

## Cepas de *Trichoderma* con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua

### *Trichoderma* strains with endophytic capacity on the control of the mildew (*Peronospora variabilis* Gäum) and improve quinoa yield

Betsabe Leon Ttacca<sup>1</sup>; Nora Ortiz Calcina<sup>2</sup>; Norma Condori Ticona<sup>2</sup>; Ernesto Chura Yupanqui<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agrarias - Escuela profesional de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno Perú, investigador independiente egresadas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno Perú Autor para correspondencia: [betsalet@yahoo.es](mailto:betsalet@yahoo.es).

#### ARTÍCULO ORIGINAL

##### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Artículo recibido 15-09-2017  
Artículo aceptado 28-12-2017  
On line: 08-01-2018

##### PALABRAS CLAVES:

Biocontrol,  
endófitos,  
pseudohongo,  
Chenopodium quinoa,  
rendimiento.

#### ORIGINAL ARTICLE

##### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Artículo recibido 15-09-2017  
Artículo aceptado 28-12-2017  
On line: 08-01-2018

##### KEY WORDS:

Biocontrol,  
endophytes,  
pseudo-fungi,  
Chenopodium quinoa,  
yield.

#### RESUMEN

El mildiu es la enfermedad más importante que afecta a la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en el altiplano peruano, ocasionado por el pseudohongo *Peronospora variabilis* Gäum., causando una reducción en su rendimiento de hasta 99%. Con la finalidad de evaluar el efecto de cepas de *Trichoderma* sp con capacidad endofítica en el control del mildiu y mejora del rendimiento de la quinua var. Salcedo INIA, se peletizaron semillas ( $1 \times 10^6$  ufc. semilla<sup>-1</sup>) e infestaron el sustrato con esporas de 10 cepas de *Trichoderma* para determinar el porcentaje de colonización endofítica en plantas de quinua de 30 y 60 días de edad en condiciones controladas; se realizaron cuatro aplicaciones foliares ( $1 \times 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup>) y evaluaciones de severidad para determinar el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) y rendimiento de grano bajo condiciones de campo. Todas las cepas lograron colonizar diferentes partes de la planta considerándose así endófitos de quinua. El mayor porcentaje de colonización (34.24 %) se dio con la infestación del sustrato, siendo la cepa T10 (60%) quien logro la mayor colonización seguido de T3 (56.67%) y T2 (43.33%) a los 60 días de evaluación. Los tratamientos que recibieron aplicaciones con las cepas T1, T3 y T2 fueron los menos afectados con el mildiu, con valores de AUDPC de 615.7, 706.8 y 759 respectivamente y presentaron los valores más altos en el rendimiento de grano (3127.30, 3029.12 y 2866.57 kg. ha<sup>-1</sup> respectivamente) en comparación al Testigo con AUDPC de 1670.5 y rendimiento 1141.27 kg. ha<sup>-1</sup>.

#### ABSTRACT

Downy mildew is the most important disease that affects quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in the Peruvian altiplano, it's caused by pseudo fungi *Peronospora variabilis* Gäum. It causes yield reductions up to 99%. With the purpose of evaluating the effect of *Trichoderma* sp strains with endophytic capacity in the control of the mildew and improve quinoa yield var. Salcedo INIA, the seeds were fully covered ( $1 \times 10^6$  ufc. seed<sup>-1</sup>) and substrate was infested with spores of 10 *Trichoderma* strains to determine the percentage of endophytic colonization in quinoa plants at 30 and 60 days age under controlled conditions; four leaf applications ( $1 \times 10^7$  ufc.ml<sup>-1</sup>) and severity evaluations were also performed to determine the area under the disease progress curve (AUDPC) and grain yield under field conditions. All the strains managed to colonize different parts of the plant confirming to be endophytes of quinoa. The highest percentage of infestation (34.24 %) was achieved inoculating the substrate with the strain T10 which level of colonization reached 60%, followed by T3 with 56.67% and T2 with 43.33%. The scoring after 60 days showed that plants treated with strains T1, T3 and T2 were the least affected by downy mildew with values of 615.7, 706.8 and 759 for AUDPC, respectively. They also displayed the highest values for grain yield 3127.30, 3029.12 and 2866.57 kg. ha<sup>-1</sup>, respectively, in comparison with the control which AUDPC and yield were 1670.5 and 1141.27 kg. ha<sup>-1</sup>, respectively.

## INTRODUCCIÓN

En el Perú, la región Puno registra el volumen de producción más elevado de los últimos tiempos (38,2 mil toneladas) y es considerada como la primera región con mayor producción nacional de grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) mayormente orgánica, sin el uso de insumos químicos en su cultivo, es reconocido en los mercados, los precios pagados son siempre mayores que la quinua convencional, aunque los rendimientos aún son considerados bajos(), debido a los riesgos climáticos y biológicos.

La quinua es atacada por una variedad de patógenos, que causan varias enfermedades como mohos, chupaderas, tizón, mosaico, etc.; siendo, el mildiu la enfermedad más severa de la quinua causado por *Peronospora variabilis*, ocasionando la reducción del rendimiento de 33 a 58%, (; ; ), incluso en los cultivares más resistentes y hasta un 99% en los cultivares susceptibles (; ), debido a las limitadas estrategias de control de enfermedades dentro de una producción orgánica en la Región Puno. Siendo una alternativa el control biológico, con el uso de cepas de *Trichoderma* sp con capacidad endofítica, estos endófitos son capaces de colonizar los tejidos de las plantas sin causar síntomas visibles e inducir la producción de compuestos relacionados con la defensa y algunos genes implicados en respuestas de defensa de las plantas a factores bióticos y abióticos(; ;).

Entre los principales endófitos como agentes de control biológico, existe un grupo de hongos del género *Trichoderma* sp, considerados antagonistas naturales de fitopatógenos y son ampliamente utilizados en la agricultura, poseen un gran potencial de biocontrol a plagas y enfermedades, y pueden contribuir al mejoramiento general de las plantas (; ; ; ). Asimismo, este antagonista induce resistencia sistémica o localizada, el aumento de crecimiento y la absorción de nutrientes de la planta, desactivación de enzimas del patógeno, compatibilidad con

agroquímicos, entre otros; siendo el micoparasitismo, antibiosis y competencia por espacio y nutrientes los principales mecanismos de acción de este hongo (). Inducción de defensa de plantas y Micoparasitismo son considerados como los mecanismos más importantes de control biológico —(). Esta situación condujo la realización del presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos: Determinar la capacidad endófitica de cepas de *Trichoderma* sp. en plantas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y evaluar el efecto de cepas de *Trichoderma* sp en el control del mildiu (*Peronospora variabilis*) y mejora del rendimiento de la quinua var. Salcedo INIA,

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Producción de cepas de *Trichoderma* sp

Las cepas de *Trichoderma* sp que se utilizaron para este primer ensayo fueron proporcionadas por la Escuela profesional de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA) Puno - Perú (Tabla1), nueve de las cepas fueron nativas, aisladas de tallos de plantas de quinua y cacao, y del suelo rizosférico de quinua. A partir de cultivos jóvenes se procedió a realizar repiques de cada cepa en medio PSA (Papa Sacarosa Agar) y fueron incubados a 25°C bajo luz artificial durante una semana, con la finalidad de inducir la producción de estructuras de reproducción.

**Tabla 1.** Código y procedencia de cepas de *Trichoderma* sp. para la realización de la investigación propuesta en el laboratorio de Fitopatología y CIP Camacani de la UNA, durante la campaña agrícola 2015 – 2016.

CODIGO CEPA	TIPO	ESPECIE	PROCEDENCIA
T1	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp.	Tallo de Quinua, Puno. Perú
T2	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp	Tallo de Quinua, Puno Perú
T3	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp	Tallo de Quinua, Puno Perú
T4	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp	Rizósfera de Quinua, Puno Perú
T5	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp	Rizósfera de Quinua, Puno. Perú
T6	Comercial	<i>Trichoderma viride</i>	Cusco- Perú
T7	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp.	Tallo de cacao, San Gabán. Perú
T8	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp.	Tallo de cacao, San Gabán. Perú
T9	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp.	Tallo de cacao, San Gabán. Perú
T10	Nativa	<i>Trichoderma</i> sp.	Tallo de cacao, San Gabán. Perú

### Colonización endofítica de *Trichoderma* sp. en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

Para la colonización de plantas de quinua se emplearon 10 cepas de *Trichoderma* sp, se realizaron aplicaciones de las cepas mediante dos métodos de inoculación: **Método 1** (Peletización de semillas con conidias de *Trichoderma* sp), consistió en cubrir las semillas desinfectadas con conidias de *Trichoderma* sp ( $1 \times 10^6$  ufc. semilla<sup>-1</sup>), para 1 g de semillas se aplicó 1.5 ml de suspensión de conidias ( $2 \times 10^8$  ufc.cc<sup>-1</sup>) y 0.5 ml de melaza esterilizada, la mezcla se realizó en viales de 2 ml, para el caso del testigo se realizó la mezcla de ADE y melaza, luego fueron transferidas a placas petri para su secado por 24 horas, se realizó la siembra de tres semillas peletizadas por cada maceta conteniendo 200 g de sustrato estéril a capacidad de campo a una concentración de 2:1:1 (Suelo agrícola, compost y arena). Para el **Método 2** (Infestación del sustrato suelo con conidias de *Trichoderma* sp vía drench), se realizó la aplicación de *Trichoderma* sp ( $1 \times 10^7$  ufc.g suelo<sup>-1</sup>) al suelo mediante el método via drench con 30 ml de suspensión de conidias en cada maceta con 200g de sustrato estéril, posteriormente, se sembraron tres semillas desinfectadas por cada maceta. Se dejó en incubación en el laboratorio de Fitopatología bajo luz artificial a una temperatura de 12 °C, Humedad Relativa de 40% por un periodo de 60 días para ambos métodos. Para determinación de la colonización de *Trichoderma* sp en plántulas de quinua, se realizó el re-aislamiento de *Trichoderma* sp en medio Corn meal dextrosa agar (CMDA) de secciones (raíz principal media, punta de raíz, Hipocotilo, Epicotilo y hojas) de plántulas de quinua colonizadas con las cepas de *Trichoderma* sp a los 30

y 60 días de edad según la metodología descrita por Bailey *et al.* (2008). Estas placas fueron incubadas a 25 °C por cinco días, y se registró como positivo (1) o negativo (0) para la colonización de *Trichoderma* sp.

### Capacidad de biocontrol de cepas de *Trichoderma* sp. endofitos hacia *Peronospora variabilis* Gäum patógeno de *Chenopodium quinoa* Willd.

El experimento fue conducido en una parcela experimental del CIP Camacani, durante la campaña agrícola 2015 (octubre) – 2016 (mayo) en 11 parcelas por bloque, 3 bloques, 3 repeticiones (parcelas) por tratamiento, 2.4 m el ancho de parcela, 1.2 m de distancia entre parcelas, 5 surcos por parcela con un distanciamiento de 0,60 m entre surcos, 5 m de longitud de surcos y el área efectiva del experimento de 889.2 m<sup>2</sup>. El total de tratamientos empleados fueron 11, los 10 primeros corresponden a la aplicación de cepas de *Trichoderma* sp y el último tratamiento testigo sin aplicación (T11)

Para las aplicaciones, previamente en el laboratorio de fitopatología de la EPIA –UNA, se propagaron las cepas de *Trichoderma* sp endófito en sustrato arroz, siendo la primera aplicación el día de la siembra en semillas (peletizadas a una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc. semilla<sup>-1</sup>) y abono ( $1 \times 10^7$  ufc. g de estiércol<sup>-1</sup>), y cuatro aplicaciones a nivel foliar ( $1 \times 10^7$  ufc/cc) en cuatro momentos críticos del desarrollo fenológico del cultivo: durante la ramificación, panojamiento, floración y grano lechoso.

Se realizaron cuatro evaluaciones de severidad de la

enfermedad durante la campaña agrícola, la primera evaluación se realizó a los 30 días después de la segunda aplicación de *Trichoderma* sp (100 días después de la siembra), la segunda evaluación a los 15 días después de la tercera aplicación, la tercera evaluación a los 15 días después de la cuarta aplicación y la cuarta evaluación a los 10 días después de la última aplicación de *Trichoderma* sp. Para cada evaluación, se escogió al azar 10 plantas de los tres surcos céntricos por parcela y de cada planta se escogió 3 hojas al azar, una de cada tercio (superior, medio e inferior) en donde se evaluaron el porcentaje de área afectada de cada hoja usando una escala en base al porcentaje de área afectada por la enfermedad según la escala de evaluación propuesta por Danielsen and Ames (2000), se calculó el valor del área bajo la curva de progreso de la enfermedad, (AUDPC), en base a mediciones de severidad.

## DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la colonización de *Trichoderma* sp en plántulas de quinua se empleó el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial (2x2x10) con tres repeticiones, dos métodos de inoculación (peletización de semilla e infestación del suelo), dos fechas de evaluación (30 y 60 días) y 10 cepas de *Trichoderma* sp. Para evaluar la capacidad de biocontrol de cepas de *Trichoderma* sp se empleó un diseño de Bloque completamente al azar con tres repeticiones. Los datos expresados en porcentaje fueron transformados angularmente ( $\arcsin \sqrt{X}$ ) y los datos de AUDPC a raíz cuadrada, con dicha transformación se confirmó la normalidad y homogeneidad de varianzas como lo recomendado por Montgomery (2008) y en consecuencia estos fueron procesados en un software estadístico *InfoStat, versión 2008* (Di Rienzo *et al.*, 2008) para realizar el análisis de varianza (ANDEVA) y para las diferencias de medias se aplicó la prueba de contraste de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Capacidad endófitica de cepas de *Trichoderma* sp en plantas de *Chenopodium quinoa* Willd.

Los análisis de varianza (ANDEVA) del índice y colonización endofítica de cepas de *Trichoderma* sp en plantas de quinua variedad salcedo INIA, indican que los efectos de los factores Métodos de inoculación, Fecha de evaluación y Cepas de *Trichoderma* sp son significativos ( $p \leq 0,05$ ). La Tabla 2 muestra que el método 2 (infestación del sustrato con cepas de *Trichoderma* sp) presentó el mayor índice (1.04) y porcentaje de colonización endofítica (20.76 %) a diferencia del método 1 (semillas peletizadas con cepas de *Trichoderma* sp) que presentó el menor índice (0.64) y porcentaje de colonización (12.73 %). Por otro lado, se observa que a los 30 días de evaluación la colonización fue menor en ambos métodos de inoculación, siendo el método 1 con mayor colonización (8.48 %) a diferencia del método 2 (7.27%); sin embargo, a los 60 días la colonización fue mayor, siendo el método 2 con mayor colonización (34.24 %) a diferencia del método 1 (16.97%). Siendo la cepa T10 quien logró la mayor colonización seguido de T3 y T2, mientras que la cepa T8 presentó la menor colonización en plantas de quinua de 60 días de edad.

De acuerdo a los resultados en este estudio, todas las cepas de *Trichoderma* fueron reaisladas de segmentos de tejidos plantas de quinua, lo cual indica que son hongos endófitos de quinua debido a lo mencionado por Carroll (1988) que estos microorganismos viven en asociación con las plantas dentro de sus tejidos en los espacios intercelulares e intracelulares, absorbiendo nutrientes de ella en forma asintomática. De manera semejante, Stone, Bacon, and White (2000) mencionan que los hongos endófitos viven en los espacios intercelulares y dentro de la célula del huésped planta sin causar daño aparente. Igualmente, concuerda con lo reportado por Arnold *et al.* (2003), mencionan que las plantas colonizadas por *Trichoderma* sp crecieron asintóticamente. Como tal, las cepas de *Trichoderma* sp han mostrado interés

**Tabla 2.** Efecto de métodos de inoculación de cepas de *Trichoderma* sp en el índice y porcentaje de colonización endofítica en plantas de quinua var. Salcedo INIA a los 30 y 60 días de evaluación, desarrollado en el laboratorio de Fitopatología de la UNA, 2016.

Cepas de <i>Trichoderma</i> sp.	Método 1				Método 2			
	30 dds		60 dds		30 dds		60 dds	
	IC	Colonización (%)	IC	Colonización (%)	IC	Colonización (%)	IC	Colonización (%)
T1	1.17 a	23.33 a	1.5 ab	30 ab	1 a	20 a	2 bcd	40 bcd
T2	1 ab	20 ab	1.67 a	33.33 a	0.5 b	10 b	2.17 abc	43.33 abc
T3	0.5 c	10 c	1.33 ab	26.67 ab	0 c	0 c	2.83 ab	56.67 ab
T4	0 d	0 d	0.67 c	13.33 cd	0.67 ab	13.33 ab	1.67 cde	33.33 cd
T5	0.83 abc	16.67 abc	1 bc	20 bc	0 c	0 c	1.83 cd	36.67 cd
T6	0 d	0 d	0.5 cd	10 d	0.5 b	10 b	1.17 de	23.33 de
T7	0.67 bc	13.33 bc	0.67 c	13.33 cd	0 c	0 c	1.67 cde	33.33 cd
T8	0 d	0 d	0.5 cd	10 d	0 c	0 c	0.83 ef	16.67 e
T9	0 d	0 d	0.5 cd	10 d	0.67 ab	13.33 ab	1.67 cde	33.33 cd
T10	0.5 c	10 c	1 bc	20 bc	0.67 ab	13.33 ab	3 a	60 a
Testigo	0 d	0 d	0 d	0 e	0 c	0 c	0 f	0 f
Promedio IC	0.42 c		0.85 b		0.36 c		1.71 a	
Promedio Colonización (%)		8.48 c		16.97 b		7.27 c		34.24 a
Promedio IC		0.64b			1.04b			
Promedio Colonización (S)		12.73 b			20.76 a			

Método 1: Peletización de semillas Método 2: Infestación del sustrato. IC: Índice de colonización. dds: días después de la siembra. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Fuente: Elaboración propia

en el campo de la fitopatología y se consideran como agentes de control biológico que tienen ventajas específicas sobre los fungicidas sintéticos, incluyendo menos efectos ambientales, eficacia contra patógenos resistentes a fungicidas y menor probabilidad de desarrollo de resistencia (Gao, Dai, & Liu, 2010; Toghue et al., 2016). De igual modo, en otros estudios se aislaron hongos endófitos de plántulas de *Theobroma gileri* previamente inoculadas, corroborado así la capacidad endofítica (Evans, Holmes, & Thomas, 2003). Lo mismo sucedió en plántulas de cacao que fueron inoculadas con especies de *Trichoderma* sp endófito y todas las cepas fueron capaces de colonizar partes aéreas de la plántulas (Arévalo, Canto, Leon, Meinhardt, & Cayotopa, 2010; Bailey et al., 2008; Bailey et al., 2006). De la misma forma en estudios realizados por Bailey et al. (2008), encontraron de 10 cepas de hongos endófitos, cuatro cepas DIS 110a (*T. harzianum*), DIS 219b (*T. hamatum*), DIS 219f (*T. harzianum*) y TA (*T. asperellum*) fueron los que colonizaron mayor de 50 % los tejidos de cacao en todos los métodos de inoculación.

Asimismo, en este estudio, en ambos métodos se observa que el índice y porcentaje de colonización fue menor a los 30 días de evaluación incrementándose a los 60 días de evaluación. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los hallazgos de Arnold et al. (2003), donde indican que partes viejas de la planta puede albergar más endófitos que los más jóvenes, la edad de la planta y el tiempo de exposición del incremento del inóculo tienen un efecto sobre la diversidad y número de endófitos en sus tejidos. Igualmente la incidencia de hongos endófitos se incrementa a medida que las hojas o las semillas crecen (Gallery, Dalling, & Arnold, 2007).

Por su parte, Bailey et al. (2008) señalan que un índice de colonización mayor a cero indica que la cepa estuvo viviendo dentro del tejido de la planta y es un endófito, lo cual indicaría que todas cepas estudiadas son endófitos de quinua, estos índices se logró con el método 2. Estas cepas de *Trichoderma* sp estudiadas lograron colonizar diferentes partes de la planta ya que fueron recuperadas de diferentes fragmentos de la misma planta, lo cual indica que infectaron

sistémicamente los espacios intercelulares de las raíces, tallos y hojas de la quinua, considerándose así endófitos sistémicos, como lo mencionan Stone et al. (2000).

En otros estudios, varias especies de endófitos fueron recuperados de diferentes fragmentos de la planta (raíces, hojas o ramas), mientras que otros pueden infectar a varias de estas secciones (Bacon & Hinton, 1996; Bailey et al., 2006; Carroll, 1988; De Souza et al., 2008), lo que sucedió con las cepas estudiadas que colonizaron diferentes tejidos de plantas de quinua a los 30 y 60 días de evaluación.

#### Capacidad de biocontrol de cepas de *Trichoderma* sp. endófitos hacia *Peronospora variabilis* patógeno de *Chenopodium quinoa* Willd.

El análisis de varianza (ANDEVA) del Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del mildiu de la quinua (*Peronospora variabilis* Gäum.) mostró una alta significancia ( $Pr < 0.05$ ) para tratamientos (cepas) con un C.V. de 9.77% y un R<sup>2</sup> de 0.73. Los valores de AUDPC fueron significativamente menores en los todos los tratamientos que recibieron aplicaciones de *Trichoderma* sp que el testigo (T11), siendo el más afectado con el valor más alto de AUDPC (1670.5) (Tabla 3). Asimismo, los tratamientos con aplicaciones de *Trichoderma* sp T6 y T8 fueron los que presentaron los valores altos de AUDPC con 1198.7 y 1168.9 respectivamente; sin embargo, el tratamiento menos afectado fue el T1 seguido de los tratamientos T3 y T2 con valores menores de AUDPC de 615.7, 706.8 y 759 respectivamente

**Tabla 3.** Porcentaje de severidad (%) y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC) del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) var. Salcedo INIA tratadas con cepas de *Trichoderma* sp. en el CIP Camacani de la UNA, durante la campaña agrícola 2015 – 2016.

Cepas de <i>Trichoderma</i> sp.	Severidad (%)				AUDPC
	100 dds	115 dds	130 dds	140 dds	
T1	3.13	9.73	13.30	15.87	615.70 d
T2	2.11	10.12	19.78	20.68	759.04 cd
T3	3.49	10.07	16.71	18.24	706.76 d
T4	4.83	16.23	21.51	28.84	1021.34 bcd
T5	6.78	13.08	20.50	26.39	943.63 bcd
T6	10.68	20.44	23.41	20.60	1198.72 b
T7	8.97	14.37	19.69	25.18	984.68 bcd
T8	9.97	12.52	29.76	29.04	1168.87 bc
T9	5.88	17.87	18.86	31.47	1039.36 bcd
T10	3.06	13.97	18.01	21.30	833.41 bcd
T11	15.06	25.70	37.00	25.04	1670.53 a

dds: días después de la siembra. AUDPC: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Severidad: Porcentaje del área de la hoja infectada (%). Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )  
Fuente: Elaboración propia

También, los valores de severidad del mildiu de la quinua de todos los tratamientos que recibieron aplicaciones de *Trichoderma* fueron inferiores al testigo hasta los 130 días después de la siembra (tercera evaluación), mientras que en la última evaluación, a los 144 dds, en ocho tratamientos siguió incrementando la severidad, por el contrario en los tratamientos T11 (testigo), T6 y T8 redujeron los valores de severidad. Se observó en las plantas más afectadas por la enfermedad (testigo), el patógeno ocasionó defoliación y es posible que estas hojas no fueron seleccionadas para la evaluación que probablemente presentarían 100 % de severidad y de modo que presentaron bajos valores de severidad. Igualmente, en todos los tratamientos hubo un ligero incremento de severidad por que las condiciones medioambientales no eran favorables para el desarrollo de la enfermedad en el mes de marzo, debido a que fue un mes de características secas, es decir con precipitaciones de 26.80 mm por debajo de su promedio normal de diez años (131.01mm).

Estas características deficitarias de precipitación en el mes de marzo no fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad debido a que las esporas se deshidratan y la esporulación desaparece (); puesto que, Kumar et al. (2006) mencionan que los factores determinantes para que el crecimiento del patógeno y desarrollo de la enfermedad son temperaturas frescas (23 °C) y humedad relativa (mayor 90 %) lo cual no se presentó en el mes de marzo e hizo que la severidad sea menor y en algunos tratamientos que recibieron el control se detuvo la enfermedad con ligeros incrementos. Por el contrario, los incrementos de severidad desde la primera evaluación hasta la tercera evaluación, se registró en el mes de febrero e inicios del mes de marzo, se debió a que las condiciones ambientales fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad, en donde se registró precipitaciones durante todo el mes e hizo que la enfermedad se disemine y se desarrolle el patógeno.

Los tratamientos que fueron aplicados con las cepas T1, T2 y T3, resultaron ser los menos afectados con la enfermedad, presentaron un lento aumento y posterior disminución de la severidad en el tiempo, puede deberse a la expansión más rápida de las hojas que al desarrollo de síntomas (). Además, se observó en estos tratamientos plantas bien desarrolladas con buen follaje, probablemente las cepas de *Trichoderma* actuaron como promotores de crecimiento (). Igualmente estos resultados concuerdan con Plata and Callizaya (2013), quienes reportaron dos grupos de *Trichoderma*, un grupo de cuatro cepas de *Trichoderma* inhibieron el desarrollo del mildiu y promovieron el desarrollo de las plantas de quinua, y un segundo grupo solo controlaron la enfermedad en mayor proporción.

Desde el punto de vista del control biológico, se demostró que todas las cepas de *Trichoderma* sp aisladas de quinua resultaron ser endófitos, capaces de reducir la severidad del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.). No existen reportes sobre el control del mildiu en quinua con el uso de hongos endófitos; sin embargo existen estudios para el control de otros patógenos de importancia en la agricultura, siendo el estudio más impactante en especies tropicales, en *Theobroma cacao* L., la inoculación con endófitos redujo significativamente la necrosis foliar y la mortalidad causada por *Phytophthora palmivora* (). Igualmente, se encontraron hongos endófitos mostrando antagonismo *In vitro* mediante pruebas de antibiosis y micoparasitismo contra *Moniliophthora roreri* (moniliasis), *Phytophthora palmivora* (pudrición parda) y *Moniliophthora perniciosa* (escoba de bruja), inhibieron significativamente el crecimiento micelial de los patógenos(;).

Por lo tanto, la reducción de la severidad podría atribuirse a un efecto directo del endófito sobre la propagación de *Peronospora variabilis* Gäum. y varios mecanismos podrían ser responsable de esa

reducción. Se ha reportado de que los agentes de control biológico pueden producir sustancias que atacan directamente a los patógenos o que inducen la resistencia sistémica, lo que a su vez reduce la incidencia de patógenos en el huésped de la planta(). El efecto directo de las cepas de *Trichoderma* spp sobre el patógeno se debió a las aplicaciones foliares que se realizaron a razón de  $1 \times 10^7$  ufc. ml<sup>-1</sup> que fue adecuada sobre el control de la enfermedad reduciendo la severidad. Es posible que estas cepas proliferaron y supervivieron en las plantas durante un período prolongado después de la aplicación, principalmente en tejidos que suelen ser propensos a infección por el patógeno objetivo, lo cual concuerda con los hallazgos de otros investigadores que aplicaron la cepa endófito *Trichoderma martiale* ALF 247 para el control de *Phytophthora palmivora* en concentraciones que oscilaban entre  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^7$  conidios por mililitro, la severidad de la enfermedad disminuyó proporcionalmente y han demostrado que la cepa es un endófito que coloniza toda la planta después de la aplicación().

Igualmente las aplicaciones que se realizaron en cuatro momentos críticos del desarrollo fenológico del cultivo (durante la ramificación, panojamiento, floración y grano lechoso) fue ideal para mantener las poblaciones de *Trichoderma* sp sobre la superficie de la planta, colonice y ejerza sus mecanismos de acción sobre el patógeno. Es probable que estos endófitos parasitaron las hifas del patógeno por diversos medios como enrollamiento, penetración a las hifas de los agentes patógenos y secretaron enzimas para descomponer la pared celular del patógeno conforme a lo reportado por Harman (2006) y Martínez et al. (2013). Así por ejemplo, *Trichoderma* sp son capaces de parasitar las hifas del patógeno de las plantas *Rhizoctonia solani* y muchas de estas observaciones están relacionadas con control biológico (). De manera semejante, Macagnan, Romeiro, and Pomella (2008) señalan que cuando los endófitos colonizan la superficie de la planta, ellos producen enzimas para hidrolizar paredes celulares de la planta. Como resultado, estas enzimas también tienen la función de suprimir directamente las actividades del

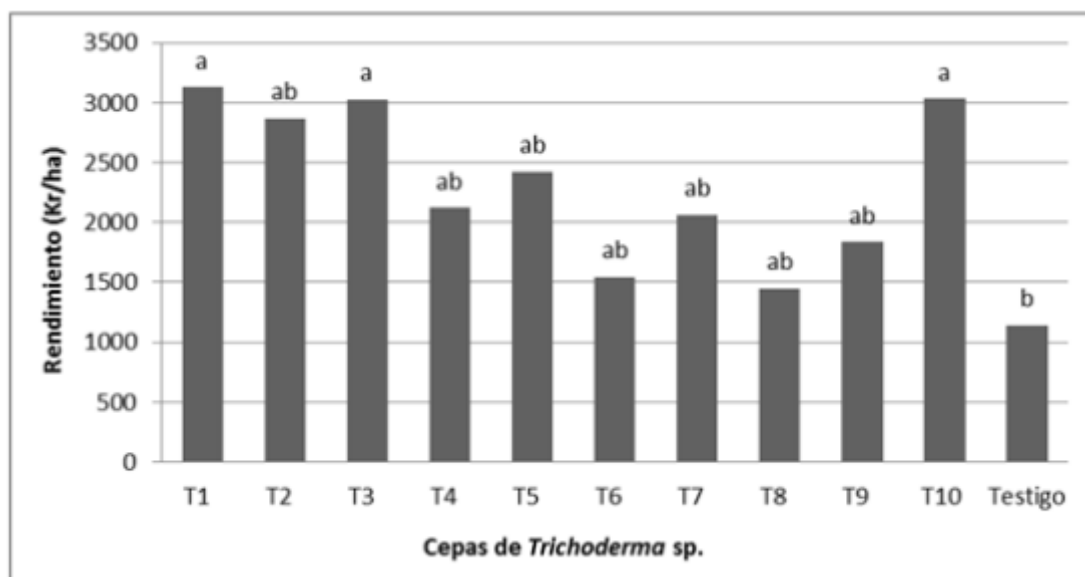
patógeno de la planta y tienen la capacidad de degradar las paredes de la célula de los hongos y Oomycetes.

A su vez, las aplicaciones que se realizaron a nivel de semilla tuvo un efecto positivo en el control del inóculo primario de *Peronospora variabilis* Gäum., debido a que en la superficie de las semillas se encuentran las oosporas, estructuras de reproducción sexual, que es fuente de inóculo para dar inicio a la enfermedad (; ; ) y al peletizar las semillas con las cepas de *Trichoderma* sp es probable que estos endófitos tuvieron efecto directo sobre el patógeno utilizando uno o varios mecanismos de acción para reducir las poblaciones de oosporas y se pudo observar plantas sanas hasta los 90 días después de la siembra a diferencia del control en donde no se aplicó estos hongos en la superficie de las semillas. Ya que, existen reportes en donde indican los efectos beneficiosos que tienen algunas especies de *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma pseudokoningii*, en la reducción de la incidencia de patógenos fúngicos transmitidos por semillas(). Además, otros estudios han confirmado la mejora de la germinación de las semillas, así como el aumento de la frecuencia de plantas sanas y el aumento del rendimiento con aplicaciones de *T. harzianum* y *T. viride* (). Investigaciones demuestran que especies de *T. virens* y *T. harzianum* resultaron tener efecto antagónico de *M. royeri*, *Phytophthora* spp., y *M. pernicioso* en sistemas agroforestales-cacaotales (*Theobroma cacao* L.)()

#### **Efecto de cepas de *Trichoderma* sp. endófitos en el rendimiento de *Chenopodium quinoa* Willd.**

El análisis de varianza (ANDEVA) del rendimiento de grano de *Chenopodium quinoa* Willd mostró significancia ( $Pr < 0.05$ ) para las cepas de *Trichoderma* sp con un C.V. de 13.51 % y un  $R^2$  de 0.89. Estando el rendimiento de todos los tratamientos que recibieron aplicaciones de *Trichoderma* sp significativamente mayores al testigo (1141.27 kg.ha<sup>-1</sup>) con valores comprendidos entre 1445.34 kg.ha<sup>-1</sup> a 3127.3 kg.ha<sup>-1</sup>, siendo los tratamientos con las cepas T1 (3127.3 kg.ha<sup>-1</sup>), T3 (3029.12 kg.ha<sup>-1</sup>) y T10 (3032.54 kg.ha<sup>-1</sup>) con mayor rendimiento (Figura 1).





**Figura 1.** Rendimiento de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) var. Salcedo INIA tratadas con cepas de *Trichoderma* sp. en el CIP Camacani de la UNA, durante la campaña agrícola 2015 – 2016. Fuente: Elaboración propia

Existen reportes donde indican que de 30 cepas de *Trichoderma* seis inhibieron la enfermedad y a su vez mejoraron el crecimiento de las plantas (Plata *et al.*, 2013) lo cual concuerda con los resultados de esta investigación. Puesto que los efectos de cepas de *Trichoderma* sp sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas tienen implicaciones económicas importantes, así como mejorar el vigor de las plantas para superar las tensiones bióticas y / o abióticas (Toghueo *et al.*, 2016). Por lo tanto, el uso de estas cepas en la mejora y protección del crecimiento de las plantas es de importancia en el sistema de agricultura sostenible, ya que los fertilizantes químicos y los pesticidas no son económicos a largo plazo debido a su costo y a la contaminación ambiental. La promoción del crecimiento de las plantas se observa a menudo en respuesta a la colonización de *Trichoderma* sp (Harman, 2006; Rinu *et al.*, 2014). Es probable que las cepas de *Trichoderma* endofito cree condiciones de crecimiento más favorables que conduzcan a un mejor crecimiento de la planta. (Toghueo *et al.*, 2016) Los resultados estuvieron de acuerdo con los hallazgos de otros investigadores que sugirieron que además de su capacidad de biocontrol, algunas especies de *Trichoderma* spp son capaces de promover el crecimiento de las plantas (Hoyos-Carvajal *et al.*,

2009). De igual modo, muchos estudios demostraron que plantas infectadas con endófitos obtienen promoción del crecimiento, la resistencia a la estrés por sequía y la tolerancia a la condiciones inadecuadas del suelo (Malinowski *et al.*, 2004). Así por ejemplo, semillas tratadas con la cepa T22 de *T. harzianum*, respondieron positivamente y hubo un aumento de rendimiento (Harman, 2006); aplicaciones de *Trichoderma* endofito con fertilizantes orgánicos e inorgánicos en plantaciones de cacao obtuvieron incrementos porcentuales positivos en el rendimiento con respecto al control absoluto(). Lu *et al.* (2000) señalan que la mejora del crecimiento de la planta puede estar influenciada por compuestos como fitohormonas producidas por hongos endófitos como el ácido indolacético (IAA) y sus análogos. Además, la producción de algunos ácidos orgánicos tales como los ácidos glucónico cítrico y/o fumárico (Vinale *et al.*, 2008) reduce el pH del suelo, dando como resultado la solubilización de fosfatos. (Toghueo *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

- Se logró la mayor colonización endofítica de cepas de *Trichoderma* en quinua con el método de infestación del sustrato; siendo las cepas T10, T3

y T2 con mayor colonización en plantas de quinua a los 60 días de evaluación.

- Los valores de AUDPC fueron significativamente menores en los todos los tratamientos que recibieron aplicaciones de *Trichoderma* sp que el testigo (AUDPC = 1670.5), siendo los tratamientos con las cepas T1, T3 y T2 menos afectados con valores de AUDPC de 615.7, 706.8 y 759 respectivamente en comparación a los tratamientos con las cepas T6 (AUDPC = 1198.7) y T8 (AUDPC = 1168.9) que fueron los que presentaron los valores altos de AUDPC. Similar tendencia ocurrió en el rendimiento (3127.30, 3029.12 y 2866.57 kg. ha<sup>-1</sup> respectivamente) en comparación al Testigo con 1141.27 kg. ha<sup>-1</sup> respectivamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arévalo, E., Canto, M., Leon, B., Meinhardt, L., & Cayotopa, J. (2010). Colonización de plántulas de *Theobroma cacao* por aislamientos de *Trichoderma* endófitos con potencial de control biológico. Paper presented at the XXI Congreso Peruano de Fitopatología., Tarapoto, Perú.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kyllö, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci US A*, 100(26), 15649-15654.
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (1996). Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany*, 74(8), 1195-1202. doi: 10.1139/b96-144
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.-H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3279-3295. doi: 10.1093/jxb/erp165
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46(1), 24-35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., . . . Holmes, K. A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224(6), 1449-1464. doi: 10.1007/s00425-006-0314-0
- Carroll, G. (1988). Fungal Endophytes In Stems And Leaves - From Latent Pathogen To Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69(1), 2-9. doi: 10.2307/1943154
- Danielsen, S., & Ames, T. (2000). El mildiu (*Peronospora farinosa*) de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en la zona andina. (Vol. I). LIMA-PERU: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Danielsen, S., Bonifacio, A., & Ames, T. (2003). Diseases of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Reviews International*, 19(1-2), 43-59. doi: 10.1081/FRI-120018867
- Danielsen, S., Mercado, V. H., Ames, T., & Munk, L. (2004). Seed transmission of downy mildew (*Peronospora farinosa* f.sp. *chenopodii*) in quinoa and effect of relative humidity on seedling infection. *Seed Science and Technology*, 32(1), 91-98.
- Danielsen, S., & Munk, L. (2004). Evaluation of disease assessment methods in quinoa for their ability to predict yield loss caused by downy mildew. *Crop Protection*, 23(3), 219-228. doi: 10.1016/j.cropro.2003.08.010
- De Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, H., & Hebbbar, P. K. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, 46(1), 36-45. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.010>
- Dirección General De Políticas Agrarias. (2017). La Quinua: Producción y Comercio del Perú (D.-. MINAGRI, Trans.). In C. A. Romero (Ed.), *Boletín : Perfil tecnico (DGPA - MINAGRI ed., Vol. 2, pp. 8)*. Lima - Perú MINISTERIO DE AGRICULTURAY RIEGO.

- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149-160.
- Gallery, R. E., Dalling, J. W., & Arnold, A. E. (2007). Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with cecropia. *Ecology*, 88(3), 582-588.
- Gao, F.-k., Dai, C.-C., & Liu, X.-Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(13), 1346-1351.
- Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J., & Berg, G. (2006). Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research*, 110(12), 1464-1474.
- Guédez, C., Cañizález, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2009). Efecto antagonico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 34-38.
- Hanada, R. E., Pomella, A. W. V., Soberanis, W., Loguercio, L. L., & Pereira, J. O. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*, 50(2), 143 - 149 . doi : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.04.005>
- Hanson, L. E., & Howell, C. R. (2004). Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma viren*. *Phytopathology*, 94 ( 2 ) , 171 - 176 . doi : 10.1094/PHYTO.2004.94.2.171
- Harman, G. E. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190
- Kumar, A., Bhargava, A., Shukla, S., Singh, H. B., & Ohri, D. (2006). Screening of exotic *Chenopodium quinoa* accessions for downy mildew resistance under mid-eastern conditions of India. *Crop Protection*, 25(8), 879-889. doi: 10.1016/j.cropro.2005.11.012
- Leon, B., Rojas, M., Rodriguez, G., Arévalo, E., & Márquez, K. (2010). Antibiosis y micoparasitismo a los principales patógenos de cacao (*Theobroma cacao*) por hongos endófitos. Paper presented at the XXI Congreso Peruano de Fitopatología., Tarapoto, Perú.
- López-Ferrer, U. d. C., Brito-Vega, H., López-Morales, D., Salaya-Domínguez, J. M., & Gómez-Méndez, E. (2017). Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestales-cacaotal como un agente antagonico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(1), 91-100.
- Macagnan, D., Romeiro, R. d. S., & Pomella, A. W. (2008). Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control*, 47(3), 309-314.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28, 1-11.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. V., Arnold, A. E., Hebbar, P., ... Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46 ( 1 ) , 4 - 14 . doi : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
- Montgomery, D. C. (2008). Design and analysis of experiments (7th ed.): John Wiley & Sons.

*Betsabe Leon Tacca; Nora Ortiz Calcina; Condori Ticona Norma; Chura Yupanqui Ernesto*