens* requieren condiciones más específicas de nutrientes, temperatura y pH para incrementar su capacidad antagónica.<sup>73-74</sup>

La tasa de crecimiento de un hongo filamentoso tiene un comportamiento parabólico según lo descrito en los trabajo de Larralde<sup>15</sup> (1996), lo que coincide con los datos de la figura 2, el blanco muestra una tendencia polinómica de grado dos ( $R^2=0.95$ ). Las pruebas antagónicas frente a las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 y TBa 18 muestran reducción de la tasa de crecimiento micelial de *Fusarium sp* llegando a 0.04, 0.06, 0.02, 0.01 y 0.04 cm /día respectivamente con picos que no sobrepasan en promedio de 0.05 cm/día en 4 días de incubación en contraste con el blanco que llegó hasta 0.85 cm/día en el mismo tiempo de prueba. Estos datos se asemejan a los reportados por Corrales, et al.<sup>16</sup> en 2010 donde obtuvieron tasas mínimas de crecimiento de hasta 0.08 cm/día de *Fusarium* frente a *Bacillus* en plantas de Tomillo (*Thymus vulgaris*). Constanza et al.<sup>75</sup> 2011 en pruebas antagónicas de *Fusarium* frente a *Bacillus* en *Rosmarinus officinalis* considera sus mínimas tasas de crecimiento de hasta 0.17 cm/día. La figura del anexo 19 muestra las cepas con menor efecto antagónico dando tasas de crecimiento en promedio de hasta 0.85 cm/día en su pico más elevado.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial ejercidas por las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 y TBa 18 llegaron a valores de 91.11 %; 88.89 %; 92.22 %; 93.33 % y 91.11 % respectivamente (figura 3), demostrando una efectividad alta en la inhibición del *Fusarium sp* en condiciones de laboratorio. Estos datos se comparan en gran medida con los reportados por Constanza *et al.*<sup>75</sup> 2011 que señala de 70-100% de inhibición en sus cepas más efectivas. Los datos de la figura del anexo 20, muestran las cepas TBa 13, TBa 14 y TBa 15 con picos elevados de inhibición de hasta el 60 % para la cepa TBa 13 en los primeros 3 días de incubación y desciende rápidamente hasta llegar incluso a 0%, esta variación no necesariamente se le podría atribuir a la acción de *Bacillus sp*, sino que podría deberse a otros factores como la adaptación de *Fusarium* a un cultivo nuevo o cambios de temperatura por provenir de un cepario almacenado a 0 °C los cuales retardan un poco el crecimiento del hongo de 2 a 3 días como mostraron las curvas de crecimiento de la mayoría de las pruebas. Los metabolitos producidos por estas especies de *Bacillus sp* resultan de baja efectividad antagónica para *Fusarium sp* dejando proseguir con su crecimiento mostrando valores menores del 30% de inhibición. Investigadores como Talavera *et al.*<sup>76</sup> (1998), plantean que el proceso de selección de bacterias antagonistas *in vitro* se considera el paso más difícil en el desarrollo de un candidato promisorio para el control biológico de enfermedades. García<sup>77</sup> (2005), plantea una escala que solamente se considera como tóxica, las cepas que inhiban alrededor del 100% del crecimiento del patógeno. De esta manera el resto de las cepas se consideran ligeramente tóxicas (79 -30%).

La resistencia de *Fusarium sp* frente a ciertas cepas de *Bacillus* podría deberse a tres causas según (Fassouane *et al.*<sup>78</sup> 1995; Lim *et al.*<sup>79</sup> 2001): (i) Que las toxinas producidas por algunas cepas de *Bacillus* no inhiben ciertas rutas metabólicas de *Fusarium*, (ii) que las rutas metabólicas inhibidas por las toxinas son reemplazadas por otras rutas alternas causando algún tipo de modificación en el crecimiento del hongo, lo cual se demuestra en los datos obtenidos, (iii) que *Fusarium sp* puede transformar las toxinas producidas por *Bacillus sp* en otras formas que no le sean tóxicas.

Para poder demostrar con más efectividad la capacidad antagónica de *Bacillus sp* se realizó una segunda prueba antagónica utilizando un método distinto, la de enfrentamiento por cultivos duales, los resultados de dichas pruebas se muestran en la figura 4, donde se observa que las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 11 y

TBa 18 tuvieron mayor capacidad antagónica frente a *Fusarium sp* que llegó a crecer en promedio 0.85 cm de diámetro micelial en 10 días de incubación. Las cepas TBa 5, TBa 9 y TBa 10 también tuvieron buen efecto antagónico, aunque ligeramente menor que las 4 anteriores, donde el patógeno llegó a crecer hasta un promedio de 1.7 cm en su diámetro durante el mismo tiempo de prueba. Los resultados obtenidos en la evaluación estadística de ANOVA (anexo 3) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos aislamientos donde se pudo detectar variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *Bacillus sp* sobre el crecimiento del patógeno; al aplicar la prueba de Tukey (nivel de significancia de 0.05) a estas variaciones mostró que las cepas de *Bacillus* TBa 4, 18, 6, 11, 10, 9 y 5 resultaron con mayor afectividad antagónica (en ese orden) con respecto al resto de las cepas (anexo 4).

La tasa de crecimiento micelial (figura 5) y el porcentaje de inhibición (figura 6) muestran la efectividad de estas cepas como excelentes antagonistas de *Fusarium sp* con valores de hasta 0.02 cm/día y 92.22% respectivamente para la cepa TBa4. Estos datos muestran una mayor efectividad antagónica que los reportados por Urrea<sup>80</sup> en 2010 que muestran un porcentaje de inhibición de 58.6% utilizando un método similar durante 12 días de incubación a temperatura ambiente.

Haciendo una comparación entre ambos métodos antagónicos, contacto directo y cultivos duales (figura 7), se muestra que las cepas de *Bacillus sp* TBa 4, TBa 6, TBa 11 y TBa 18 tiene un excelente efecto antagónico en ambas pruebas, esto demuestra su gran poder tóxico al producir metabolitos y su rapidez de crecimiento para competir por espacio y nutrientes, demostrando así que son las mejores cepas capaces de inhibir con gran eficacia el crecimiento de *Fusarium sp in vitro* y probablemente también en pruebas *in vivo* que debería ser motivo de otra investigación. Las cepas TBa 9 y TBa 10 muestran una buena capacidad antagónica en una de las pruebas y no tienen la misma eficacia en la otra, en la figura 8 se muestra que para la cepa TBa 9, el crecimiento del patógeno es de 0.7 cm de diámetro por contacto directo y 1.6 cm por cultivos duales, lo cual podría indicar una cepa con buena toxicidad pero un lento crecimiento. La cepa TBa 10 muestra una capacidad antagónica muy diversa para ambas pruebas demostrando efectividad en la de cultivos duales (1.4 cm de diámetro) y baja efectividad en la de contacto directo (5 cm), algo similar ocurrió con la cepa TBa 5, esto se podría deber al método de cultivo o al tiempo de contacto entre



patógeno y antagonista que podría resultar en algún tipo de resistencia adquirida por parte de *Fusarium sp* relacionado con las teorías propuestas por Fassouane *et al.*<sup>78</sup> 1995 y Lim *et al.*<sup>79</sup> 2001 expuestas anteriormente, de cualquier forma podría ser considerado motivo de investigación. En caso contrario como ocurre con las cepas TBa 2, TBa 3 y TBa 16, su lento crecimiento pero efectiva toxicidad influiría en la variación de los resultados en ambos métodos. La cepa TBa 1 en particular tiene similar acción en ambas pruebas de antagonismo con regular efectividad considerándola de esta manera como una cepa antagónica de *Fusarium sp*.

Por otro lado, también se logró demostrar la efectividad de *Trichoderma sp* como antagonista de *Fusarium sp*, la figura 9 muestra las dos cepas de *Trichoderma* M2R1 y M2R2, ambas cepas demostraron efectividad al controlar el crecimiento del patógeno inhibiéndolo en un diámetro de 2.0 y 2.3 cm respectivamente en 10 días de incubación en agar PDA a 25 °C. Los resultados obtenidos en la evaluación estadística de ANOVA (anexo 5) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los aislamientos y el testigo, donde se pudo detectar variaciones en el efecto inhibitorio que ejerció *Trichoderma* sobre el crecimiento del patógeno; al aplicar la prueba de Tukey (nivel de significancia de 0.05), mostraron que las cepas de M2R2 y M2R1 resultaron sin diferencias significativas entre sí en su efectividad antagónica pero sí con respecto al testigo (anexo 6).

Si se observa la curva de crecimiento (anexo 21), *Fusarium sp* llega un estado de latencia a los 3 días de haber iniciado su crecimiento mostrando una gran diferencia con el blanco que describe un crecimiento lineal prolongado. La tasa de crecimiento micelial (figura 10) muestra un pico máximo a las 48 h de crecimiento y un descenso rápido hasta llegar alrededor de 0.2 cm/día, debido a que la prueba es por cultivos duales *Fusarium sp* prosigue con su crecimiento hasta entrar en contacto con *Trichoderma* el cual compite por espacio y nutrientes, este antagonista tiene un acelerado crecimiento micelial cubriendo la placa en su totalidad solo a las 72 h de incubación frenando de esta manera la expansión del patógeno. El porcentaje de inhibición (figura 11) para las dos cepas de *Trichoderma sp* describe una tendencia logarítmica ( $R^2=0.942$ ) llegando hasta valores máximos de 77.7% para M2R1 y de 74.4% para M2R2, siendo de esta manera un buen agente antagónico de *Fusarium sp*. Respecto a la actividad inhibitoria de especies de *Trichoderma*, existen trabajos como los de

Bonilla<sup>18</sup> (1990) con aislados de *T. harzianun*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* sobre *F. subglutinans* que señalan un rango de efectividad desde 10 a 85%, donde *T. harzianun*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* particularmente alcanzan de 48 a 85%, y *T. viride* entre 10 y 48%, además de especificar que aislamientos de *T. harzianun* alcanzaron valores hasta de 84%. Sin embargo, otros trabajos como los de Hernández, *et al.*<sup>17</sup> (2006) reportan la inhibición para *Fusarium subglutinans*, donde los porcentajes más altos fueron a causa de *T. atroviride* y *T. harzianum* con 48% para ambos antagonistas.

La capacidad antagonista de las especies de *Trichoderma* está reconocida. Son buenos competidores por el sustrato y poseen una actividad metabólica muy particular que los capacita como eficientes hiperparásitos de las estructuras fúngicas de los hongos,<sup>81-82</sup> hecho que se ha comprobado en este trabajo.

Haciendo una comparación de la efectividad antagónica entre las mejores cepas de *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* frente a *Fusarium sp* se observa que las cepas de *Bacillus* tienen mayor incidencia sobre el patógeno (figura 12), las gráficas de las curvas de crecimiento (anexo 22) y la tasa de crecimiento micelial (anexo 23) muestran que *Bacillus sp* tiene una fuerte capacidad inhibitoria desde las primeras 48 horas de incubación, en comparación con *Trichoderma sp* que inicia su poder inhibitorio a las 48 a 72 h que entra en contacto con el patógeno. Los porcentajes de inhibición mostrados por *Bacillus sp* se acercan al 90% en comparación con *Trichoderma sp* que bordea el 75%. Además se ha observado que *Bacillus sp* ejerce una destrucción notoria sobre el micelio de *Fusarium sp* a causa de la acción metabólica tóxica propia de este género, en comparación con *Trichoderma sp* que no ejerció una destrucción micelial notoria del patógeno (anexo 16) pese a que se han reportado que *Trichoderma* ejerce también acción metabólica sobre especies de *Fusarium sp*.<sup>83</sup>

## VI. CONCLUSIONES

1. *Fusarium sp* es el agente patógeno causante de la enfermedad de marchitamiento vascular progresivo (Seca Seca) de los cultivos de tara (*Caesalpinia spinosa*).
2. Las cepas nativas de *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* demostraron, en condiciones de laboratorio, gran efectividad antagónica frente a *Fusarium sp* siendo, de estos dos, *Bacillus sp* el mejor antagonista en competencia por sustrato y nutrientes como en toxicidad de sus metabolitos, resultando las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 11 y TBa 18 con los mejores índices de antagonismo frente a *Fusarium sp* en ambas pruebas antagónicas.
3. La cepa M2R1 y la cepa M2R2 de *Trichoderma sp* no mostraron variaciones significativas entre sí en su comportamiento antagónico.



## VII. RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones encaminadas a la producción de biofungicidas utilizando especies antagónicas como *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* que tengan mayor efecto sobre el patógeno, de esta manera lograr minimizar la utilización de fungicidas sintéticos que son dañinos para el medio ambiente.

Realizar campañas de prevención y manejo adecuado de cultivos de la tara, como por ejemplo, evitando riegos por inundación o arrastre y promoviendo el monocultivo, para así evitar la propagación de este fitopatógeno.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nova, R. Control biológico de fusarium sp. en la tara (*Caesalpinia spinosa* M.) con la aplicación del hongo antagónico *Trichoderma* sp. Universidad Mayor de San Simón. Bolivia 2009.
2. Módulos Profesionales para el Desarrollo y Ejecución Integral de Proyectos en Tara [www.ipexperu.org](http://www.ipexperu.org) -- <http://www.slideshare.net/GILMERJOEL/tara>
3. Coca M. Enfermedades de la Tara (*Caesalpinia spinosa*). Serie de publicaciones fitopatológicas. Universidad Mayor de San Simón (UMSS). Departamento de Fitotecnia y Producción Vegetal. Laboratorio de Fitopatología. Cochabamba Bolivia 2009. Volumen 3, N° 2.
4. Avendaño E., Donckers R., Risco M., Martínez A., Quispe R., Pérez L., et al. Conociendo la cadena productiva de tara en Ayacucho. Solid Perú; Ayacucho 2008; 98-9.
5. Agrios G. Fitopatología. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. México 2002. 425-431 pp.
6. Cadenas C. Fitopatología general. Universidad Nacional Agraria la Molina. 2007; 61(1): 78-1. Disponible en: [http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fonz/fitogen/PDF/APUNTES%20DE%20CLASE S1.pdf](http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fonz/fitogen/PDF/APUNTES%20DE%20CLASE%20S1.pdf)
7. Contreras J., Chavez F., Cuba R., Quispe N., Godoy L., Bendezú N., et al. Manejo agronómico de la tara. Solid OPD, IDESI-Ayacucho, Productos del país S.A. Ayacucho 2010; módulo 4: 32-5.
8. Ciampi L., Silva S. Perspectivas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en frambueso. Rev Aconex. 1991; 31:5-10.
9. Martin P, Travers S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol. 1989; 55:2437-2442.
10. Meadows M, Ellis D, Butt Joe, Jarrett P, Burges H. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. Appl Environ Microbiol 1992; 58:1344-1350.
11. Bernal G, Illanes A, Ciampi L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. J Biotechnol. 2002; 5:7-8.
12. Fernández-Larrea O. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. CIDINISAV. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica 2001; 62: 96 – 100.
13. Fernandez O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica 2001; N° 62 p.96–100.

14. Kim D., Cook R., Weller D. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*. 1997; 87:551-558.
15. Larralde C. Cinética de crecimiento de hongos filamentosos, Morfometría de los micelios de *A. niger* y *G. fujihmi* y su posible utilización en la predicción de la tasa específica de crecimiento. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa-México 1996.
16. Corrales L., Sanchez L., Cuervo J., Joya A., Marquez K. Efecto biocontrolador de *Bacillus spp* frente a *Fusarium sp* bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá-Colombia 2010.
17. Hernández A., Sierra A., Carr A. Evaluación in vitro del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) MERR.) *Fitosanidad*, vol. 10, núm. 2, junio, 2006, pp. 105-108 Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana, Cuba. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=209116102003>
18. Bonilla M. Utilización de especies de *Trichoderma* no controles biológico de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *Subglutinans* Wr. & Rg. En Abacaxi E *Ananas comosus* (L.) Merrill. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. Curso de Pos-Graduação. Em Agronomia: Cruz Daz Almas Brasil 1990.
19. Hajek A. *Natural Enemies. An introduction to biological control*. Cambridge University Press, New York. 2004.
20. Ezziyani M., Sid Ahmed A., Perez C., Requena M., Candela M. Control biológico por microorganismos antagonistas. Universidad de Murcia. España, 2006.
21. Brock D., Madigan M. *Biología de los Microorganismos*. Octava Edición. Edit. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México 1997.
22. Koneman E. *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color*. Quinta Edicion. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 2001.
23. Ulibarri E. Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (Leguminosae - Caesalpinioideae) de Sudamérica. *Darwiniana*. 1996; 34:329.
24. Gonzales P. Marchitamiento vascular del tomate. Universidad de la Republica - Facultad de Agronomía. Montevideo-Uruguay 2006. [Última actualización: 17-04-2006] Disponible en: [http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium\\_tom.html](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html)
25. Cano A., La Torre M., Castillo S., Aponte H., Morales M., Mendoza W., León B., Roque J., Salinas I., Monsalve C., Beltrán H. Las plantas comunes del



Callejón de Conchucos (Ancash, Perú). Guía de Campo. Museo de Historia Natural (UNMSM). Serie de Divulgación. 2006; 13:1-303.

26. Duke J. *Caesalpinia spinosa*. In: Handbook of Legumes of World Economic Importance. Plenum Press, New York 1981; 32-33.
27. Coppen J. Non-wood Forest Products: 6-gums, resins and latexes of plant origin. FAO, Rome 1995.
28. Hickman J. Jepson Man.: Higher Pl. Calif. i-xvii, 1993. 1-1400.
29. Macbride J. Leguminosae, Flora of Peru. Publ. Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser. 1943; 13(3/1): 1-506.
30. Brako L., Zarucchi J. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 45: i-xi, 1993; 1-1286.
31. De la Cruz P. Aprovechamiento integral y racional de la tara. Revista del Instituto de Investigación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. FIGMMG 2004; Vol. 7(14): 64-73.
32. Vigo E., Quiroz V., Tierra A. 2007. Cadenas de Valor Sostenibles: Producción, Comercialización y Agro exportación. Manual: EL cultivo de Tara en Cajamarca. Disponible en: [http://www.contactorural.com.pe/images/documentos/Manual\\_El\\_cultivo\\_de\\_tara\\_en\\_Cajamarca-2da\\_impresion.pdf](http://www.contactorural.com.pe/images/documentos/Manual_El_cultivo_de_tara_en_Cajamarca-2da_impresion.pdf)
33. Wrann H., Arriagada B. Experimental plantations of tannin-producing species in the semi-arid zone of Chile. Ciencia e Investigación Forestal. 1988; 3: 51-66.
34. Fernández-Larrea O. Microorganismos entomopatógenos y antagonistas: posibilidades de producción. CIDINISAV. Boletín técnico N° 1. Costa Rica 1985.
35. Lecuona R. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina 1996; 338 p.
36. Korsten L., De Villiers E., Wehner R., Kotzet J. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvet fruit disease of avocado in South Africa. Plant Disease. 1997; 81:455-459.
37. Fiddaman, P. and Rossall, S. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal Applied Bacteriology. 1994; 76: 395-405.
38. Universidad Autónoma de Coahuila (UADEC). CIENCIACIERTA: Revista de divulgación científica. Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación; Dep. de Divulgación Científica, 2009. Disponible en: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC17/cc17trichoderma.html>

39. Papavizas G., Dunn M., Lewis J., and Beagle-Ristaino J. 1984. Liquid Phytopathology 74:1171-1175.
40. Booth C. The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. 1971; pp. 19-31.
41. Seifert K. *Fusarium* and anamorph generic concepts. *Fusarium*. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul, Minnesota 2001; pp. 15 – 28
42. Marasas W. *et al.* Toxigenic *Fusarium* Species. The Pennsylvania State University Press. University Park and London 1984.
43. Samuels G. *et al.* Perithecial species of *Fusarium*. *Fusarium*. Summerell BA et al. eds. APS Press, St. Paul. 2001; pp. 122-137
44. Backer R. Inoculum potencial. In J.D. Horsfall and E.B. Cowling (Eds). *Plant Pathology: an advance treatise*. Vol II. Academic Press. New York 1978; 137-157 pp.
45. Jeffries P., Young T. Interfungal parasitic relationships. International Mycological Institute. 1994; p. 235-271
46. Baker, K. Mechanisms of biological control of soilborne Pathogens Ann. RED. Phytopathol. 1968; 263-294
47. Cook R. and Baker R. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota 1983.
48. Wainwright M. Introducción a la biotecnología de los hongos. España 1995; 225 pp: 174-176.
49. Huamán R. Manual de Prácticas de Fitopatología. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú 2010; 40p.
50. French E. y Herbert T. Métodos de investigación fitopatológica. Libros y materiales educativos, nº 43. San José, Costa Rica 1980, IICA. 289p.
51. Fox F. Principles of diagnostic techniques in plant pathology. Wallingford: CAB International. 1993; 213p.
52. Pitt J. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. 2º ed. CSIRO, North Ryde. 1988.
53. Klich M. and Pitt J. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs. CSIRO, North Ryde. 1988.
54. Pitt J. and Hocking A. Fungi and Food Spoilage. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London 1997. cap 4.
55. Dade H. and Gunnell J. Classwork with Fungi. CMI, Kew. Fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. 1969.

56. Barnett, H. and Hunter B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 th edition. APS Perss. USA 1998; 218 p.
57. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Salta-Argentina 2003. ISBN 987-9381-19-X.
58. Valencia-Botín A. Etiología de la enfermedad “ojo de pescado” en pitahaya (*Hylocereus undatus* H). Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, edo. México 2002; 62p.
59. García Godos P., Palomino S., Mujica F. Manual de prácticas de microbiología industrial. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú 2006. p32-44.
60. Mujica F., García Godos P., Palomino S. Biotecnología general, cuaderno de prácticas. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú 2008; 44p.
61. Monzón J. Infecciones causada por el género *Fusarium* sp. 3era Edición. Centro de investigaciones microbiológicas. España 2000.
62. French E. y Herbert T. Métodos de investigación fitopatológica. Libros y materiales educativos, nº 43. San José, Costa Rica 1980; IICA. 289p.
63. Mitidieri L. Control biológico de hongos de suelo con *Trichoderma*. IDIA. 1988; 44:45-9.
64. Acosta T., Avellaneda A., Cuervo J., Sánchez L. Evaluación de microbiota de tomillo (*thymus Vulgaris*), como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos de la universidad nacional En: Universidad Nacional de Colombia. Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales. Ed. 1. Bogotá 2007. P. 135 – 138.
65. Benítez S., Bentley J., Bustamante P., Sánchez L., Corrales L. Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizósfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. Nova. 2007; 5:147-153.
66. Morales I., Rodríguez M., Morales Y., et al. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. Mycopathologia. México 2007.
67. Injante P., Joyo G. Manejo integrado de maíz amarillo duro (UNALM). Perú 2010.
68. Benítez T., Rincón A., Limón M., Codón A. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 2004; 7: 249-260.

69. Harman G., Howell C., Viterbo A., Chet I., Lorito M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2004; 2:43-56.
70. Limón M., Chacón M., Mejías R., Delgado-Jarana J., Rincón A., Codón A., Benítez T. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding-domain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 64:675-685.
71. Astorga K., Meneses K., Zúñiga C., Brenes J., Rivera W. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*. 2013; Vol. 27 - Nº 2, p82-91.
72. Layton C., Maldonado E., Monroy L., Constanza L., Consuelo L. *Bacillus* spp; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá 2011; D.C. P.P.: 177 – 187.
73. Li X., Quan C., Yu H., Fan S. Multiple effects of a novel compound from *Burkholderia cepacia* against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 285: 250-6.
74. Guillen, R. *Bacillus* spp. Como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile. *Revista mexicana de fitopatología*. Ciudad Obregón, México. [Sitio en internet]. Consultado: 05/06/2010. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/612/61224204.pdf>
75. Constanza L., Sánchez L., Cuervo J., Bautista D., González L., Guevara M. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá-Colombia 2011; pp: 63 – 75.
76. Talavera M., Bustamante E., González R. y Sánchez V. Selección y evaluación en el laboratorio y campo de microorganismos glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. *Manejo Integrado de Plagas*. 1998; 47: 24 – 30.
77. García F. Selectividad de productos fitosanitarios en el control integrado: Herramientas indispensables para la implementación de programas de ICM. 2005. Disponible en: [AgroInformación.com](http://AgroInformación.com).
78. Fassouane A., Rachidi M., Rouffaud M., El-Abbouyi A., Nguyen V. *In vitro* antifungal activity of *Bacillus licheniformis* FSJ-2 products against dermatophytes. *J Mycol Med*. 1995; 5: 244-8.
79. Lim D., Hains P., Walsh B., Bergquist P., Nevalainen H. Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: a proteomic approach. *Proteomics*. 2001; 1: 899-910.

80. Urrea R. Evaluación in vivo e *in vitro* de bacterias aisladas de la rizósfera de uchuva (*Physalis peruviana*) como biocontroladoras de *Fusarium oxysporum*. Universidad militar nueva granada facultad de ciencias básicas programa de biología aplicada. Bogotá D.C. 2010.
81. Ghisalverti E., Sivasithamparam K. Antifungal Antibiotics Produced by *Trichoderma spp.* Soil, *Biol. Biochem.* 1991; (23):1010-1020.
82. Huang Q., Tezuka Y., Kikuchi T., Nishi A., Tubaki K., Tanaka K. Studies on Metabolites of Mycoparasitic fungi, Metabolites of *Trichoderma Koningii*. 1995; (43):223-229.
83. Claydon N., Allan M., Hanson J. Antifungal Alkaryl Pyrones of *Trichoderma harzianum*, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1987; 88:503-513.



## **ANEXOS**





## Anexo 1

Resultados del análisis de varianza unidireccional de las pruebas de antagonismo por contacto directo entre el diámetro de *Fusarium sp* en cm frente a cepas de *Bacillus sp.* a los 10 días de incubación con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Análisis descriptivo de las variables					
Cepa de <i>Bacillus</i>	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%	
				Inferior	Superior
Blanco	3	9.000	0.000	8.338	9.662
TBa 1	3	3.633	0.503	2.972	4.295
TBa 10	3	5.0333	0.0577	4.3716	5.6950
TBa 11	3	0.6333	0.0577	-0.0284	1.2950
TBa 12	3	3.467	0.404	2.805	4.128
TBa 13	3	8.9667	0.0577	8.3050	9.6284
TBa 14	3	7.167	0.351	6.505	7.828
TBa 15	3	6.500	0.624	5.838	7.162
TBa 16	3	1.667	1.258	1.005	2.328
TBa 17	3	3.933	1.361	3.272	4.595
TBa 18	3	0.767	0.208	0.105	1.428
TBa 2	3	1.533	0.306	0.872	2.195
TBa 3	3	1.7000	0.1000	1.0383	2.3617
TBa 4	3	0.5667	0.0577	-0.0950	1.2284
TBa 5	3	5.467	0.351	4.805	6.128
TBa 6	3	0.967	0.551	0.305	1.628
TBa 7	3	4.233	0.874	3.572	4.895
TBa 8	3	3.667	0.586	3.005	4.328
TBa 9	3	0.700	0.173	0.038	1.362

Desv.Est. agrupada = 0.566150

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cepa de Bacillus	18	414.25	23.0140	71.80	0.000
Error	38	12.18	0.3205		
Total	56	426.43			

## Anexo 2

Resultados de las comparaciones en parejas de Tukey de las variaciones mostradas en las pruebas de antagonismo por contacto directo entre las diferentes cepas de *Bacillus sp* frente al crecimiento en diámetro de *Fusarium sp*, con un nivel de confianza de 95%

Cepa de <i>Bacillus</i>	N	Media	Agrupación
Blanco	3	9.000	A
TBa 13	3	8.9667	A
TBa 14	3	7.167	B
TBa 15	3	6.500	B C
TBa 5	3	5.467	B C D
TBa 10	3	5.0333	C D E
TBa 7	3	4.233	D E
TBa 17	3	3.933	D E
TBa 8	3	3.667	E
TBa 1	3	3.633	E
TBa 12	3	3.467	E
TBa 3	3	1.7000	F
TBa 16	3	1.667	F
TBa 2	3	1.533	F
TBa 6	3	0.967	F
TBa 18	3	0.767	F
TBa 9	3	0.700	F
TBa 11	3	0.6333	F
TBa 4	3	0.5667	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Anexo 3

Resultados del análisis de varianza unidireccional de las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre el diámetro de *Fusarium sp* en cm frente a cepas de *Bacillus sp.* a los 10 días de incubación con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Análisis descriptivo de las variables					
Cepa de <i>Bacillus</i>	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%	
				Inferior	Superior
Blanco	3	9.000	0.000	8.287	9.713
TBa 1	3	3.467	0.987	2.754	4.179
TBa 10	3	1.433	0.404	0.721	2.146
TBa 11	3	0.933	0.208	0.221	1.646
TBa 12	3	8.500	0.866	7.787	9.213
TBa 13	3	5.967	1.106	5.254	6.679
TBa 14	3	8.867	0.231	8.154	9.579
TBa 15	3	6.767	0.850	6.054	7.479
TBa 16	3	6.667	1.242	5.954	7.379
TBa 17	3	6.767	0.306	6.054	7.479
TBa 18	3	0.7667	0.1528	0.0540	1.4793
TBa 2	3	6.800	0.755	6.087	7.513
TBa 3	3	4.067	0.503	3.354	4.779
TBa 4	3	0.6667	0.1155	-0.0460	1.3793
TBa 5	3	2.067	0.451	1.354	2.779
TBa 6	3	0.833	0.252	0.121	1.546
TBa 7	3	6.667	0.289	5.954	7.379
TBa 8	3	6.067	0.252	5.354	6.779
TBa 9	3	1.567	0.473	0.854	2.279

Desv.Est. agrupada = 0.609717

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Cepa de Bacillus	18	493.70	27.4277	73.78	0.000
Error	38	14.13	0.3718		
Total	56	507.83			

#### Anexo 4

Resultados de las comparaciones en parejas de Tukey de las variaciones mostradas en las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre las diferentes cepas de *Bacillus sp* frente al crecimiento en diámetro de *Fusarium sp*, con un nivel de confianza de 95%

Cepa de <i>Bacillus</i>	N	Media	Agrupación
Blanco	3	9.000	A
TBa 14	3	8.867	A
TBa 12	3	8.500	A B
TBa 2	3	6.800	B C
TBa 17	3	6.767	B C
TBa 15	3	6.767	B C
TBa 7	3	6.667	B C
TBa 16	3	6.667	B C
TBa 8	3	6.067	C
TBa 13	3	5.967	C
TBa 3	3	4.067	D
TBa 1	3	3.467	D E
TBa 5	3	2.067	E F
TBa 9	3	1.567	F
TBa 10	3	1.433	F
TBa 11	3	0.933	F
TBa 6	3	0.833	F
TBa 18	3	0.7667	F
TBa 4	3	0.6667	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 5

Resultados del análisis de varianza unidireccional de las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre el diámetro de *Fusarium sp* en cm frente a cepas de *Trichoderma sp.* a los 10 días de incubación con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

<b>Análisis descriptivo de las variables</b>					
<b>Cepas de <i>Trichoderma</i></b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>	
				<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
Blanco	2	9.000	0.000	8.464	9.536
M2R1	2	1.950	0.212	1.414	2.486
M2R2	2	2.250	0.354	1.714	2.786

Desv.Est. agrupada = 0.238048

<b>Análisis de Varianza</b>					
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Cepa de Bacillus	2	63.5700	31.7850	560.91	0.000
Error	3	0.1700	0.0567		
Total	5	63.7400			

## Anexo 6

Comparaciones en parejas de Tukey de las variaciones mostradas en las pruebas de antagonismo por cultivos duales entre las diferentes cepas de *Trichoderma sp* frente al crecimiento en diámetro de *Fusarium sp*, con un nivel de confianza de 95%

<b>Cepas de <i>Trichoderma</i></b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Blanco	2	9.000	A
M2R2	2	2.250	B
M2R1	2	1.950	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Anexo 7



Figura 13: Planta en vivero con evidentes síntomas de marchitez vascular (hojas decoloradas, rojizas, secas y adheridas al tallo).

## Anexo 8



Figura 14: Micelios de hongos filamentosos aislados con la técnica de cámara húmeda a partir de trozos de raíz.



## Anexo 9



Figura 15: Cepario de hongos fitopat6genos aislados de muestras de plantas y suelo (arriba). Cepario de varias especies de *Bacillus* sp aislados de muestras de suelo (abajo).

## Anexo 10



Figura 16: Placas Petri sembradas con cepas fúngicas mediante el método de Pitt para su identificación según claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter<sup>56</sup> (1988).

## Anexo 11

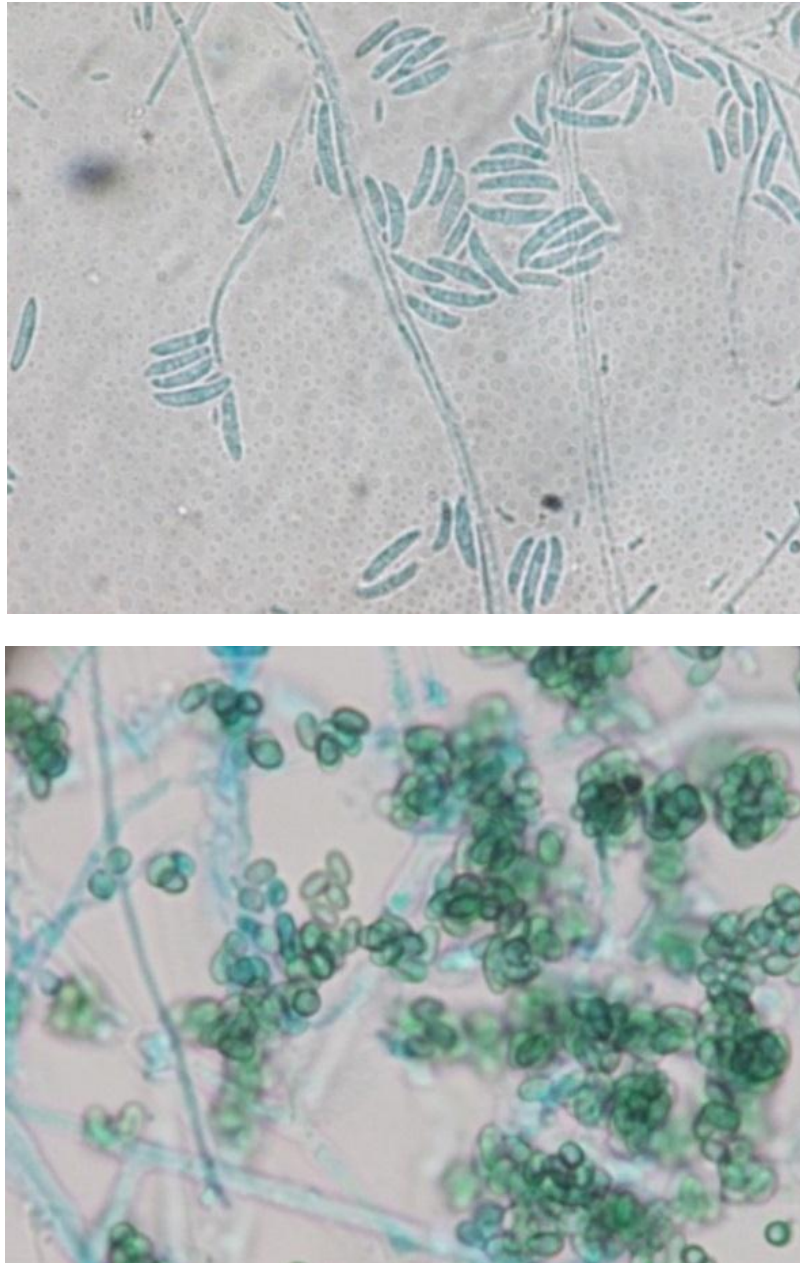


Figura 17: Observación microscópica de macroconidios de *Fusarium* sp. (arriba). Conidios de *Trichoderma* sp. obtenidos por Microcultivo (abajo).

## Anexo 12



Figura 18: Inoculación de la suspensión de esporas de hongos fitopatógenos en plantas de Tara sanas según técnica de Monzón,<sup>61</sup> 2000.

### Anexo 13



Figura 19: Comparación de una planta de Tara con raíz podrida en la cuarta semana después de la inoculación con *Fusarium sp* (izquierda) y un testigo (derecha).



## Anexo 14

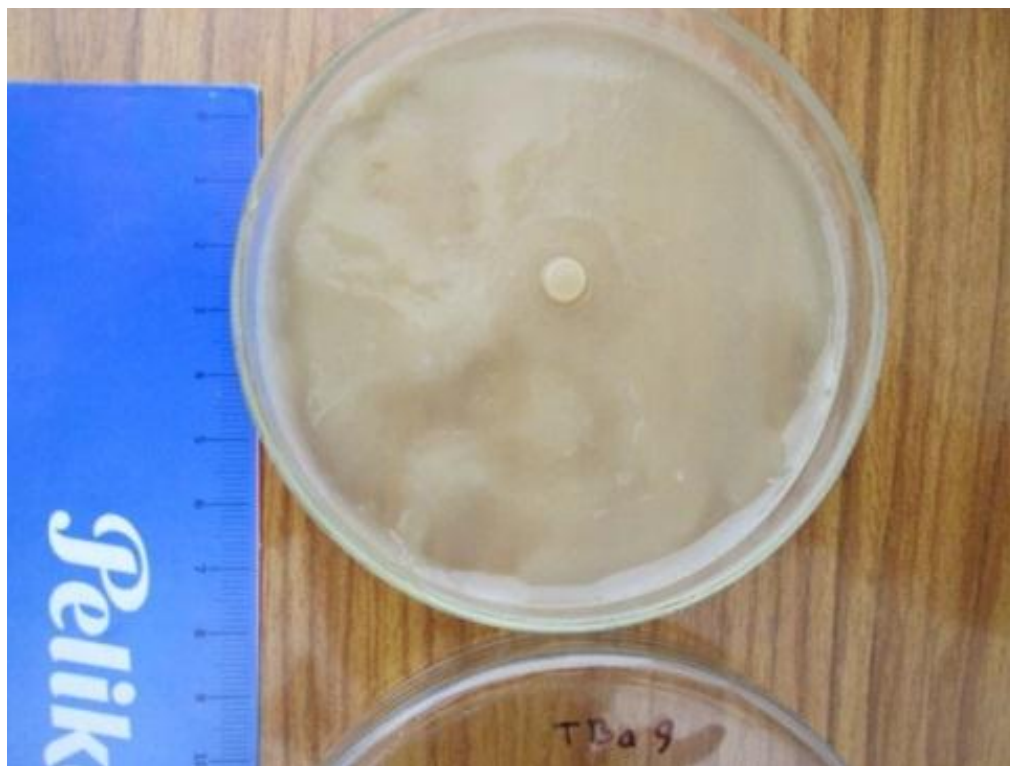


Figura 20: Prueba antagónica por contacto directo, *Bacillus sp* sembrado por diseminación y *Fusarium sp* en el centro sembrado con sacabocado de 0.5 cm.

## Anexo 15

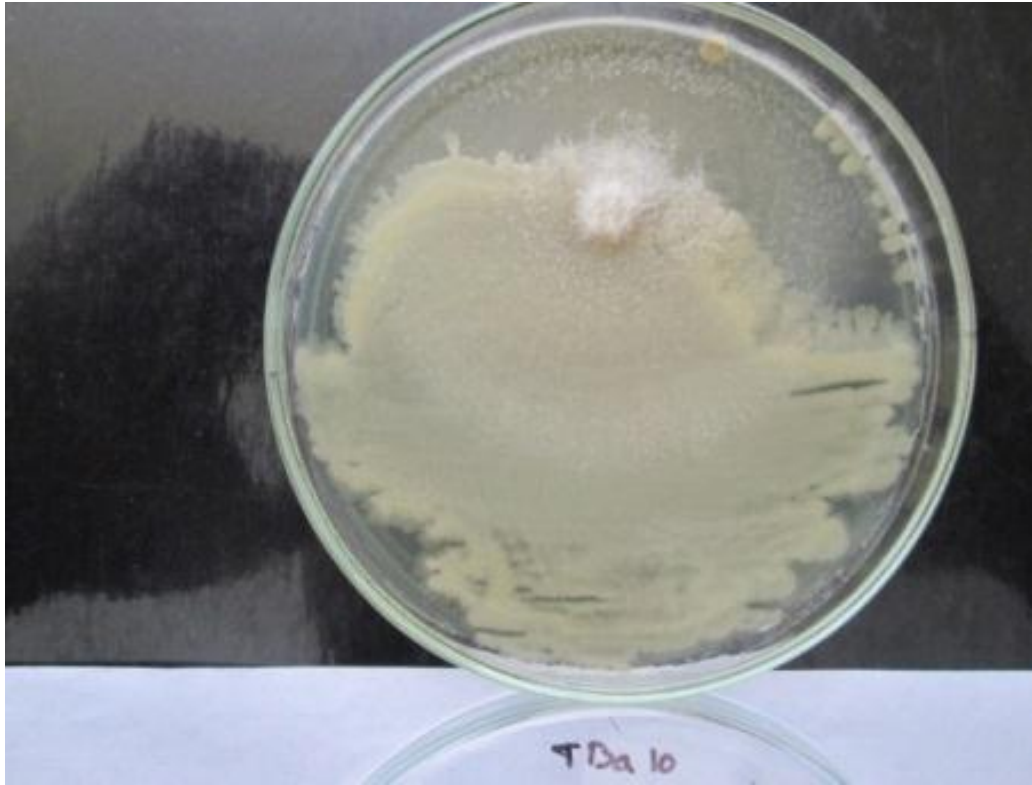


Figura 21: Prueba antagónica por cultivo dual, *Bacillus* sp sembrado por estrías y *Fusarium* sp sembrado en frente con sacabocado de 0.5 cm.

Anexo 16

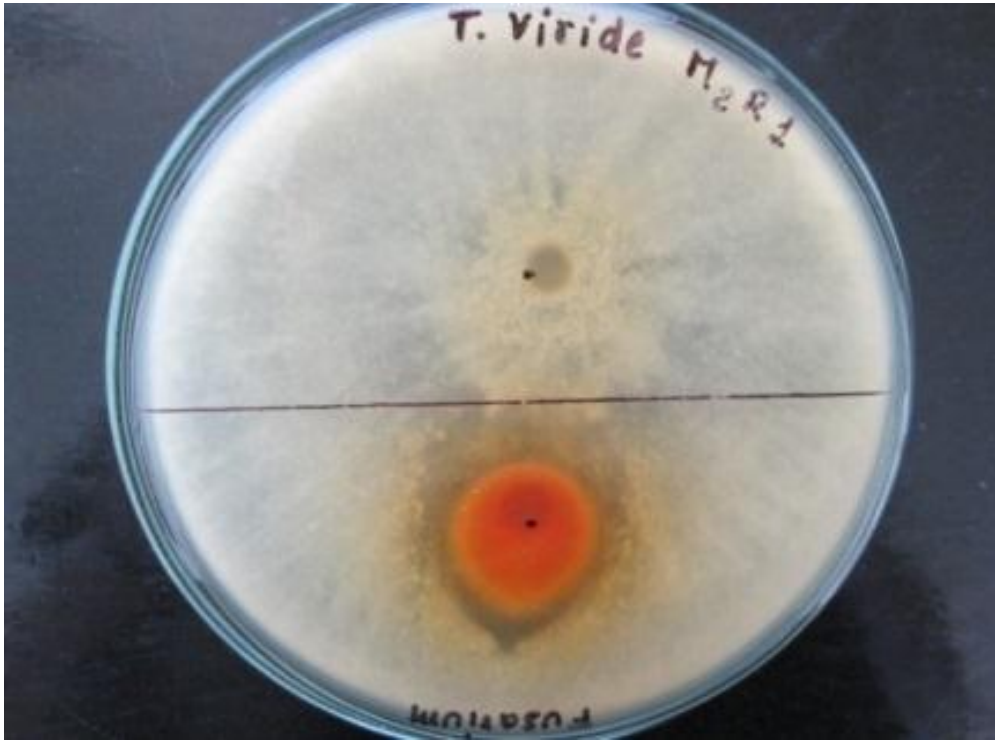


Figura 17: Prueba antagónica entre *Trichoderma* sp y *Fusarium* sp. ambos sembrado por cultivo dual con sacabocado de 0.5 cm.



## Anexo 17

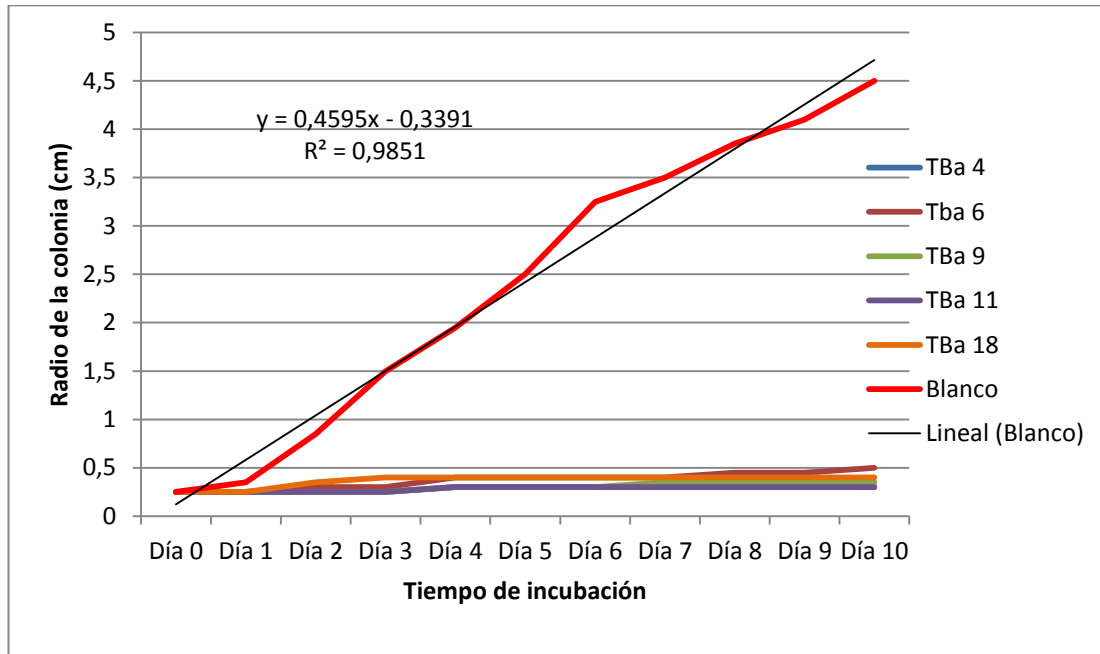


Figura 21: Curva de crecimiento radial de *Fusarium sp* frente a las cinco cepas más efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagónica por contacto directo.

## Anexo 18

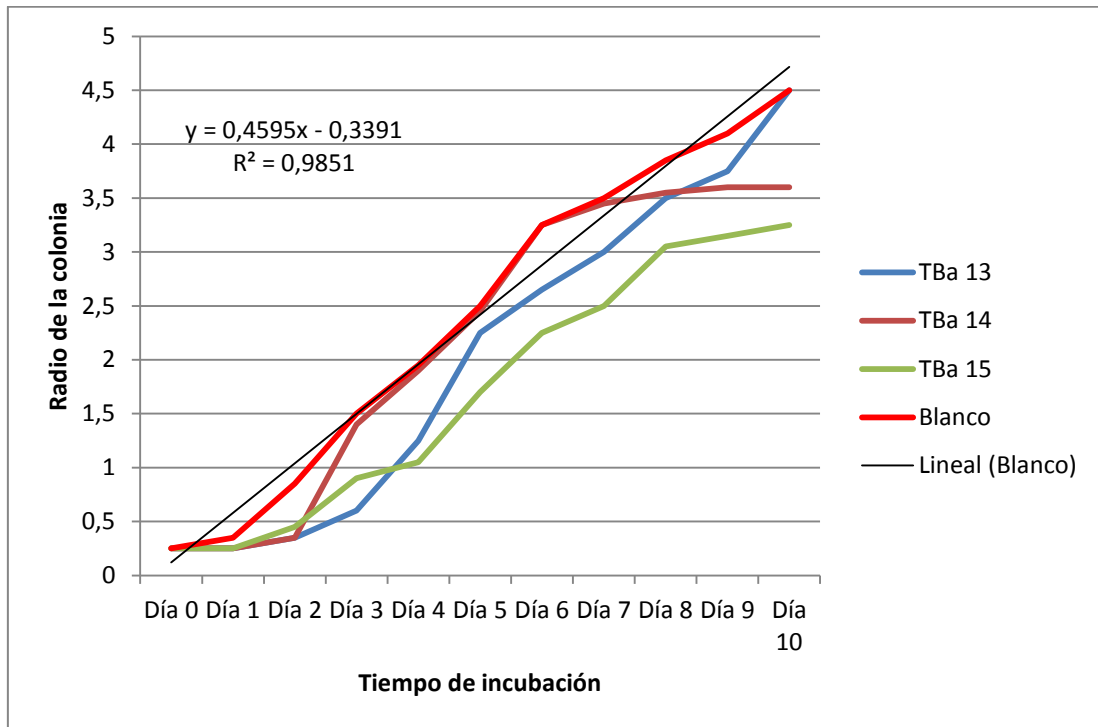


Figura 22: Curva de crecimiento radial de *Fusarium sp.* frente a las tres cepas menos efectivas de *Bacillus sp.* en prueba antagónica por contacto directo.

## Anexo 19

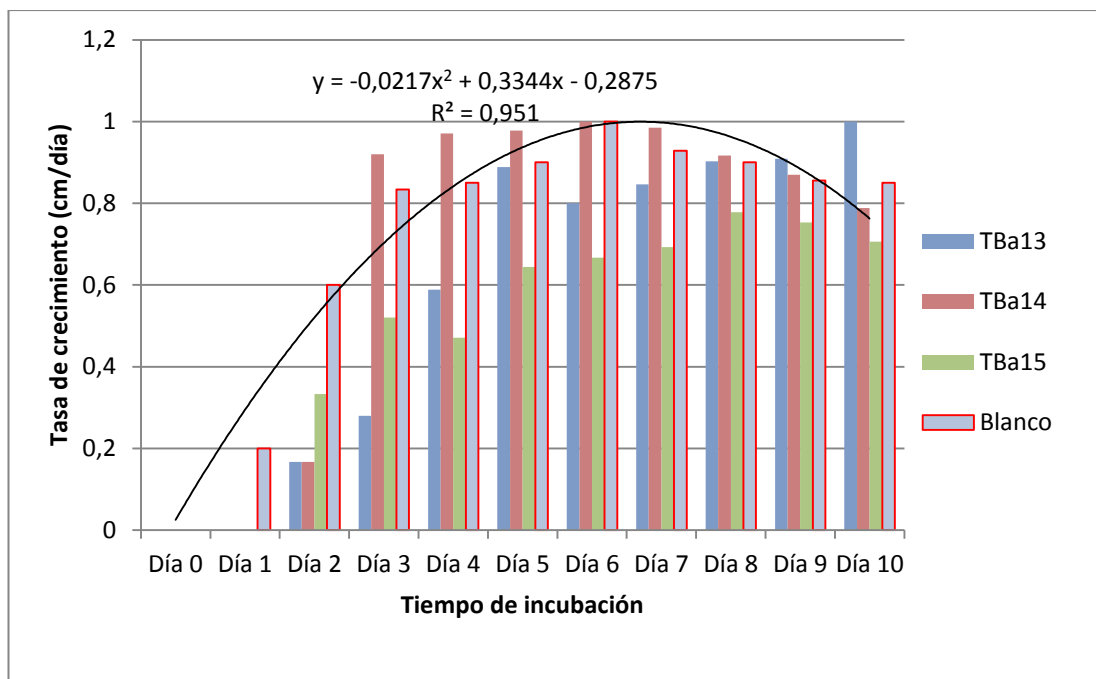


Figura 23: Tasa de crecimiento micelial (TC) de *Fusarium sp* frente a las tres cepas menos efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagonista por contacto directo.

## Anexo 20

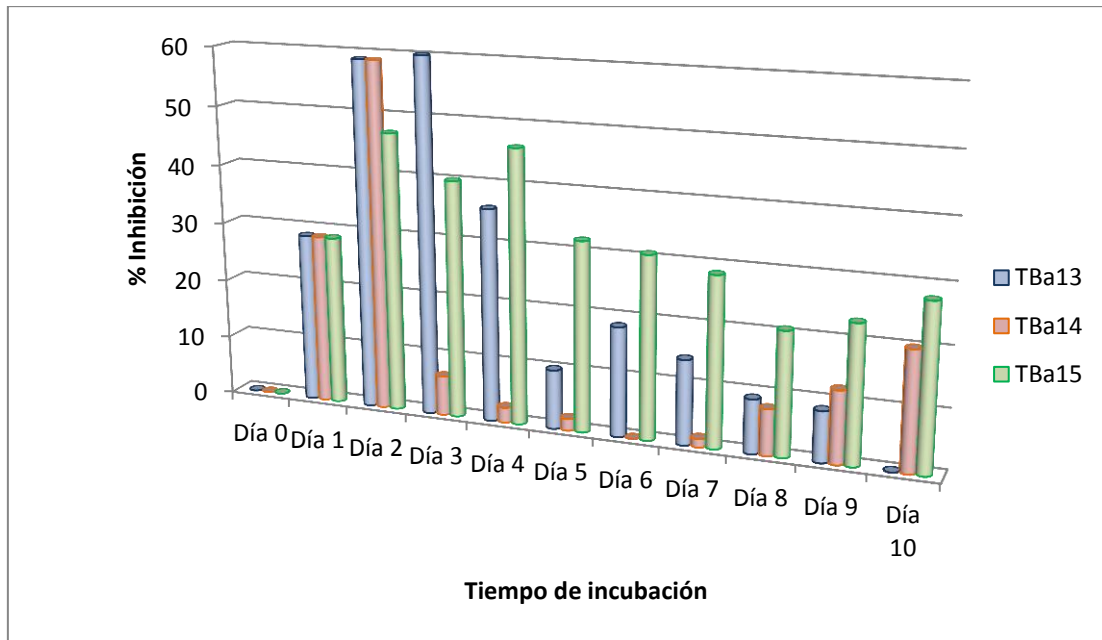


Figura 24: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp* frente a las tres cepas menos efectivas de *Bacillus sp* en prueba antagónica por contacto directo.

## Anexo 21

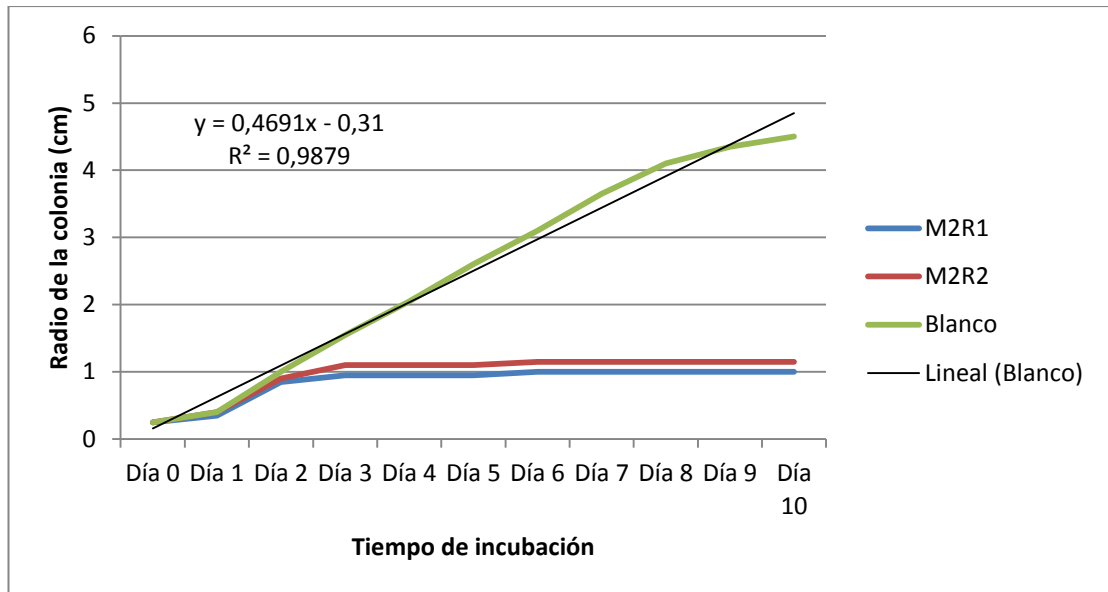


Figura 25: Curva de crecimiento radial de *Fusarium sp* frente a dos cepas de *Trichoderma sp* en prueba antagónica por cultivos duales.

## Anexo 22

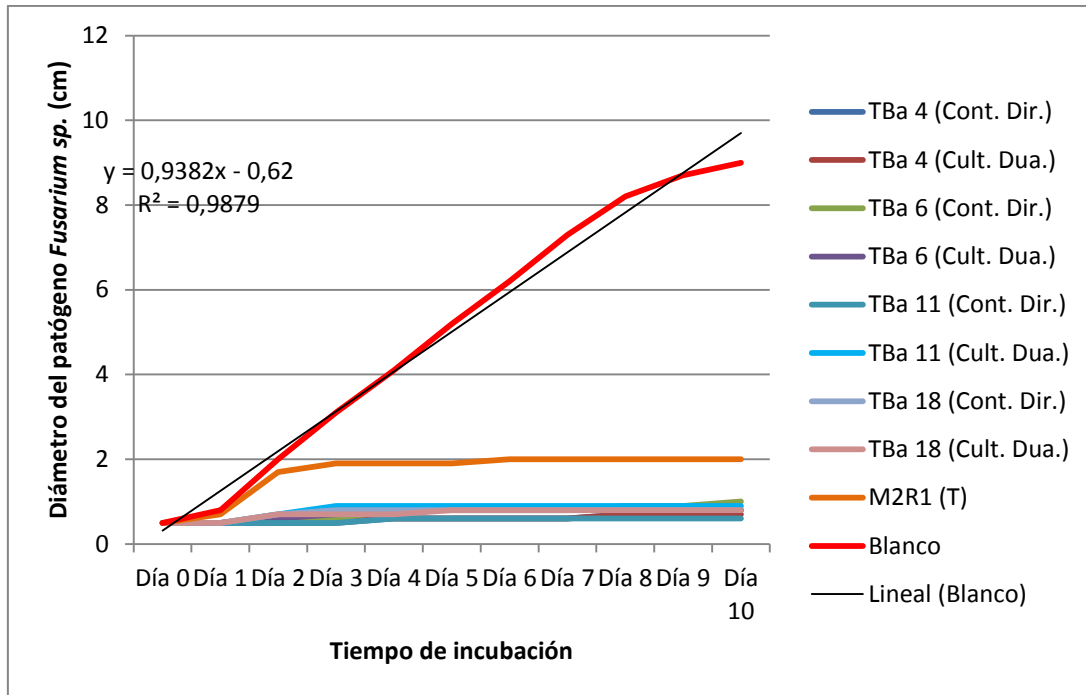


Figura 26: Comparación de las curvas de crecimiento de *Fusarium sp* frente a los antagonistas estudiados, *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* según la prueba antagonista realizada.

## Anexo 23

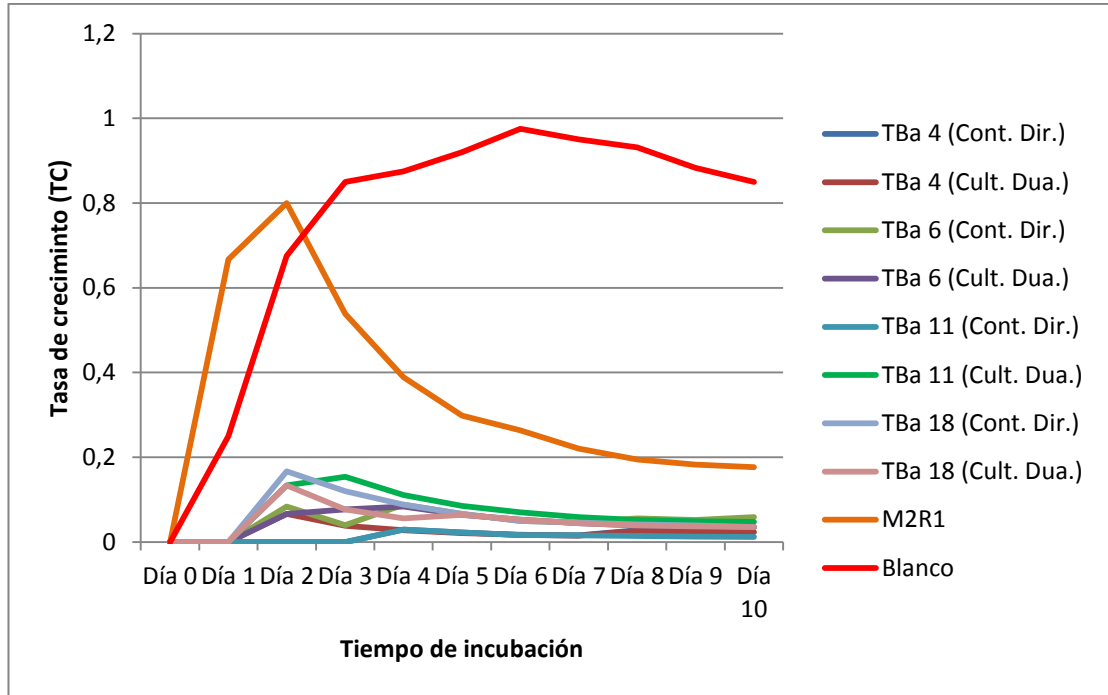


Figura 27: Comparación de la Tasa de crecimiento de *Fusarium sp* frente a los antagonistas en estudio, *Bacillus sp* y *Trichoderma sp* según la prueba antagónica realizada.

## Anexo 24

### MEDIOS DE CULTIVO GENERALES

#### 1. AGAR PAPA DEXTROSA (APD).

APD (300 mL)	
Agar	4.5 g
Dextrosa	6 g
Papa	60 g

#### 2. CALDO PAPA DEXTROSA (CPD).

CPD (1000 mL)	
Dextrosa	20 g
Papa	200 g

#### 3. AGAR NUTRITIVO (AN).

AN (100 mL)	
Agar	1.5 g
Extracto de carne	0.3 g
NaCl	0.8 g
Peptona	0.5 g



## Anexo 25

### MEDIOS COMUNES PARA IDENTIFICACIÓN DE MOHOS

#### 1. MALTA (MEA).

MEA (1000 mL)	
Agar	20 g
Glucosa	20 g
Peptona	1 g
Extracto de malta	20 g

#### 2. CZAPEK (CYA).

CYA (1000 mL)	
Agar	15 g
Sacarosa	30 g
Extracto de levadura	5 g
Solución Czapek	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g

#### 3. SOLUCIÓN CONCENTRADA DE CZAPEK.

SOLUCIÓN CZAPEK (c.s.p. 100 mL)	
NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 g

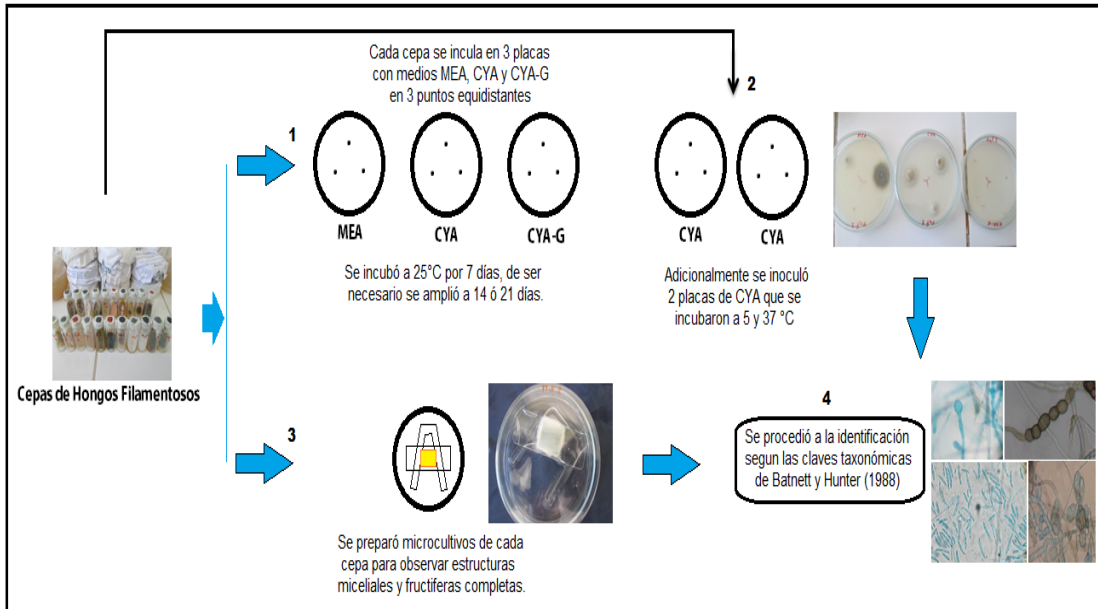
#### 4. CZAPEK – GLICEROL (CYA-G).

CYA-G (1000 mL)	
Agar	15 g
Glicerol p.a.	333.3 g
Extracto de levadura	5 g
Solución Czapek	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g

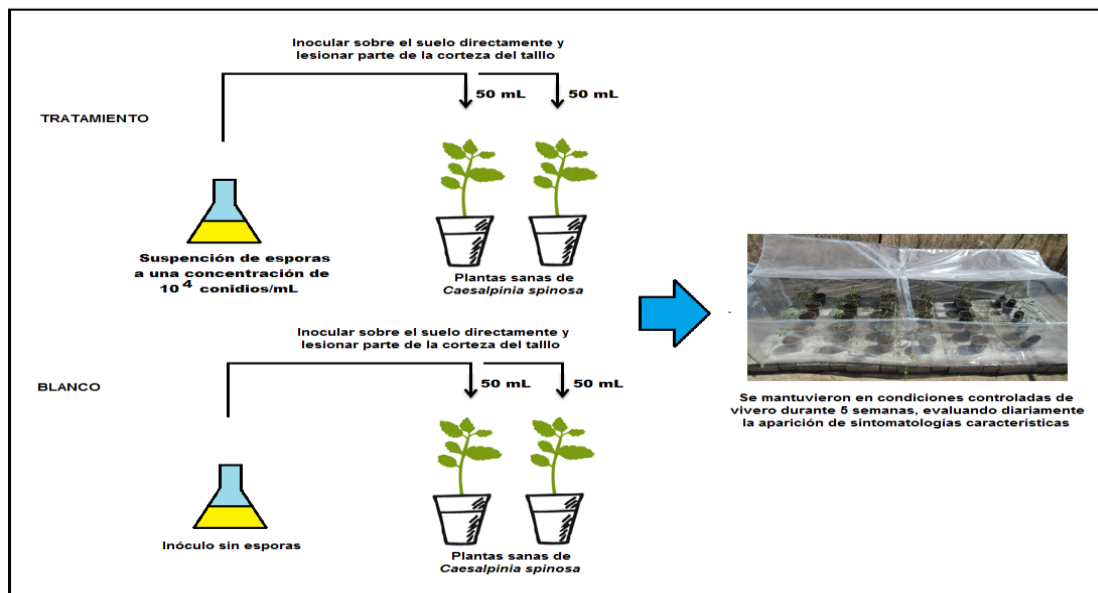
## Anexo 26

### PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN

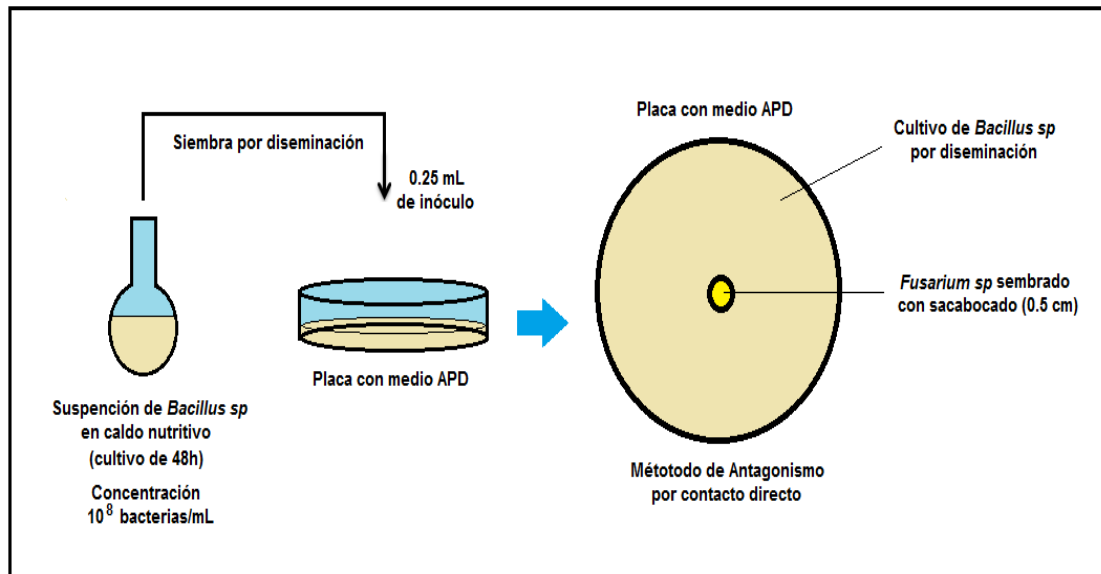
#### 1. Identificación de hongos filamentosos (Método Pitt<sup>52</sup> 1988; Dade y Gunnell<sup>69</sup> 1969; Carrillo<sup>57</sup> 2003).



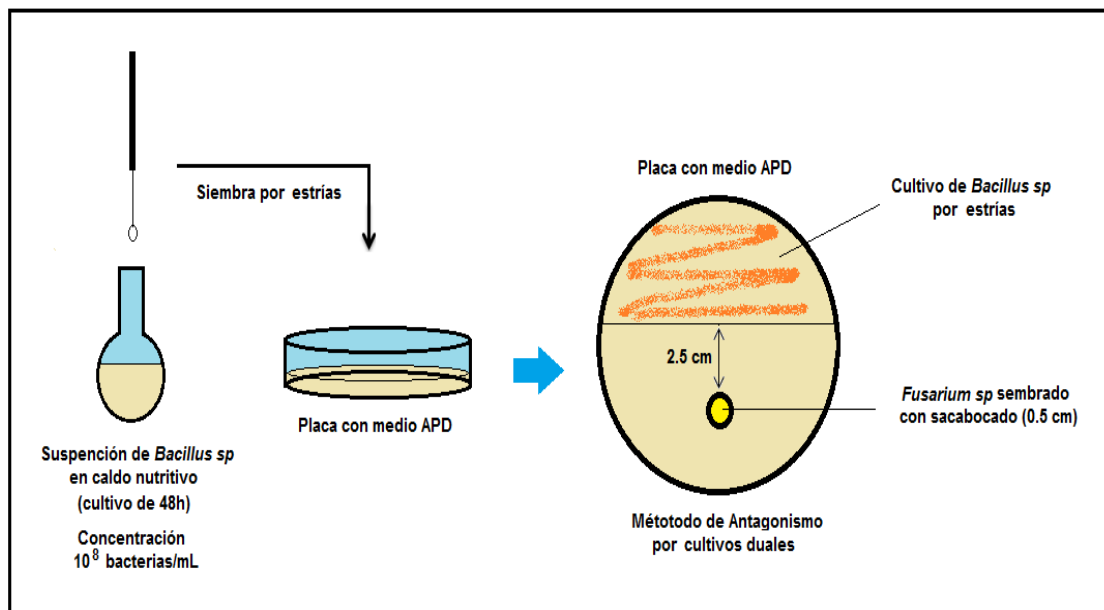
#### 2. Prueba de patogenicidad (Método Valencia-Botin<sup>58</sup> 2002; Monzón<sup>61</sup> 2000).



3. Evaluación del efecto antagónico por contacto directo (Método Mitidieri<sup>63</sup> 1988).



4. Evaluación del efecto antagónico por cultivos duales modificada (Método Acosta y Avellaneda<sup>64</sup> 2007).



**Anexo 27**  
**Matriz de consistencia**

**TÍTULO:** Identificación del agente patógeno del marchitamiento de *Caesalpinia spinosa* (tara) y el efecto antagónico de *Bacillus sp.* y *Trichoderma sp.* Huamanguilla–Ayacucho 2012.

**AUTOR:** PEREZ FLORES, DAYVI GIOMAR

**ASESOR:** GARCÍA GODOS ALCÁZAR, PAULA

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Cuál es el agente patógeno causante del marchitamiento de <i>Caesalpinia spinosa</i> y cuál es el efecto antagónico de las cepas de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i> frente al patógeno?	<p><b>Generales:</b> Identificar el género del hongo causante de la enfermedad de marchitamiento (Seca Seca) de la Tara; evaluar y diferenciar el efecto antagónico de cepas de <i>Bacillus sp.</i> y <i>Trichoderma sp.</i> aislados de suelos de cultivo de Tara del Distrito de Huamanguilla, Provincia de Huanta, frente a este.</p> <p><b>Específicos:</b> 1. Aislar e identificar el agente patógeno causante del marchitamiento de la Tara del Distrito de Huamanguilla. 2. Aislar e identificar bacterias del género <i>Bacillus</i> de suelos de cultivo de Tara del Distrito de Huamanguilla. 3. Aislar e identificar hongos del género <i>Trichoderma</i> de suelos de cultivo de Tara del Distrito de Huamanguilla. 4. Determinar el efecto antagónico de <i>Bacillus sp.</i> frente al patógeno. 5. Determinar el efecto antagónico de <i>Trichoderma sp.</i> frente al patógeno.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organismos antagonistas.</li> <li>- Características del género <i>Bacillus</i>.</li> <li>- Características del género <i>Trichoderma</i>.</li> <li>- Características del patógeno.</li> <li>- Marchitamiento o "Seca seca".</li> <li>- Control biológico.</li> </ul>	<p>Hongos del género <i>Fusarium</i> es el causante de la enfermedad de marchitamiento "Seca Seca" de <i>Caesalpinia spinosa</i> "tara". Las bacterias del género <i>Bacillus</i> y los hongos del género <i>Trichoderma</i>, presentan alto efecto antagónico en distinto grado frente al crecimiento del hongo.</p>	<p><b>Variables Independientes:</b> - Cepas de <i>Bacillus sp.</i> - Cepas de <i>Trichoderma sp.</i></p> <p><b>Indicadores:</b> - Especies nativas de la Localidad de Yanapampa, Distrito Huamanguilla, Provincia Huanta, Región Ayacucho.</p> <p><b>Variables Dependientes:</b> - Efecto antagónico contra el fitopatógeno de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), causante del marchitamiento.</p> <p><b>Indicadores:</b> - Crecimiento y desarrollo del hongo fitopatógeno frente a cepas de <i>Bacillus sp.</i></p>	<p><b>Tipo de Investigación:</b> Básica.</p> <p><b>Nivel de Investigación:</b> Explicativa</p> <p><b>Método:</b> Analítico.</p> <p><b>Diseño Experimental:</b> Estadístico. Univariable.</p> <p><b>Muestra:</b> 15 muestras de plantas enfermas y 15 muestras de suelo tomados de 3 campos de cultivo de la Localidad de Yanapampa, Distrito Huamanguilla, Provincia Huanta, Región Ayacucho.</p>