

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

HUÁNUCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



EFFECTO DE Trichoderma harzianum EN EL CONTROL DE Botrytis cinerea EN GRANADILLA (Passiflora ligularis Juss) EN CONDICIONES CLIMÁTICAS DE MIRAFLORES, MOLINO.

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRONOMO

LAURENCIO AQUINO, JUAN CLAYDER

HUÁNUCO – PERÚ

2015

A mis padres por su bondad y esfuerzo prefirieron sacrificar su bienestar para que yo pudiera cumplir con mi objetivo; me inspiraron a ser mejor persona.

AGRADECIMIENTO

A los profesores de la Escuela Académica Profesional de Agronomía por sus sabios enseñanzas para afrontar problemas del sector agrario.

A la institución ONG Islas de Paz por contribuir con la investigación, ya que sin su apoyo económico no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A la Ingeniera Elsa Lola Ospino Martín por su apoyo incondicional en la instalación de la tesis, por sus sugerencias, exigencias, disciplina y conocimiento constante que permitieron llegar a la culminación del presente trabajo de investigación.

A mi asesora Mg. María Betzabé Gutiérrez por su apoyo desinteresado al guiarme en la investigación con disciplina y ejemplo para formar un profesional con ética.

A los agricultores granadilleros en especial para Neva Lino Alania por ceder un espacio de su cultivo para realizar la investigación.

A la UNHEVAL por ser una casa de estudios generadora de profesionales de prestigio.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado “Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Botrytis cinerea* en granadilla (*Passiflora ligularis*) en condiciones climáticas de Miraflores - Molino”, se realizó durante los meses de diciembre del 2013 a mayo del 2014 en campo granadillero de la señora Neva Lino Alania, asignado por la Organización No gubernamental (ONG) Islas de Paz. El objetivo general del estudio fue determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Botrytis cinerea* de granadilla en condiciones climáticas de Molino, el trabajo de investigación fue experimental en forma de diseño de bloques completamente al azar (DBCA) constituido por 4 tratamientos y 3 repeticiones; se evaluaron la incidencia de *Botrytis* en flores y frutos cuajados por cada tratamiento. El trabajo de campo consistió en seleccionar 10 flores y 5 frutos cuajados cada 14 días por tratamiento; la primera evaluación a 7 días y la segunda evaluación a 14 días después de la señalización de muestras, la evaluación en sí consistió en contar número de flores y frutos cuajados que presentaron signo de *Botrytis*, número de flores y frutos cuajados que presentaron otro síntoma y número de flores y frutos cuajados que estuvieron sanos, mientras que la frecuencia de aplicación de *Trichoderma harzianum* se realizó cada 7 días desde el inicio de la investigación. Se evaluaron 2 parámetros, incidencia de *Botrytis* en flores e incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados. Los resultados

obtenidos en el primer parámetro presentaron mayor incidencia de *Botrytis* el tratamiento 1 o tratamiento testigo (sin aplicación) con porcentaje de 59.67 %, el Tratamiento 2 (T2 = 1 kg de *Trichoderma harzianum*) presentó menor incidencia que el resto de los tratamientos con incidencia de 58 %; el T4 (3 kilogramos de *Trichoderma harzianum*) y el T3 (3 kilogramos de *Trichoderma harzianum*) presentaron 59 % y 58.33 % de incidencia respectivamente. Los resultados obtenidos en el segundo parámetro (incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados) presentó mayor incidencia el Tratamiento 1 o tratamiento testigo (sin aplicación del hongo antagónico) con 90.67% de incidencia, el tratamiento 2 (T2) presentó 89.33 % de incidencia del patógeno, el tratamiento 3 (T3) presentó incidencia de *Botrytis* 90%, el que presentó menor incidencia fue el T4 (3 kilogramos de *Trichoderma harzianum*) con incidencia de 87.33 %. Estadísticamente los resultados obtenidos son iguales no habiendo diferencia estadística por lo que no se puede aún recomendar con estas dosis.

ABSTRACT

This research work entitled "Effect of *Trichoderma harzianum* to control *Botrytis cinerea* on fruit (*Passiflora ligularis*) in Miraflores weather - Mill" was held during the months of December 2013 to May 2014 in the field granadillero Mrs. Neva Lino Alania, assigned by the nongovernmental organization (NGO) Peace Islands. The overall objective of the study was determine the effect of *Trichoderma harzianum* to control *Botrytis cinerea* of passion in climatic conditions of Molino, the research was experimental in form of complete block design at random (DBCA) consisting of 4 treatments and 3 repetitions; the incidence of Botrytis on flowers and fruits coagulated each treatment were evaluated. The field work was to select 10 flowers and fruits set in May every 14 days per treatment; the first evaluation to 7 days and the second evaluation 14 days after signaling samples, evaluation itself consisted of counting the number of flowers and fruit set that showed signs of Botrytis, number of flowers and fruit set and presenting other symptoms number of flowers and set fruits that were healthy, while the frequency of application of *Trichoderma harzianum* was done every 7 days from the start of the investigation. 2 parameters, incidence of *Botrytis* on flowers and incidence of Botrytis in fruit set were evaluated. The results obtained in the first parameter Botrytis higher incidence of treatment 1 or control treatment (no application) with percentage of 59.67%, Treatment 2 (T2 = 1 kg of

Trichoderma harzianum) showed a lower incidence than all other treatments incidence of 58%; T4 (3 kg of *Trichoderma harzianum*) and T3 (3 kg of *Trichoderma harzianum*) showed 59% and 58.33% incidence respectively. The results obtained in the second parameter (incidence of *Botrytis* in fruit set) presented higher incidence Treatment 1 or control treatment (without application of the antagonistic fungus) with 90.67% incidence, treatment 2 (T2) presented 89.33% incidence of the pathogen Treatment 3 (T3) presented *Botrytis* incidence of 90%, which showed a lower incidence was T4 (3 kg of *Trichoderma harzianum*) with incidence of 87.33%. Statistically, the results are the same no statistical difference so that you cannot even recommend these doses.

ÍNDICE

	pág
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1. Fundamentación teórica.....	16
2.1.1. Origen de la granadilla.....	16
2.1.1.1. Flor de la granadilla.....	19
2.1.1.2. Enfermedades dela granadilla.....	19
2.1.2. <i>Botrytis cinerea</i>	19
2.1.2.1. Morfología.....	21
2.1.2.2. Ecología de <i>Botrytis cinerea</i>	22
2.1.2.3. Conservación y diseminación.....	23
2.1.2.4. Proceso de infección.....	24
2.1.2.5. Ciclo de vida.....	25
2.1.2.6. Síntomas y signos.....	26
2.1.3. Alternativas de control.....	27
2.1.4. Control biológico de <i>Botrytis cinerea</i>	28
2.1.5. <i>Trichoderma harzianum</i> en el control biológico.....	29
2.1.5.1. Clasificación taxonómica.....	30
2.1.5.2. Características morfológicas.....	30
2.1.5.3. Ecología.....	31
2.1.5.4. Mecanismos de acción.....	32
a. Competencia.....	32
b. Antibiosis.....	33
c. explotación.....	34
2.2. Antecedentes.....	37
2.3. Hipótesis.....	39
2.4. Variables.....	39

III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1	tipo y nivel de investigación.....	40
3.1.1.	Tipo de investigación.....	40
3.1.2.	Nivel de investigación.....	41
3.2	lugar de ejecución.....	40
3.2.1.	Ubicación política.....	40
3.2.2.	Posición geográfica.....	41
3.3.	Condiciones climáticas.....	41
3.3.1.	Clima.....	41
3.3.2.	Suelo.....	41
3.4.	Población, muestra y unidad de análisis.....	42
3.4.1.	Población.....	42
3.4.2.	Muestra.....	42
3.4.3.	Tipo de muestra.....	42
3.4.4.	Unidad de análisis.....	42
3.5.	Factores y tratamiento en estudio.....	43
3.6.	Prueba de hipótesis.....	43
3.6.1.	Diseño de la investigación.....	43
3.6.2.	Datos registrados.....	48
3.6.2.1.	Incidencia <i>Botrytis</i> en flores.....	48
3.6.2.2.	<i>Botrytis</i> en frutos cuajados.....	48
3.6.3.	Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información.....	49
3.6.3.1.	Técnicas de recolección de datos.....	49
a.	Técnicas de investigación documental o bibliográfica....	49
b.	Técnicas de recolección de información de campo.....	49
3.6.3.2.	Instrumentos de recolección de información.....	50
a.	Instrumentos de investigación documental y bibliográfica	50
b.	Instrumentos de recolección de información de campo...	50

3.7. Materiales y equipos.....	51
3.7.1. Equipo.....	51
3.7.2. Insumos.....	51
3.7.3. Materiales.....	51
3.8. Conducción de la investigación.....	51
3.8.1. Adquisición de insumos y materiales para la investigación	51
3.8.2. Señalización de bloques y tratamientos.....	52
3.8.3. Señalización de las muestras	52
3.8.4. Proceso de preparación para la aplicación.....	52
3.8.5. Aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i>	53
3.8.6. Evaluación.....	53
3.8.7. Trabajo de gabinete.....	54
IV. RESULTADOS.....	55
4.1. Incidencia de <i>Botrytis</i>	55
4.2. Análisis estadístico de la incidencia.....	56
4.1.1. <i>Botrytis</i> en flores.....	56
4.1.2. <i>Botrytis</i> en frutos cuajados	59
V. DISCUSIÓN.....	62
5.1. Incidencia de <i>Botrytis</i> en flores.....	62
5.2. Incidencia de <i>Botrytis</i> en frutos cuajados.....	62
VI. CONCLUSIONES.....	64
VII. RECOMENDACIONES.....	65
VIII. LITERATURA CITADA.....	66
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Duración de las etapas desde la aparición del botón floral hasta la madurez de la fruta.....	17
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	20
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i>	30
Tabla 4. Tipos de efectos antagónicos en la regulación biológica de las enfermedades.....	36
Tabla 5. Tratamientos en estudio.....	43
Tabla 6. Analices de varianza.....	44
Tabla 7. Porcentaje de incidencia de <i>Botrytis en flores</i>	55
Tabla 8. Porcentaje de incidencia de <i>Botrytis</i> en frutos cuajados.....	55
Tabla9. Análisis de varianza para incidencia de <i>Botrytis</i> en flores.....	56
Tabla 10. Prueba de significancia de Duncan para incidencia de <i>Botrytis</i> en flores.....	57
Tabla 11. Análisis de variancia para la incidencia de <i>Botrytis</i> en frutos cuajados.....	59
Tabla 12. Prueba de significancia de Duncan para interpretación de incidencia de <i>Botrytis</i> en frutos cuajados.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Botrytis</i> en fruto cuajado de la granadilla.....	20
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	25
Figura 3. Vista microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	31
Figura 4. Croquis del campo experimental.....	46
Figura 5. Parcela experimental.....	47
Figura 6. Incidencia de <i>Botrytis</i> en flores.....	58
Figura 7. Incidencia de <i>Botrytis</i> en frutos cuajados por ANE.....	61

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de evaluaciones <i>Botrytis</i> en frutos cuajados	69
Anexo 2. Resultados de evaluaciones <i>Botrytis</i> en flores.....	69
Anexo 3. Presentación de <i>Trichoderma harzianum</i> en bolsas de kilogramo.....	70
Anexo 4. Signo de <i>Botrytis cinerea</i> en fruto cuajado de granadilla	70
Anexo 5. Insumos utilizados en la investigación.....	71
Anexo 6. Trabajo de gabinete para determinar la incidencia de <i>Botrytis</i> e flores y frutos.....	73

I. INTRODUCCIÓN

La granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) es una fruta apetecida por su sabor dulce, rica en fósforo, vitamina C y carbohidratos, tiene propiedades diuréticas y digestivas. El rendimiento promedio nacional es de 10 t/ha las regiones de mayor producción son Cerro de Pasco, que cuenta con una producción aproximada de 5,5 mil toneladas (29,4% de la producción nacional); Cajamarca con 3,3 mil toneladas (18,6%); La Libertad con 2,6 mil toneladas (14%) y Huánuco con 1,6 mil toneladas (8,4 %).

Toda causa que tienda a perjudicar la vida de la planta, influye negativamente en el bienestar de la sociedad humana, entre estas están las malezas, plagas y las enfermedades. Las enfermedades inciden en la economía del hombre y en su desarrollo social, porque no sólo reducen la cantidad (rendimiento) y la calidad de las cosechas sino también afectan la producción de las industrias al privarlas de materia prima.

La granadilla presenta problemas fitosanitarios como *Botrytis*, *Antracnosis*, mancha de la hoja o *Alternaria*, *Fusarium*, *Oídium*, etc. En general *Botrytis* representa el problema de mayor importancia, puede causar pérdidas hasta en un 90 % de producción.

En los campos granadilleros del distrito de Molino el patógeno causa pérdidas en la productividad al inocular flores y frutos cuajados como consecuencia caída de estas, si no se hace ningún manejo fitosanitario para

regular o controlar esta enfermedad va a seguir afectando al cultivo y seguirá causando impactos negativos en la economía del agricultor.

Con este trabajo experimental presentamos como alternativa la regulación biológica usando *Trichoderma harzianum*, microorganismo que se comporta como antagonista haciendo ensayos con diferentes dosis para determinar cuál es la dosis más recomendable.

Objetivo general

Determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Botrytis cinerea* en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en condiciones climáticas de Miraflores, Molino.

Objetivos específicos

Determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* si aplicamos la dosis 1 (1 kg por hectárea) en la incidencia de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de granadilla.

Determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* si aplicamos la dosis 2 (2 kg por hectárea) en la incidencia de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de granadilla.

Determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* si aplicamos la dosis 3 (3 kg por hectárea) en la incidencia de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de granadilla.

II. MARCO TEORICO

2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1.1. Origen de la granadilla

Cerdas y Castro (2003) mencionan que el origen de la granadilla es América tropical, por lo que se puede encontrar en forma silvestre desde México hasta Venezuela y de Perú a Bolivia.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2006) reporta que es originaria de América del sur, específicamente de las estribaciones de la cordillera andina desde el norte de Chile hasta Venezuela, es cultivada principalmente en Colombia, México, Bolivia, Perú, Estados Unidos y en India.

2.1.1.1. Flor de granadilla

Cerdas y Castro (2003) añaden que la flor de granadilla es de color violeta, de 7 a 10 cm de diámetro, sostenida por pedúnculo de 4 cm de largo, presentan dos flores por cada nudo, a su vez la maduración de cada par tiene una pequeña diferencia de edad, aspecto que favorece el constante ingreso de polinizadores. La apertura de las flores se inicia entre 1:30 y 2 de la mañana, alcanza la apertura total a las 4 de la mañana del mismo día y a partir de las 2 de la tarde se inicia el proceso de cierre de la flor, haya sido

polinizada o no. La granadilla presenta polinización cruzada, por lo cual la fecundación depende de los polinizadores.

Saldariaga y Garces (s.f.) citado por Rivera, et al (2002) mencionan que desde las 4 de la mañana la flor está completamente abierta hasta las 2 de la tarde, entra las 8 y 10 a.m. los estigmas ya están muy cerca de las anteras pero sin tocarlas, 6 horas después los estilos, las partes del perianto y los filamentos de la corona inician el retorno a la posición inicial; a las 2 a.m. del día siguiente, la flor tiene una disposición similar a la que tenía en el botón floral. Los estigmas son receptivos cuando se curvan hacia arriba; esto ocurre generalmente entre las 9 a.m. y 3 p.m., la fecundación se realiza ocho o nueve horas después de la de la polinización. El desarrollo del fruto se hace evidente 24 horas después de la fecundación.

Tabla 1. Duración de las etapas desde la aparición del botón floral hasta la madurez de la fruta.

ETAPA	DIAS
De botón floral a cartucho	20
De cartucho a flor abierta	1
De flor abierta a flor fecundada	1
De flor fecundada a fruto maduro	70 - 80

Fuente: Cerdas y Castro (2003)

Rivera, et al (2002) recalcan que las flores son de color violeta, vistosas y de agradable aroma; miden entre 7 y 10 cm de diámetro. Usualmente vienen dos flores por nudo, a su vez están sostenidas por un pedúnculo axilar de 4 cm al cual se adhieren brácteas que se asemejan hojas.

Saldarriaga (1998) citado por Rivera, et al (2002) señalan que los sépalos son de color blanco en el haz y verdes con márgenes blancas en el envés, de forma lanceolada y miden 4 cm de largo por 2 cm de ancho, los pétalos son tubulares blancos o rosáceos y moteados con pintas de color azul purpura, que forman una corola de 2 series con 43 pétalos al interior y al exterior, simulando una corola, las 2 series exteriores tienen filamentos largos, cilíndricos y paulatinamente adelgazados hacia la punta bordeados de blanco o purpura en la base inferior; mientras que las series interiores constan de pequeños sobresalientes en forma de tubo 2 mm de largo, blancos con manchas purpureas. La flor tiene 5 estambres unidos por su base, las anteras son planas, se unen hacia la mitad del filamento, con dehiscencia longitudinal, los pistilos son de tres carpelos abiertos y unidos en ovario unilocular, supergloboso, ovoide, con numerosos óvulos, estilos aplanados y divididos en tres ramas, cada uno con estigmas capitados que se alinean en forma horizontal.

2.1.1.2. Enfermedades de la granadilla

Mont (2002) manifiesta que la enfermedad es resultante de la interacción hospedante-patógeno influyendo el medio ambiente en dicha relación además la temperatura, la humedad, la luminosidad intervienen en la expresión de los síntomas y signos de las enfermedades.

Rivera, et al (2002) definen que la enfermedad es un proceso dinámico en el cual un hospedante y un patógeno en íntima relación con el medio ambiente, se influyen mutuamente, de lo que resultan modificaciones morfológicas y fisiológicas. Entre las enfermedades se señalan como damping – off (*Pythium sp.* y *Rhizoctonia sp.*), secadera (*Nectria haematocca* Berk), moho de los botones florales (*Rhizopus stolonifer*), moho gris de flores y frutos (*Botrytis cinerea*).

García, et al (2007) mencionan que las principales enfermedades de la granadilla son: secadera (*Fusarium sp.*), virus de la hoja morada (virus SMV), ojo de pollo (*Phomopsis sp.*), antracnosis (*Colletotrichum sp.*) y el moho gris de flores (*Botrytis sp.*).

2.1.2. *Botrytis cinerea*

Agrios (2010) menciona que la enfermedad causada por *Botrytis sp.* aparece principalmente en forma de tizones en inflorescencias y pudriciones del fruto. Añade que en caso de que algún fruto llegue a desarrollarse, el hongo se propaga desde los pétalos hacia los frutos verdes, ocasiona la

podrición basal del fruto la cual avanza y puede destruir una parte o todo el fruto o bien puede extenderse hacia otros frutos que entran en contacto.



Figura 1. *Botrytis* en fruto cuajado de granadilla (fuente elaboración propia)

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*

Reino	: <i>Fungi</i>
División	: <i>Deuteromycota</i>
Clase	: <i>Hyphomycetes</i>
Orden	: <i>Moniliales</i>
Familia	: <i>Moniliaceae</i>
Género	: <i>Botrytis</i>
Especie	: <i>Botrytis cinerea</i>

Fuente: Agrios (2010)

2.1.2.1. Morfología

(Edlich *et al.*, 1989; Agrios, 1997) citado por Rivera (2007) indica que *B. cinerea* produce conidias multinucleadas, hialinos o levemente coloreados, unicelulares, ovoides o esféricas, sobre el extremo de conidióforos ramificados. El patógeno posee hifas septadas ramificadas (Agrios, 1997) y forma una variedad de estructuras de penetración, incluyendo apresorios, con los cuales invade la epidermis del tejido vegetal (Salinas, 1986). Además las especies del género *Botrytis* producen esclerocios que actúan como estructuras de resistencia para proteger al patógeno de las condiciones climáticas desfavorables.

Smith (1992) citado por Cotrina (2001) manifiesta que el patógeno *Botrytis sp.* produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoidales unicelulares, incoloras o de color gris a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros de color negro. Barnett (1972) citado Cotrina (2001) indica que *Botrytis cinerea* presenta conidióforo largo, delgado, hialino o pigmentado, algunas veces dicotómicos (se divide en dos) cerca del ápice; conidios hialinos o color cenizo, en mazas de color gris, unicelular, ovoide, frecuentemente produce esclerotes oscuros de forma irregular.

2.1.2.2. Ecología de *Botrytis cinerea*

Agrios (2010) añade que en condiciones húmedas, el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados; cuando el clima es húmedo y fresco, el micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones, pero el micelio también se desarrolla, penetra e invade al resto de la inflorescencia, la cual se llena y cubre con un moho de color gris blanquizco o café claro, entonces el hongo avanza hacia el pedicelo, el cual se pudre y permite que las yemas y flores cuelguen. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos períodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10 °C.

Álvarez (1995) citado por Cotrina (2001) recalca que la temperatura óptima de esporulación de *Botrytis cinerea* es de 17 – 18 °C, muy poca esporulación a los 25 °C y no se observa esporulación a los 30 °C.

Rivera (2007) manifiesta que las condiciones en que el proceso de infección ocurre dejan en evidencia la gran adaptabilidad del patógeno. Se ha reportado que las conídias germinan a una humedad relativa de más de un 90 % y a un rango de temperatura entre 1 y 30 °C, con un óptimo entre 18 y 20 °C. esta flexibilidad extrema conlleva a que un cierto nivel de

inóculo exista en casi todas partes y a que la extensión epidemiológica de la enfermedad pueda ser inhibida sólo cuando prevalecen condiciones secas.

2.1.2.3. Conservación y diseminación

Agrios (2010) indica que en ocasiones el patógeno forma esclerotes de color negro que se desarrolla sobre o debajo de la epidermis del tejido infectado de color negro sobre la superficie del tejido, *Botrytis cinerea* inverna también en el suelo en forma de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición al ser un parasito facultativo. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado, menciona que en la etapa de invernación se propagan mediante cualquier cosa que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo. Este último requiere de un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23 °C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germinen sus esporas para que produzca infección.

Smiith (1991) citado por Cotrina (2001) añade que *Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocio (masa compacta de hifas, por lo común con una cubierta oscura y capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables) o en micelio, el cual se desarrolla sobre los restos de plantas en proceso de descomposición (saprófago) este último

requiere de un clima húmedo y moderado frío (18 – 23 °C) para que se desarrolle adecuadamente. Asimismo añade que los esclerotes de *Botrytis cinerea* germinan produciendo filamentos miceliales que infectan directamente a los tejidos del hospedante y en algunos casos estos germinan produciendo apotecios y ascosporas.

2.1.2.4. Proceso de infección

Rivera (2007) cita a **Agrios (1997)**, **La Torre (2002)** y **Salinas et al (1986)** para indicar que el proceso de infección consta de 4 etapas, en la primera ocurre la adherencia de las conidias a la superficie vegetal, luego comienza el proceso de germinación, en el que las conidias dormantes produce el tubo germinativo, el cual al entrar en contacto con el tejido hospedero forma la hifa de infección. Los tubos germinativos penetran al tejido de la planta hospedera generalmente a través de heridas o por aperturas naturales (estomas o lenticelas). Finalmente se produce la invasión de las células adyacentes hasta abarcar la totalidad del tejido.

Agrios (2010) recalca que las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero penetran en los tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores. Por lo común, los esclerocios de *Botrytis* germinan produciendo filamentos miceliales que infectan directamente a los

tejidos del hospedante, pero en algunos casos dichos esclerocios germinan produciendo apotecios y ascosporas.

2.1.2.5. Ciclo de vida

Rivera (2007) menciona que *B. cinerea* es un hongo parásito facultativo, por lo cual pueda crecer como saprófito en tejidos necróticos o bien como parásitos.

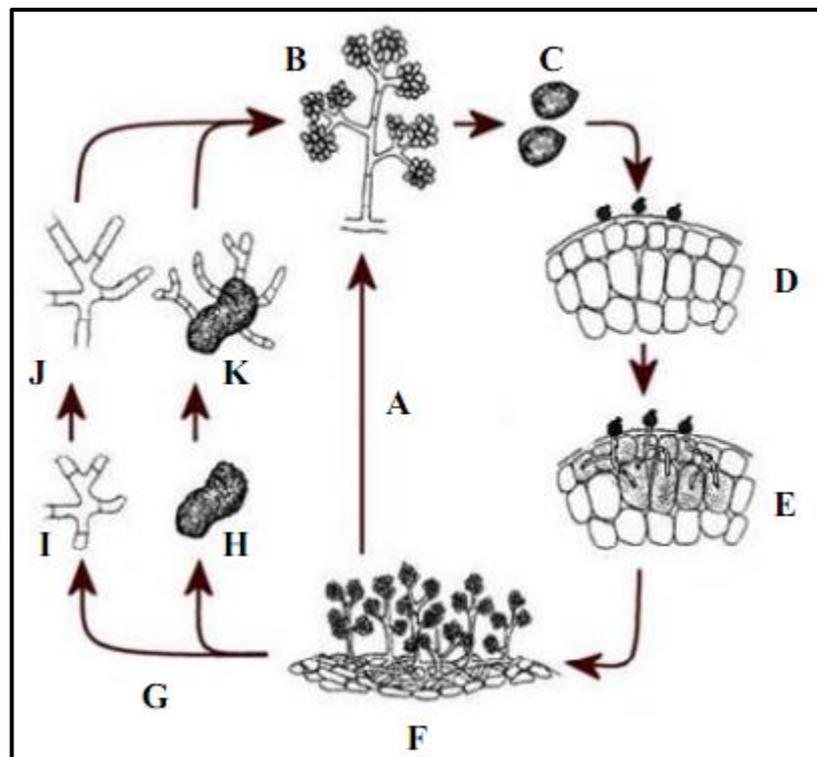


Figura 2. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* Pers. A) Ciclo de verano; B) conidióforos; C) conidias; D) conidias adheridas al hospedero; E) las conidias germinan, y los tubos germinativos penetran e invaden el tejido vegetal; F) conidióforos producidos en el tejido vegetal infectado; G) después del invierno; H) esclerocios; I) micelio; J) el micelio crece para formar

conidióforos y K) los esclerocios germinan para producir micelio, el cual producirá conidióforos. Adoptado de Agrios (1997)

Durante la época invernal es posible detectar al hongo en forma de micelio en tejido vegetal en descomposición, o como esclerocios. Pasado el invierno, el micelio crece y los esclerocios germinan para producir micelio, el cual produce conidióforos hasta llegar al hospedero y bajo condiciones climáticas favorables, comienza el proceso de infección. Una vez que las conidias entran en contacto con el hospedero, están produciendo micelio, el cual invade el tejido provocando la desintegración de las células vegetales, el tejido se ablanda y se pudre. El micelio en el tejido infectado vuelve a producir conidióforos y se libera nuevas conidias. El proceso continúa y al invierno siguiente el hongo vuelve al estado de hibernación (agrios, 2010)

2.1.2.6. Síntoma y signo

Cuando la enfermedad se presenta en botones florales y en los frutos, se observa un moho de color café claro que afecta los pistilos en la flor ya fecundada. En los frutos recién formados, el moho afecta el pedúnculo y la base del fruto (**Tamayo y Bernal, 2001 citado por Rivera, et al. 2002**).

Agrios (2010) menciona que las enfermedades causadas por *Botrytis* aparecen principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones de fruto, ocasiona también las pudriciones blandas secundarias de fruto. *B. cinerea* produce un micelio blanquecino y de aspecto lanoso en

el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación, lo que puede ocurrir dentro de unos pocos días luego de que la infección se ha iniciado, debido a esto, las enfermedades causadas por este hongo son comúnmente denominadas “pudrición gris” **(La Torre citado por Rivera 2007)** la flor es la principal parte de la planta que afecta este hongo, se mantiene en forma de un moho gris y luego las flores caen **(Cerdas y Castro 2003)**.

Quezada (2011) menciona que los síntomas difieren según la especie atacada y la succulencia del tejido afectado aunque en general se producen lesiones de aspecto húmedo y coloración grisácea, que componen la maceración de los tejidos.

2.1.3. Alternativas de control

Las diferentes maneras de afrontar una enfermedad para llevarla hasta su mínima expresión dentro de los métodos de control de enfermedades es posible considerar los siguientes: biológico; cultural, químico, físico y legislativo **(Mont 2002)**.

La mayoría de las enfermedades en campo son manejadas con sustancias de origen químico; las pesticidas, los cuales se aplican en el suelo, semillas, follaje y frutos. Los mayores problemas que se presentan por el uso de estos productos químicos son: el deterioro de la salud humana y del ambiente, la resistencia por parte de los patógenos a los fungicidas y la

residualidad de estos productos que contaminan el agua, el suelo, plantas y animales, esta situación ha provocado la búsqueda de otras formas de control (**Memeza 2009**).

2.1.4. Control biológico de *B. cinerea*

Hoyos (2011) indica que en fitopatología el término control biológico se aplica al “uso o manipulación de organismos vivos, nativos o introducidos que estimulen la resistencia de la planta o supriman la actividad en la poblaciones de uno o más fitopatógenos”. Sin embargo es importante entender que el control biológico, por ser biológico dista mucho de ser control, y pasa a ser un fenómeno de modulación o regulación.

Cualquier condición o práctica por medio del cual la supervivencia o actividad del patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad (**Garret citado por Mont 2002, Memeza 2009**).

Agrios (2010) menciona que el control biológico de los patógenos, es la destrucción total o parcial de las poblaciones de los patógenos por medio de otros organismos, frecuentemente ocurren en la naturaleza.

Melgarejo, et al (2005) hace referencia a **Baker y Cook (1974)** para definir que el control biológico es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de la enfermedad de un patógeno o un parasito.

Lo que aclara es que en el control biológico existe un tercer elemento vivo (junto con huésped y patógeno), que es el antagonista.

2.1.5. *Trichoderma harzianum* en el control biológico

Hoyos (2011) menciona que las especies del género *Trichoderma* son abundantes en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en material en descomposición en suelos, se caracteriza por incluir especies de crecimiento rápido y capacidad para asimilar una diversa gama de sustratos.

Memenza (2009) indica que la importancia de este hongo se fortaleció recién a partir de la aparición de problemas ecológicos y económicos, al rápido desarrollo de la biotecnología en agricultura, y al reconocimiento de *Trichoderma* como un buen agente de biocontrol por su amplia distribución en la naturaleza, su fácil aislamiento y cultivo, su crecimiento rápido sobre muchos sustratos; por poseer diferentes modos de acción contra los fitopatógenos.

Se conoce pocos casos exitosos del control biológico de fitopatógenos del follaje o parte aérea de la planta en la naturaleza, debido a que el biocontrol en este hábitat es más difícil que se logre y por consiguiente muchos factores, entre ellos: un adecuado hábitat para el crecimiento de agentes de biocontrol, que estos sean capaces de atacar a los patógenos y conocer los mecanismos de antagonista; sin embargo entre los antagonistas evaluados contra patógenos de la parte aérea de la planta tienen resultados

satisfactorios se encuentran varias especies del género *Trichoderma* (Andrews 1980 citado por Memenza 2009).

2.1.5.1. Clasificación taxonómica

Tabla N° 3. Clasificación taxonómica de *T. harzianum*

Reino	: <i>Fungi</i>
División	: <i>Deuteromycota</i>
Clase	: <i>Hyphomycetes</i>
Orden	: <i>Moniliales</i>
Familia	: <i>Moniliacea</i>
Género	: <i>Trichoderma</i>
Especie	: <i>T. harzianum</i>

Fuente: agrios (2010)

2.1.5.2. Características morfológicas

Las características morfológicas del género *Trichoderma* son: conidióforos hialinos muy ramificados no verticilados, fialides individuales o en grupo, conidios hialinos o verde oscuro profundo cercano a gris pasando por verde y verde amarillo, unicelulares de forma ovoide, globosa o sub globosa, elipsoidal u oblonga, nacidas en pequeños racimos terminales, menores a 5 µm de diámetro (Samuels, 1996 citado por Memenza 2009). Las conidias de *Trichoderma harzianum* rifae son verdes de forma subglobosas a ovoides cortas de 2.4 - 3.2 x 2.8 µm.

Quinche (2009) citado por Castro (2007) para indicar que *Trichoderma harzianum* presenta conidióforos gruesos y cortos recogidos en penachos, con ramificaciones casi de ángulo recto, conidias globosas, sub globosas o sub ovoidales; con una relación largo ancho menor de 1.25 y dimensiones de 2.8 – 3.2 x 2.5 – 2.8 μm .



Figura 3. Vista microscópica de *Trichoderma harzianum* (Quinche 2009)

2.1.5.3. Ecología

Trichoderma sp., es un habitante natural del suelo, pero también se encuentra en partes aéreas de plantas; en humus forestales, en madera en descomposición, en superficies radiculares de varias plantas sobre corteza caída especialmente cuando es dañada por otros hongos (Davet, 1979; Wells *et al.*, 1972 citado por Memenza, 2009). Su desarrollo es influenciado

por condiciones ambientales, de acuerdo al tipo de suelo, temperatura y contenido de humedad; la mayoría son mesófilos (25° C), esa especie sobrevive más tiempo en suelos húmedos que en suelos secos (Macas, 1994 citado por quinche 2009).

2.1.5.4. Mecanismos de acción

Los aspectos más resaltantes del control biológico son los mecanismos de acción empleados por especies de *T. harzianum* en el control de enfermedades de plantas, así Papavizas, (1985); Fravel, (1988), citado por Memenza (2009) clasifican los mecanismos de acción de *Trichoderma* en competencia, antibiosis y micoparasitismo. Además inducen a la resistencia a la planta hospedera, al estimular las defensas naturales en raíces y hojas

Belanger *et al* (1993) citado por Ferreta y Alarcón (2007) hace mención que dentro de los mecanismos de acción implicados en el biocontrol se encuentra: antibiosis, competencia, explotación.

a. Competencia

Mont (2002) indica que es el efecto dañino sobre otro por la interferencia en el uso de algunos recursos del medio ambiente. Una gran variedad de microorganismos colonizan la superficie de las plantas, para soportar el crecimiento de estos microorganismos, las plantas emanan

nutrimentos, principalmente nitrógeno, hierro y factores de crecimiento; cuando estos no son suficientes surge la competencia entendida como el esfuerzo de 2 o más microorganismos para adquirir nutrientes y espacio (sitio de acción) que cada uno necesita de tal forma que la causa más común de la muerte de los microorganismos es por inanición (Garret, 1965 citado por Quinche 2009), ya que muchos de estos requieren de nutrientes exógenos para germinar, penetrar e infectar el tejido del hospedero.

(Ferreta y Alarcón 2007: 367) mencionan la competencia por nutrientes, espacio o sitio de infección es otro de los mecanismos implicados en el biocontrol.

b. Antibiosis

(Ferreta y Alarcón 2007: 348) recalcan que los antagonistas producen metabolitos tipo antibióticos, estos se definen como un grupo químicamente heterogéneo y de bajo peso molecular, secretados por algunos microorganismos que, en bajas concentraciones, demeritan el crecimiento o actividades metabólicas de otros organismos; el efecto de la antibiosis sobre los patógenos se manifiesta principalmente como inhibición de la esporulación, reducción del crecimiento micelial retardación de la germinación de las esporas.

(Mont 2002: 51) manifiesta que la antibiosis actúa ejerciendo un efecto biocida hacia muchos microorganismos patógenos, que es

determinada por factores diversos como tipo de suelo, pH, esterilización, la presencia de sustancias orgánicas.

c. Explotación

Mont (2002) indica que es conocida también como predación o parasitismo, es el fenómeno por la cual unos microorganismos viven a expensas y en detrimentos de otros microorganismos

La forma más común que tiene el *Trichoderma* de parasitar a otros hongos, es el parasitismo directo; lo cual se logra envolviendo las células del hongo (hifas) a parasitar (huésped) en forma de tirabuzón. Además, *Trichoderma* secreta enzimas (celulosas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped, facilitando la inserción de las estructuras especializadas y del micelio de *Trichoderma*, los que se encargan de absorber los nutrientes del interior del hongo huésped. Al final del micelio del hongo parasitado queda vacío y con perforaciones provocadas por la inserción de las estructuras especializadas de *Trichoderma* (castro 2007 citado por Quinche 2009)

(Mont 2002: 52) menciona que es conocido también como predación o parasitismo, es el fenómeno por lo cual unos microorganismos viven a expensas y en detrimento de otros microorganismos.

Barnet (1964) citado por (Ferreta y Alarcón 2007: 367) menciona que el parasitismo es una forma común de asociación entre muchos grupos de organismos heterotróficos que involucra una relación nutricional en la cual se

ve desfavorecida el que se le identifica como parásito, la producción de enzimas parece actuar sinérgicamente debilitando la pared celular de los hongos patógenos.

Hoyos (2011) manifiesta que los mecanismos de regulación biológica pueden ser divididos en efectos directos sobre el patógeno y efectos indirectos. Los efectos directos implican contacto físico con el hospedante y una alta selectividad/reconocimiento del microorganismo blanco. Los efectos indirectos no involucran contacto o reconocimiento con este, pero modifican o modulan sus poblaciones por modificaciones en el ambiente; los efectos indirectos también pueden ser interpretados como aquellos que producen cambios morfológicos o bioquímicos en la planta hospedante.

Tabla 4. Tipos de efectos antagónicos en regulación biológica de enfermedades

Tipo de antagonismo	Modo	Mecanismo	Ejemplo
Directo	depredación	consumo de presas	nematodos depredadores
directo/indirecto	parasitismo	enzimas líticas	quitinosas, celulosas, proteasas
indirecto	inhibición	antibiosis	antibióticos
		producción de desecho no regulado	amonio, dióxido de carbono, cianuro de hidrogeno
	competencia	nutrición: consumo de exudados/lixiados	
		quitación: secuestro de hierro ocupación física de nicho	sideroforos, quelantes
		ocupación física del nicho	competencia rizosferica y/o por espacio variado e inespecifico
	favorecimiento de la planta	estimulación de rutas de defensa en la planta hospedante	resistencia sistémica inducida
		mejoramiento del estado nutricional por solución del nutrientes	sideroforos, quelantes, ácidos inorgánicos
		estimulación de crecimiento	

Fuente: Viterbo *et al* 2002; compant *et al* 2005, Mc spadden 2006 citado por Hoyos 2011.

2.2. Antecedentes

Uno de los agentes biológicos más estudiados es el fungicida T39 (trichodex) a base de esporas de *T. harzianum*; contra enfermedades de plantas aéreas, si se aplica en época de floración logra controlar al *Botrytis cinerea* Pers en arboles de manzano, reduce su incidencia hasta en un 36 % (O Nelly, 1997)

Quinche (2009) indica que obtuvo resultados favorables en fresa utilizando *Trichoderma harzianum* con dosis de 1,5 kg/ha después de la primera aplicación se redujo la incidencia de *Botrytis* a un 70 % a una altitud de 3 044 msnm a una temperatura de 15 °C con frecuencia de aplicación cada 7 días (una semana).

Alvares (2014) realizó una investigación en Colombia a 2 700 msnm. con humedad relativa de 70 % y temperatura media de 18 °C. el trabajo consistió en comparar *Trichoderma harzianum* y un fungicida cuyo ingrediente activo fue el iprodione contra *Botrytis cinerea* en la fresa con diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones la incidencia en el tratamiento con iprodione fue de 60 % mientras que en el tratamiento con *Trichoderma harzianum* solo alcanzó el 33 %; lo que indica un control mayor con los antagonistas en comparación con el químico sobre la enfermedad. La aplicación se realizó con mochila pulverizadora marca jacto 20 litros de capacidad.

Merchán *et al* (2014) la investigación realizada en el cultivo de uva ecuador a 2500 msnm con humedad relativa de 80 % y temperatura promedio 20 °C se redujo la incidencia 60 % comparado con el testigo sin aplicación de *Trichoderma harzianum* que se obtuvo como resultado de incidencia de 85 % con concentración de 1×10^8 .

Cañizales *et al* (2009) manifestó en su investigación titulado “Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos en postcosecha de la fresa (*Fragaria spp*)” que debido a sus rapidez de crecimiento de *T. harzianum* reduce el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, *Mucor spp.*, *Penicillium digitatum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium spp.* en frutos de fresa. Se ha demostrado que las aplicaciones de *T. harzianum* en uvas y manzanas reduce parcialmente la enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea* y las protege por más de dos meses en las estanterías de los supermercados e igualmente protege a las manzanas del moho azul *Penicillium expansum*.

2.3. Hipótesis

Hipótesis general

Si aplicamos *Trichoderma harzianum* a la granadilla entonces tendremos efecto significativo en el control de *Botrytis cinerea* en condiciones climáticas de Miraflores, Molino.

Hipótesis específica

Si aplicamos la dosis 1 de *Trichoderma harzianum* (1 kg por hectárea), entonces tendremos efecto significativo en el control de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de granadilla.

Si aplicamos la dosis 2 de *Trichoderma harzianum* (2 kg por hectárea), entonces tendremos efecto significativo en el control de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de granadilla.

Si aplicamos la dosis 3 de *Trichoderma harzianum* (3 kg por hectárea), entonces tendremos efecto significativo en el control de *Botrytis cinerea* en flores y frutos de granadilla.

2.4. Variables

Variable dependiente

Botrytis cinerea en flores y frutos de granadilla

Variable independiente

Trichoderma harzianum

Variable interviniente

Condiciones climáticas

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Tipo y nivel de investigación

3.3.1. Tipo de investigación

Aplicada porque se aplicó los conocimiento de la ciencia para generar tecnología (dosis más adecuadas para el control de *Botrytis*), y solucionar los problemas del agricultor dedicados al cultivo de la granadilla.

3.3.2. Nivel de la investigación

Fue experimental porque se manipuló la variable independiente (*Trichoderma harzianum*), se midió el efecto en la variable dependiente (control de *Botrytis*) y se comparó con el testigo.

3.2. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en la comunidad campesina de Callagan - Miraflores en el campo asignado por la ONG Islas de Paz, cuya ubicación y posición geográfica es la siguiente:

3.2.1. Ubicación política:

Región : Huánuco
Provincia: Pachitea
Distrito : Molino
Lugar : Callagan - Miraflores

3.2.2. Posición geográfica:

Latitud Sur : 9° 57'39"
Longitud Oeste : 76° 03' 10"
Altitud : 2659 msnm.

3.3. Condiciones climáticas

3.3.1. Clima

En concordancia con la zona de vida de "Holdrige" el distrito de Molino se encuentra en bosque húmedo montano bajo (bh-MB), según las 8 regiones naturales por el Dr. Javier Pulgar Vidal se encuentra en la región Quechua el clima es templado y agradable, con notable diferencia entre el día y la noche, el sol y la sombra.

3.3.2. Suelo

El suelo donde se ha realizado la investigación es franco, color de tierra negra, está instalada la granadilla desde hace 2 años, los cultivos que antecedieron fueron maíz y papa consecutivamente, una vez instalado el frutal se incorporó compost.

3.4. Población, muestra unidad de análisis

3.4.1. Población

La investigación se realizó con una población de 12 plantas experimentales, distribuidas en 3 bloques; a su vez con 4 tratamientos respectivamente.

3.4.2. Muestra

De las plantas seleccionadas se tomó 100 flores y 50 frutos cuajados para la evaluación, a su vez estas han sido aplicados con *Trichoderma harzianum*.

3.4.3. Tipo de muestra

El tipo de muestreo fue probabilístico en su forma muestreo aleatorio simple (MAS); porque todas las flores y frutos cuajados tuvieron la misma posibilidad de ser parte de la muestra representativa.

3.4.4. Unidad de análisis

La unidad de análisis es la dosis de *Trichoderma harzianum* Y la unidad experimental estuvo constituido por flores y frutos cuajados de granadilla; debidamente inoculada con *Trichoderma harzianum*.

3.5. Factores y tratamiento en estudio

En el presente trabajo de investigación se estudió el efecto de *Trichoderma harzianum* a diferentes dosis para el control de *Botrytis cinerea*.

Tabla 5. Tratamientos en estudio.

Factor	Tratamientos
<i>Trichoderma harzianum</i>	T1: Testigo sin aplicación
	T2: Aplicación de <i>T. harzianum</i> a dosis 1 (1 kg/ha)
	T3: Aplicación de <i>T. harzianum</i> a dosis 2 (2 kg/ha)
	T4: Aplicación de <i>T. harzianum</i> a dosis 3 (3 kg/ha)

Fuente: elaboración propia

3.6. Prueba de hipótesis

3.6.1. Diseño de investigación

Diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 3 repeticiones y 4 tratamientos, teniendo un total de 12 unidades experimentales.

Para la cual se usó la siguiente ecuación lineal.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \ell_{ij}$$

Para $i = 1, 2, 3, \dots, t$ (número de tratamientos)

$J = 1, 2, 3, \dots, r$ (número de repeticiones)

Y_{ij} = Unidad experimental que recibe el tratamiento i y está en el bloque j

μ = Media general a la cual se espera alcanzar todas las observaciones (media poblacional)

τ_i = Efecto verdadero del i ésimo tratamiento

β_j = Efecto verdadero del j ésimo bloque

ℓ_{ij} = Error experimental.

Para la prueba de hipótesis se utilizó la técnica estadística de Análisis de Varianza o prueba de Fisher (ANDEVA) al nivel de significancia de 5 y 1 % entre tratamientos y repeticiones. Para comparación de promedios de los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples de tukey al nivel de significancia 5 % entre los tratamientos.

Tabla 6. Analices de varianza

F.V.	G.L.	S.C.	CM.	FC
bloque	$b - 1$	$\sum (x.j)^2 / t - \left(\sum x. \right)^2 / t.b$	$SCb / r - 1$	SCt / SCe
tratamiento	$t - 1$	$\sum (x.i)^2 / r - \left(\sum x. \right)^2 / t.b$	$SCt / t - 1$	SCb / SCe
Error	$(b - 1)(t - 1)$	$SCto - (SCt + SCb)$	$SCe / (t-1)(b-1)$	
Total	$tb - 1$	$\sum (x.ij)^2 - \left(\sum x. \right)^2 / t.b$		

Características del área experimental

Campo experimental

Largo del campo:	30 m.
Ancho de campo :	25 m.
Área total del campo experimental:	$30 \text{ m} \times 25 \text{ m} = 750 \text{ m}^2$
Área experimental:	$(100 \text{ m}^2 + 100 \text{ m}^2 + 100 \text{ m}^2) = 300 \text{ m}^2$
Área de caminos:	$(750 \text{ m}^2 - 300 \text{ m}^2) = 450 \text{ m}^2$
Área neta experimental total del campo:	$5 \text{ m} \times 5 \text{ m} = 25 \text{ m}^2$

Bloque

Numero de bloques:	3
Largo de bloque:	20 m.
Ancho de bloque:	5 m.
Área experimental por bloques:	100 m^2

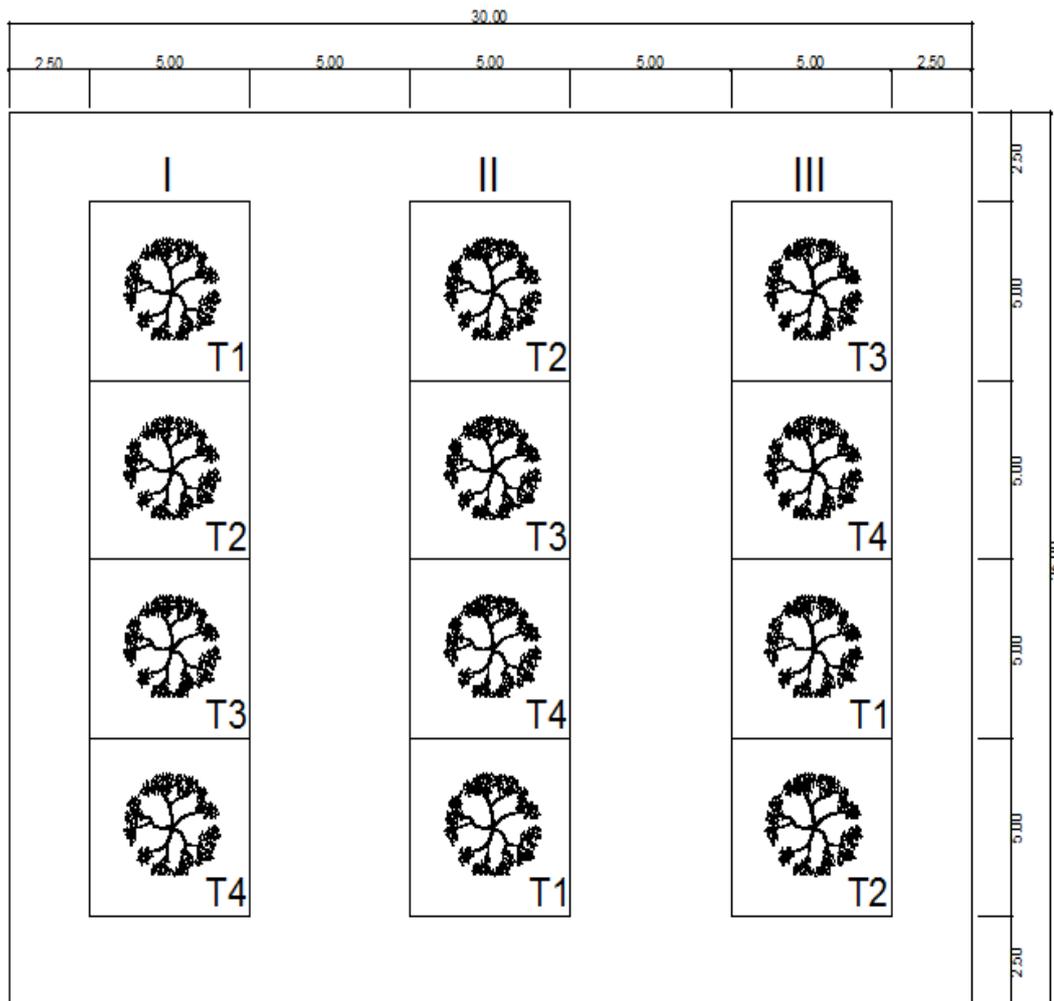


Figura 4. Croquis del campo experimental

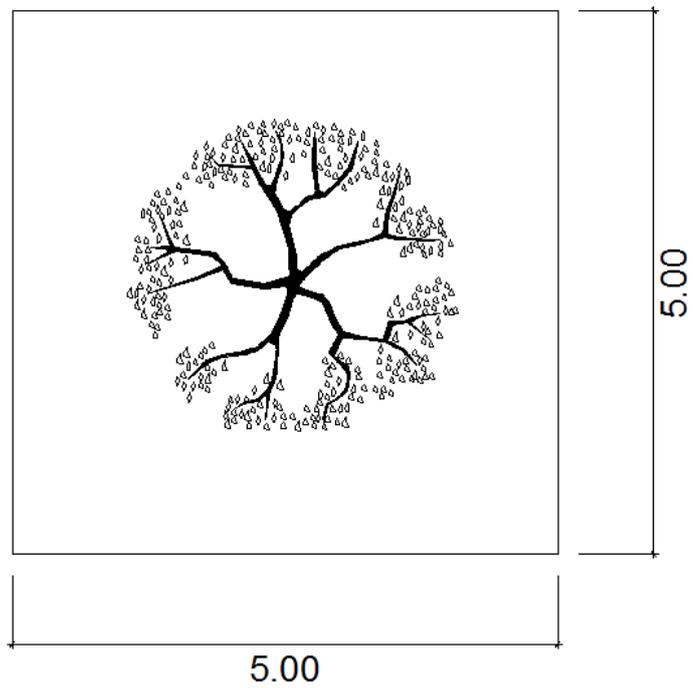


Figura 5. Parcela experimental

3.6.2. Datos registrados

3.6.2.1. Incidencia de *Botrytis* en flores

Para registrar la incidencia de *Botrytis* en flores, se señaló 100 flores por tratamiento durante la ejecución de la investigación, estas se fraccionó en 10 partes iguales, a su vez la selección de las muestras se hizo cada 2 semanas, mientras que la aplicación del microorganismo antagónico fue cada 7 días desde el inicio de la investigación; la evaluación consistió en contar número de flores con signo de *Botrytis*, número de flores con otro síntoma y número de flores libres del patógeno.

3.6.2.2. Incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados

Para registrar la incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados se seleccionó 50 muestras por tratamiento durante toda la investigación, estas se fraccionó en 10 partes iguales (5 muestras seleccionadas), la selección de las muestras se hizo cada 2 semanas mientras que la aplicación del microorganismo antagónico se hizo cada 7 días desde el inicio de la investigación. La evaluación consistió en contar número de frutos cuajados sanos, número de frutos cuajados que presentaron otro síntoma y número de frutos cuajados que presentó signo de *Botrytis*.

3.6.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información

3.6.3.1. Técnicas de recolección de datos

a. Técnicas de investigación documental o bibliográfica

Análisis de contenido

Esta técnica bibliográfica se utilizó para hacer inferencias válidas y confiables de datos respecto a su contexto. Pueden ser libros, artículos, conversaciones, discursos, reglamentos, etc.

Fichaje

Esta técnica bibliográfica permitió registrar aspectos esenciales de los materiales que se leyeron y que organizada sistemáticamente permitió redactar el marco teórico según las reglas del IICA.

b. Técnicas de recolección de información de campo

La observación

Es la acción directa entre el investigador con el objeto de estudio, los cuales permitió recolectar la información directamente del campo sobre los signos del patógeno.

3.6.3.2. Instrumentos de recolección de información

a. Instrumentos de investigación documental y bibliográfica

Fichas de registro o localización

Bibliográficas

Se utilizó para recopilar información de los libros, tesis, los cuales permitió construir el marco teórico.

Hemerográficas

Se utilizó para recopilar información del Internet, revistas, periódicos sobre las variables e indicadores en estudio.

Fichas de documentación e investigación

Fichas textuales o de transcripción

Fichas de resumen

Fichas de comentario

b. Instrumentos de recolección de información de campo

Libreta de campo

Se utilizó para recolectar datos directamente del campo experimental.

3.7. Materiales y equipos

3.7.1. Equipos

Cámara fotográfica digital, microscopio, laptop, motocicleta, sistema de posicionamiento global (GPS), mochila pulverizadora, refrigeradora, incubadora.

3.7.2. Insumos

Trichoderma harzianum

Triple A (acidificante, adherente, ablandador de agua)

Codi oil (aceite agrícola)

3.7.3. Materiales

Plantaciones de granadilla, wincha de 50 metros lineales, hilo nylon, hilo rafia, tijera de podar, mochila de pulverizar, taper, placas Petri, lupa, bolsas de polietileno, balde, cinta de agua (4 colores), bolsas, calculadora, cuchara.

3.8. Conducción de la investigación

3.8.1. Adquisición de insumos y materiales para a investigación

Los materiales e insumos que se utilizaron fueron adquiridas de las tiendas comerciales excepto *Trichoderma harzianum*, esta se solicitó a la institución gubernamental SENASA (servicio nacional de sanidad agraria).

3.8.2. Señalización de bloques y tratamientos

La parcela experimental se señaló por bloques (3 bloques) utilizando hilo rafia mientras que los tratamientos (12 tratamientos) fueron señalados con hilo nylon.

3.8.3. Señalización de las muestras

Para la evaluación de tratamientos se seleccionaron 10 flores por semana hasta completar 100 muestras, mientras que los frutos cuajados eran complicados la selección porque no llegaban a cuajar por la fuerte incidencia del patógeno; se llegó a seleccionar 50 frutos cuajados por tratamiento.

3.8.4. Proceso de preparación para la aplicación

Para pulverizar 10 000 m² del campo granadillero se utiliza 400 litros de agua, a su vez cada tratamiento tiene 25 m² con 3 repeticiones haciendo la sumatoria de 75 m², por lo cual para pulverizar este último se necesitó 3 litros de agua.

En la investigación experimental con 75 m² por cada repetición se utilizó 7.5 gramos que viene a ser el 0.75 % de 1 kg del *Trichoderma harzianum* para la dosis 1, mientras para la dosis 2 se utilizó 15 gramos del hongo benéfico que viene a ser el 0.75 % de 2 kg de *Trichoderma harzianum*, por último el tratamiento 3 con 3 kg de *Trichoderma harzianum*

por hectárea se utilizó 22.5 gramos de dicho microorganismo que viene a ser el 0.75 % de 3 kg. Cabe recalcar que *Trichoderma harzianum* viene en concentración de 2×10^7 ufc /g.

Para aplicar el hongo benéfico en 1 litro de agua se adicionó el triple A (acidificante – adherente y ablandador de agua) 10 ml, codi oil (aceite agrícola) 10 ml y las respectivas dosis del hongo benéfico que viene impregnado en arroz, estas se friccionan de tal manera que quede el microorganismo antagónico. Terminada la fricción se enrasó hasta completar 3 litros de agua en mochila de 20 litros.

3.8.5. Aplicación de *Trichoderma harzianum*

La aplicación de *Trichoderma harzianum* se realizó con mochila marca jacto, con frecuencia de 7 días entre la última aplicación durante la ejecución de la investigación. El número de pulverizaciones realizadas ha sido 20 veces durante la ejecución de la investigación.

3.8.6. Evaluación

La primera evaluación se realizó a 7 días después de selección de las muestras, a 14 días la segunda y última. La evaluación consistió en contar flores y frutos cuajados seleccionados anteriormente cuantas presentaban signo de *Botrytis*, que cantidad presentaba otra síntoma y cuantos

estuvieron sanos. Los resultados obtenidos se registraron en libreta del ingeniero.

3.8.7. Trabajo de gabinete

Para determinar la incidencia del patógeno por cada tratamiento se utilizó la fórmula.

$$\text{incidencia (I)}: \frac{\text{numero de organos enfermos} \times 100}{\text{numero total de organos observadas}}$$

IV. RESULTADOS

4.1. Incidencia de *Botrytis*

De los resultados obtenidos en campo utilizando la fórmula de incidencia se estimaron el porcentaje de daño que estuvo causando el patógeno. En las flores de granadilla el problema principal es *Botrytis* pero también ocasionan caída de flores los ácaros (*Tetranychus sp*) mosca de botones florales (*Dasiops inedulís* y *Lonchaea sp*) lo cual hacen incierta el porcentaje de daño, mientras que en frutos cuajados la caída de estas se presentan solo por *Botrytis* lo cual confirma con más aproximación la incidencia del patógeno.

Tabla 7. Porcentaje de incidencia de *Botrytis* en flores

Tratamientos	Porcentaje de incidencia
Tratamiento 1 testigo	59 %
Tratamiento 2 (1 kg de <i>T harzianum</i>)	58 %
Tratamiento 3 (2 kg de <i>T. harzianum</i>)	58.33%
Tratamiento 4 (3 kg de <i>T. harzianum</i>)	59 %

Tabla 8. Porcentaje de Incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados

Tratamientos	Porcentaje de incidencia %
Tratamiento 1 testigo	90.67
Tratamiento 2 (1 kg de <i>T harzianum</i>)	89.33
Tratamiento 3 (2 kg <i>T harzianum</i>)	90
Tratamiento 4 (3 kg <i>T harzianum</i>)	87.33

Para el análisis estadístico los resultados obtenidos en campo se promediaron, las cuales se interpretaron mediante la técnica estadística de análisis de varianza (ANDEVA) a fin de comparar las diferencias significativas entre bloques y tratamientos donde los parámetros que son iguales se denota con no significativo (ns), quienes tienen significación (*) y altamente significativo (**). Para la comparación de los promedios se aplicó la prueba de tukey a nivel de significancia de 0.05 de probabilidades de éxito.

4.2. Análisis estadístico de la incidencia

4.1.1. *Botrytis* en flores

Tabla 9. Análisis de varianza para incidencia de *Botrytis* en flores

FV.	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Bloque	2	24.5	12.25	0.54 ns	5.14	10.92
Tratamiento	3	4.92	1.64	0.07 ns	4.76	9.78
Error	6	136.83	22.81			
Total	11	166.83				

$$CV = 8.13 \%$$

Los resultados de análisis de variancia indican que es no significativo para bloques al 0.05 mucho menos al 0.01; del mismo modo para tratamientos es no significativo tanto al 0.05 y al 0.01; el no significativo

indica que estadísticamente los resultados obtenidos son iguales tanto para tratamientos como para bloques.

El coeficiente de variabilidad es de 8.13 % dando una confiabilidad en la información obtenida.

Tabla 10. Prueba de significancia de tukey para incidencia de *Botrytis* en flores.

Tratamientos	Tratamientos (número de flores con signo de <i>Botrytis</i>)	Grupo tukey 0.05
T1 (testigo sin aplicación)	179	a
T2 (1 kg de <i>T. harzianum</i>)	174	a
T3 (2 kg de <i>T. harzianum</i>)	175	a
T4 (3 kg de <i>T. harzianum</i>)	177	a

$$ALS(t)=11.70$$

La prueba de significancia de tukey en el nivel de significancia de 0.05 determinó que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 estadísticamente son iguales confirmando los resultados de análisis de varianza.

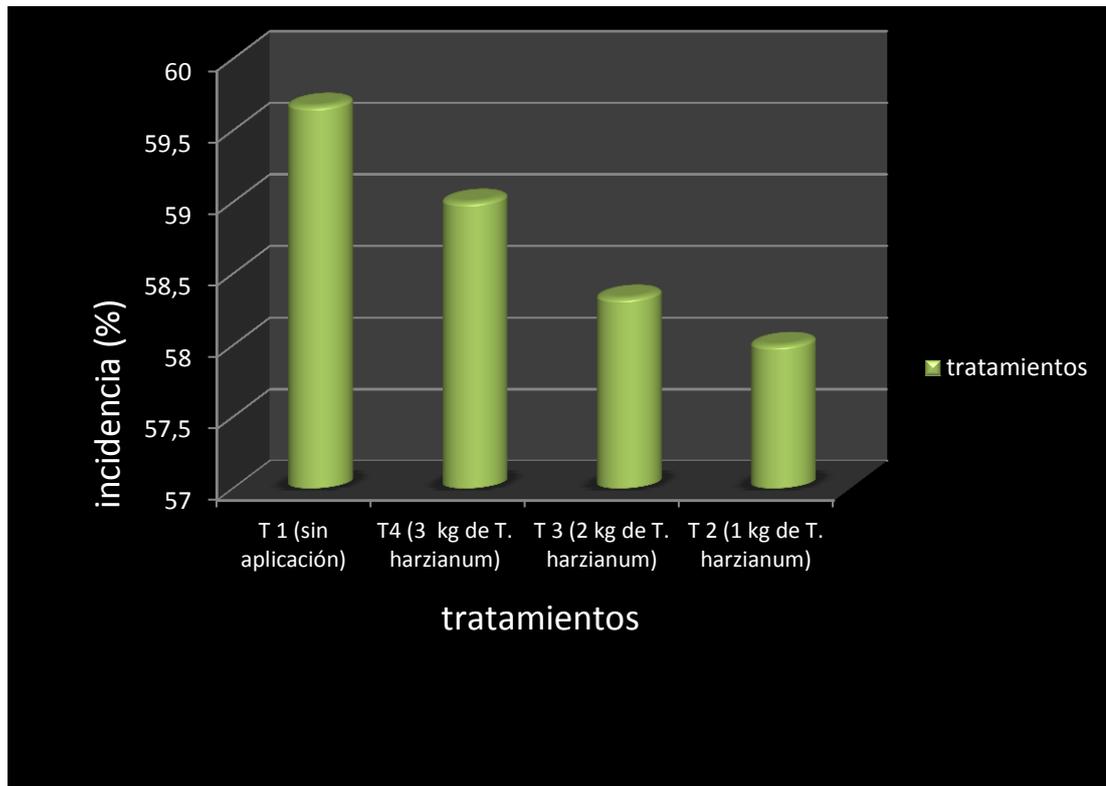


Figura 6. Incidencia de *Botrytis* en flores

En la figura 7 se puede observar que el tratamiento 1 (sin aplicación de *Trichoderma*) presenta una mayor incidencia de *Botrytis* en flores. Mientras que en el tratamiento 4, 3 y 2 presentaron menor incidencia con respecto al testigo (tratamiento 1).

4.5.2. *Botrytis* en frutos cuajados

Tabla 11. Análisis de variancia para la incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados.

FV.	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Bloque	2	11.17	5.59	0.66 ns	5.14	10.92
Tratamiento	3	4.67	1.56	0.18 ns	4.76	9.78
Error	6	50.83	8.87			
Total	11	66.67				

CV = 6.51 %

Los resultados de análisis de variancia respecto a la incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados indican que es no significativo tanto para bloques como para tratamientos.

El coeficiente de variabilidad es de 6.51 % dando una confiabilidad en la información obtenida.

Tabla 12. Prueba de significancia de tukey para interpretación de incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados.

TRATAMIENTOS	Tratamientos (número de frutos cuajados con <i>Botrytis</i>)	Grupo tukey
		0.05
T1 (testigo sin aplicacion)	136	a
T4 (3 kg de <i>T. harzianum</i>)	134	a
T3 (2 kg de <i>T. harzianum</i>)	135	a
T2 (1 kg de <i>T. harzianum</i>)	131	a

ALS (t)=7.12

La prueba de significancia de tukey en el nivel de significancia de 0.05 determinó que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 estadísticamente son iguales confirmando los resultados de análisis de varianza.

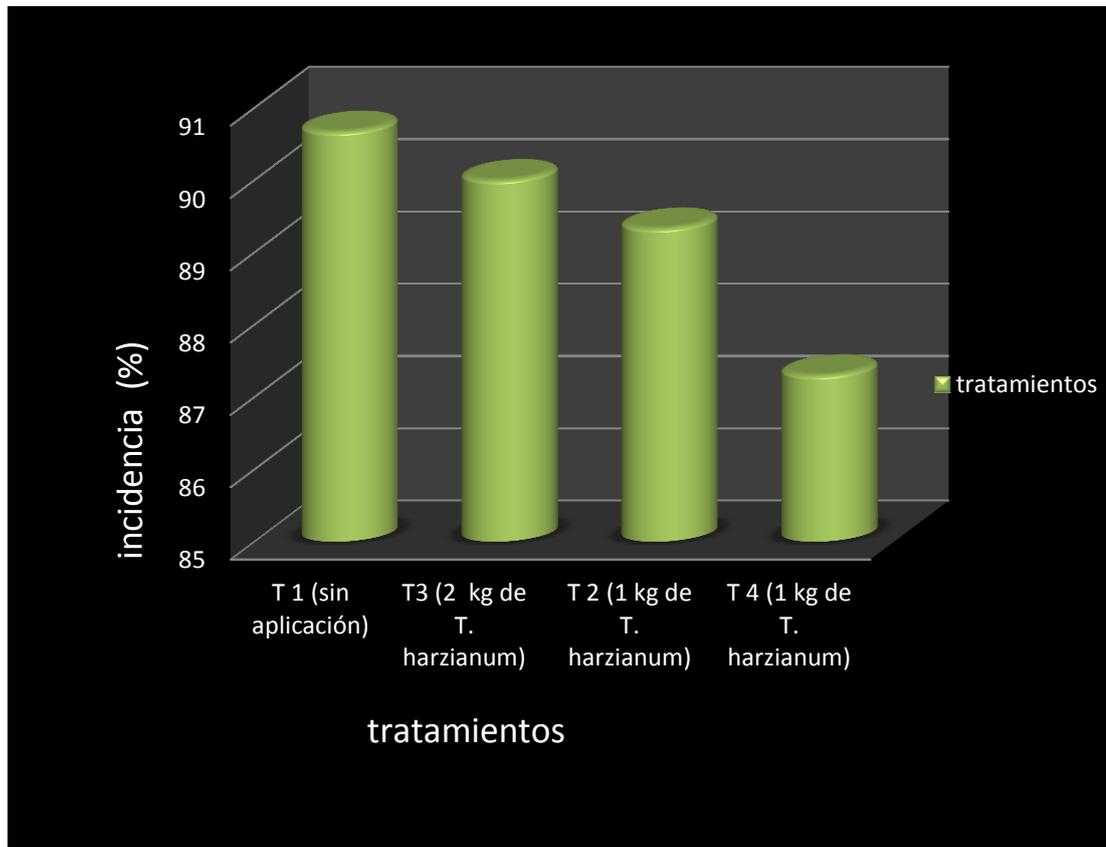


Figura 7. Incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados por ANE.

En la figura 8 se puede observar que el tratamiento 1 (sin aplicación de *Trichoderma*) presenta una mayor incidencia de *Botrytis* en flores. Mientras que en el tratamiento 4, 3 y 2 presentaron menor incidencia con respecto al testigo (tratamiento 1).

V. DISCUSIÓN

5.1. Incidencia de *Botrytis* en flores

La incidencia de *Botrytis* en flores de granadilla en tratamiento testigo fue de 59.67 %, mientras que en T2, T3 y T4 (1, 2, 3 kg de *Trichoderma harzianum* por hectárea) fueron 58%, 58.33% y 59% en respectivamente, superiores a los obtenidos por Nelly (1997) que redujeron la incidencia en manzano hasta 36 % y Quinche (2009) redujo incidencia de *Botrytis* en un 70 % en el cultivo de la rosa a una altitud de 3 044 msnm lo cual no se pudo alcanzar en el cultivo de granadilla. Las posibles causas por lo que no ha sido efectivo la regulación biológica, puede ser por la poca capacidad de adecuarse a la parte aérea del follaje, que cuando cae la precipitación está bastante húmedo y cuando deja de llover está seca; en el campo se presenta un complejo de plagas y enfermedades en cada cultivo, para las flores de granadilla esta las moscas de botones florales (*Dasiops inedulís* y *Lonchaea sp*), ácaro (*Tetranychus sp.*), etc que interfieren de alguna manera con el resultado.

5.2. Incidencia de *Botrytis* en frutos cuajados

La mayor incidencia de *Botrytis* en los frutos cuajados fue en el tratamiento testigo 90.67%, mientras que en el resto T2, T3, T4 89.33%, 90%, 87.33% respectivamente, difiere grandemente de lo que dice García

et al (2007) cuando menciona con 1.5 kg de *Trichoderma* se puede hacer un efectivo control de *Botrytis cinerea*. Estos resultados son más precisos porque los frutos cuajados que se han caído fueron generalmente por *Botrytis*. El patógeno coloniza rápidamente a los frutos cuajados mientras que el antagonista tiene que adaptarse al medio para que empiece a colonizar, quizá haya por este caso no ha sido posible la regulación biológica.

VI. CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Botrytis cinerea* en la granadilla se concluye lo siguiente:

1. En la recolección de información de campo no solo se presentan una sola enfermedad sino un complejo de plagas y enfermedades, de alguna manera incide directamente en la correcta recolección de información.
2. Con estas dosis 1, 2 y 3 kg de *Trichodemra harzianum* por hectárea no es efectivo la regulación biológica contra *Botrytis cinerea*.
3. Las posibles causas por la que no ha sido efectivo la regulación biológica pueda ser porque presenta pocas probabilidades de sobrevivencia en la parte aérea, cuando hay precipitación bastante humedad y con insolación sequedad lo que impediría su adaptación.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la investigación se puede hacer algunas recomendaciones:

1. Para las futuras investigaciones a 2659 msnm no se puede aún recomendar para aplicaciones con estas dosis en la parte aérea de la planta de granadilla.
2. En la granadilla no se debe descuidar con la poda, para evitar a que se genere un microclima lo cual favorece al desarrollo del patógeno.

VII. LITERATURA CITADA

Agrios, GN. 2010. Fitopatología. Trad. M. Guzmán Ortiz. 2 ed. México: Limusa. 856 p.

Cotrina, J. 2001. Uso de *Gliocladium roseum* para el control de *Botrytis cinerea* en fresa. Tesis Ing. Agr. Huánuco, UNHEVAL. 69 p.

Cerdas, M y Castro, J. 2003. Manual práctico para la producción, cosecha y manejo poscosecha del cultivo de granadilla (*Passiflora ligularis*, Juss). San Jose, CR. Nacional. 63 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2006. Granadilla (*Passiflora ligularis* juss). (en línea). Consultado 5 de septiembre. 2013. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/granadilla.htm

Ferreira, R. y Alarcón, A. 2007. Microbiología agrícola: hongos, bacterias y microfauna, control biológico y planta microorganismo. México: Trillas. 568 p.

García, J; Floriano, J; Vera, L y segura, J. 2007. Enfermedades y plagas del cultivo de granadilla (*Pasiflora ligularis*) en el departamento de Huila. (en línea). Consultado 15 de septiembre. 2013. Disponible en:

<http://www.corpoica.org.co/sitioweb/archivos/publicaciones/enfermedadesyplagasdecultivodelagranadilla.pdf>

Hoyos, LM. 2011. Enfermedades de las plantas: control biológico. Eco ediciones. Bogotá, Colombia. 228 p.

Melgarejo, O; De la Cal, A; Larena, I; Sabuquillo, P. y Guijarro, B. 2005. Estrategias para el control biológico de hongos Fitopatógenos. Madrid, España. 223 p.

Memenza, ME. 2009. Control biológico *in vitro* de *Botrytis cinerea* mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (*Vitis vinifera*). Tesis Biol. Con mención en microbiología y parasitología. Lima, UNMSM. 75 p.

Mont, RM. 2002. Manejo integrado de enfermedades de las plantas. Lima, Perú: VPI GRAFICOS. 210 p.

Quinche, G. 2009. Control de botrytis (*Botrytis cinerea*) y mildiu veloso (*Peronospora sparsa*) en el cultivo de rosa (*Rosa sp* variedad forever young) mediante el uso de *Trichoderma harzianum* rifa. Tesis Ing. Agr. Ecuador, ESPC. 78 p.

Quezada, AP. 2011. Evaluación del comportamiento de fungicidas microbiológicos en la prevención de Botrytis en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*). Tesis. Mg. Ecuador, UTA. 70 p.

Rivera, B; Miranda, D; Ávila, L; Nieto, A. 2002. Manejo integral del cultivo de granadilla (*pasiflora ligularis* Juss). Manizales, Colombia: Litoas. 130 p.

Rivera Fonseca, A. 2007. Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* mol cultivada *in vitro* en *Botrytis cinerea* pers. Tesis Doc. En ciencias de recursos naturales. Temuco. CHL, UF. 198 p.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de evaluaciones *Botrytis* en frutos cuajados

trat	I	II	III	total de trat	prom
1	48	43	45	136	45.33
2	43	44	47	134	44.67
3	45	47	43	135	45
4	48	43	40	131	43.67
total de bloq	184	177	175	536	44.67

Anexo 2. Resultados de evaluaciones *Botrytis* en flores

trat	I	II	III	total de trat	prom
1	54	63	62	179	59.67
2	55	64	55	174	58
3	55	60	60	175	58.33
4	64	55	58	177	59
total de bloq	228	242	235	705	58.75

Anexo 3. Presentación de *Trichoderma harzianum* en bolsas de kilogramo



Anexo 4. Signo de *Botrytis cinerea* en fruto cuajado de granadilla



Anexo 5. Insumos utilizados en la investigación

Anexo 6. Trabajo de gabinete para determinar la incidencia de *Botrytis* en flores y frutos cuajados.

Incidencia de *Botrytis* en el tratamiento testigo (sin aplicación)**Incidencia en flores**

$$\text{incidencia en flores (I): } \frac{179 \times 100}{300} = 59.67 \%$$

$$\text{Incidencia en flores (I) = 59.67 \%}$$

Incidencia en frutos cuajados

$$\text{incidencia en frutos cuajados (I): } \frac{136 \times 100}{150} = 90.67 \%$$

Incidencia en frutos cuajados = 90.67 %

Incidencia de *Botrytis* con 1 kg de *T. harzianum***Incidencia en flores**

$$\text{incidencia en flores (I): } \frac{174 \times 100}{300} = 58 \%$$

Incidencia en flores (I) = 58 %

Incidencia en frutos cuajados

$$\text{incidencia en frutos cuajados (I): } \frac{134 \times 100}{150} = 89.33 \%$$

Incidencia en frutos cuajados = 89.33 %

Incidencia de *Botrytis* con 2 kg de *T. harzianum***Incidencia en flores**

$$\text{incidencia en flores (I): } \frac{175 \times 100}{300} = 58.33 \%$$

Incidencia en flores (I) = 58.33 %

Incidencia en frutos cuajados

$$\text{incidencia en frutos cuajados (I): } \frac{135 \times 100}{150} = 90 \%$$

Incidencia en frutos cuajados = 90 %

La incidencia de Botrytis con 3 kg de *T. harzianum***Incidencia en flores**

$$\text{incidencia en flores (I): } \frac{177 \times 100}{300} = 59 \%$$

$$\text{Incidencia en flores (I) = 59 \%}$$

Incidencia en frutos cuajados

$$\text{incidencia en frutos cuajados (I): } \frac{131 \times 100}{150} = 87.33 \%$$

$$\text{Incidencia en frutos cuajados = 87.33 \%}$$