



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
“MANUEL FÉLIX LÓPEZ” “ESPAM “MFL”**

INGENIERÍA AGRÍCOLA

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÍCOLA**

Tema:

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO “*In vitro*” DE *Trichoderma* spp. EN DOS MEDIOS DE CULTIVO Y SU ANTAGONISMO FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp.

AUTOR: PIERO C. FAJARDO NAVARRETE.

TUTOR: ING. LENÍN VERA MONTENEGRO.

Calceta, Abril de 2008.

DECLARACIÓN

Yo, Piero Cristóbal Fajardo Navarrete, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. "Manuel Félix López", según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



PIERO CRISTÓBAL FAJARDO NAVARRETE

CERTIFICACIÓN

Ing. Agr. Lenín Vera Montenegro certifica haber tutorado la tesis titulada "EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO *in vitro*" DE *Trichoderma* spp. EN DOS MEDIOS DE CULTIVO Y SU ANTAGONISMO FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rizopus* spp.", que ha sido desarrollada por Piero Cristóbal Fajardo Navarrete, previa a la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. "Manuel Félix López".



ING. LENÍN VERA MONTENEGRO

TUTOR DE TESIS

APROBACIÓN

Quienes abajo firmamos, miembros del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** la tesis titulada "EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO *in vitro*" DE *Trichoderma* spp. EN DOS MEDIOS DE CULTIVO Y SU ANTAGONISMO FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rizopus* spp.", que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Piero Cristóbal Fajardo Navarrete, previa a la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. "Manuel Félix López".



Ing. Enrique Párraga Muñoz
MIEMBRO



Ing. Ángel Guzmán Cedeño
MIEMBRO



Ing. Byron Zevallos
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

A la Institución que me dio la oportunidad de capacitarme no solo en su seno, sino también me apoyo para hacerlo a nivel internacional para poder realizar este trabajo de tesis.

A los catedráticos de la institución que me brindaron sus conocimientos sin guardarse nada para poder alcanzar esta meta propuesta,

Al personal del laboratorio de Microbiología de la ESPAM" MFL" que me brindaron su apoyo incondicional en la realización de este trabajo y soportaron pacientemente el tiempo que estuve con ellos,

Al personal del laboratorio de Química de la ESPAM" MFL" por el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis.

A la Ingeniera Lorena Carreño por su ayuda en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Ingeniero Oswaldo Zambrano por su ayuda en el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi madre que ha sido y será el pilar fundamental en mi vida y así obtener este título de tercer nivel de educación que me llena de tanto orgullo, y

A Dios que me a dado la fortaleza para vencer todos mis miedos y problemas logrando así conseguir esta meta y poder decir soy profesional aquí estoy Calceta.

DEDICATORIA

A mis padres por darme la gracia de la vida, en especial a mi madre por su apoyo, esmero y dedicación durante todos los años de mi vida, a la que dedico este logro que me llena de tanto orgullo y felicidad, este es un regalo para ti mamá.

A mi mujer por darme la inmensa felicidad de ser padre y poder compartir con mi hija lo aprendido en esta etapa de mi vida.

A la juventud del cantón Bolívar porque cuando uno se propone una meta con esfuerzo y dedicación la conseguirás, no importan los obstáculos y los problemas que se tengan en la vida siempre hay una luz en el fondo del túnel.

"..... y porque esta gran humanidad a dicho ¡basta! y a echado a andar....."

Che

CONTENIDO

DECLARACIÓN	ii
CERTIFICACIÓN	iii
APROBACIÓN	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
RESUMEN	x, xi
SUMARY	xii, xiii
I. ANTECEDENTES	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	3
1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.4.1. GENERAL.....	4
1.4.2. ESPECIFICO.....	4
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. IMPORTANCIA DEL CONTROL BIOLÓGICO.....	5
2.2. CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE <i>Trichoderma</i> spp.	8
2.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	8
2.2.2. ASPECTOS GENERALES.....	8
2.2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	10
2.2.4. MECANISMO DE ACCIÓN.....	12
2.2.5. BENEFICIOS DE LA APLICACIÓN DE <i>Trichoderma</i> spp.	16
2.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOPATÓGENOS.....	17
2.3.1. <i>Fusarium</i> spp.	17
2.3.2. <i>Sclerotinia</i> spp.....	19
2.3.3. <i>Rizopus</i> spp.....	19
2.4. MÉTODO PARA REALIZAR EL ANTAGONISMO.....	20
2.5. METODO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS.....	21
2.6. MEDIOS DE CULTIVO USADOS EN EL AISLAMIENTO DE HONGOS.....	23
III. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
3.2. PROCÉDIMIENTO.....	27
3.2.1. FACE DE CAMPO.....	24
3.2.2. FACE LABORATORIO.....	25

3.3. BIOENSAYO 1: EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO "in vitro" DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp., EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.	30
3.3.1. FACTORES EN ESTUDIO.....	30
3.3.2. DETALLE DE LOS TRATAMIENTOS.....	31
3.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
3.3.4. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	31
3.3.5. ANALISIS ESTADISTICO.....	32
3.3.6. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	32
3.3.7. DATOS TOMADOS Y METODOS DE EVALUACIÓN.....	32
3.4. BIOENSAYO 2: ANTAGÓNISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. FRENTE A <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	33
3.4.1. FACTORES EN ESTUDIO.....	33
3.4.2. DETALLES DEL TRATAMIENTO.....	33
3.4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
3.4.4. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	34
3.4.5. GRAFICOS ESTADÍSTICO.....	34
3.4.6. MANEJO DEL EXPERIMENTO.....	34
3.4.7. DATOS TOMADOS Y METODOS DE EVALUACIÓN.....	35
IV. RESULTADOS	36
4.1. BIOENSAYO 1.....	36
4.1.1. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO "in vitro" DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp., EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.....	36
4.1.2. ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS DE <i>Trichoderma</i> spp. Y DEL MEDIO DE CULTIVO (PDA).....	40
4.2. BIOENSAYO 2.....	41
4.2.1. ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. (Cepas TAC1) FRENTE <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	41
4.2.2. ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. (Cepas TAE1) FRENTE <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	44
4.2.3. ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. (Cepas TAC2) FRENTE <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	46
V. DISCUSIÓN.....	50
5.2.1. ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. (Cepas TAC1) FRENTE <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	51
5.2.2. ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. (Cepas TAE1) FRENTE <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	52
5.2.3. ANTAGONISMO DE <i>Trichoderma</i> spp. (Cepas TAC2) FRENTE <i>Fusarium</i> spp., <i>Sclerotinia</i> spp., y <i>Rizopus</i> spp.....	52
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
6.1. CONCLUSIONES.....	54

6.2. RECOMENDACIONES.....	55
VII. BIBLIOGRAFIA.....	57
VIII. ANEXOS.....	61

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el potencial del hongo *Trichoderma* spp., como agente de control biológico de varios fitopatógenos que afectan a diversos cultivos durante todo su ciclo de desarrollo, se llevaron a cabo dos bioensayos en el año 2006.

En el primer bioensayo se evaluó la velocidad del crecimiento de *Trichoderma* spp., en dos medios de cultivo: Papa dextrosa agar (PDA), Agar extracto de malta (AEM). Se utilizaron ocho cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de tres áreas de producción de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM) "Manuel Félix López" ("MFL"), localizada en Calceta-Manabí y codificadas de la siguiente manera:

- TACv1= *Trichoderma* spp., área de producción convencional (Cepa 1).
- TACv2= *Trichoderma* spp., área de producción convencional (Cepa 2).
- TAC1 = *Trichoderma* spp., área cultivo cacao (Cepa 1).
- TAC2 = *Trichoderma* spp., área cultivo cacao (Cepa 2).
- TAC3 = *Trichoderma* spp., área cultivo cacao (Cepa 3).
- TAC4 = *Trichoderma* spp., área cultivo cacao (Cepa 4).
- TAE1 = *Trichoderma* spp., área de producción ecológica (Cepa 1).
- TAE2 = *Trichoderma* spp., área de producción ecológica (Cepa 2).

El diseño experimental utilizado en este bioensayo fue un Completo Aleatorizado (DCA) con tres replicas. Se estudiaron dos factores; factor A: Cepas; factor B: Medios de cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron en las cepas TAC1, TAE1, TAC2 y el medio PDA. Las cuales fueron posteriormente utilizadas en el bioensayo 2, en donde se midió la capacidad antagónica de las cepas seleccionadas en el bioensayo 1 frente a los fitopatógenos *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp., el diseño experimental utilizado fue un Completo Aleatorizado (DCA) con cuatro replicas. Donde se corroboró *in vitro* que *Trichoderma* spp., ejerce

un control del 100% sobre los tres fitopatógenos en estudio al quinto día evaluado.

En conclusión las cepas TAC1, TAE1 y TAC2 ejercen un control eficiente de los fitopatógenos en estudio a nivel "*in vitro*" pero la que tiene mejores características para ser multiplicada y liberada en campo es la cepa TAC2, ya que su esporulación es mayor. Esta característica es fundamental para que el hongo sea establecido con mayor rapidez en un campo determinado, con relación a la TAC1 y TAE1 que su esporulación es menor a pesar que su crecimiento es bueno.

SUMMARY

In order to evaluate the potential of the fungus *Trichoderma* spp. as a biological control agent of various phytopathogens affecting to different cultivation during all cycle of evolution, two assays were carried out in the year 2006.

The first assay was evaluated the speed of rise of *Trichoderma* spp., in two "culture medias": 1) Pope Agar Dextrosa (PDA); and other, 2) Agar Extract of Malta (AEM). The work procedure in this first phase of study was established using 8 "strains" of *Trichoderma* spp., insulate in three area of production in the superior farming and Livestock Polytechnic School of Manabí (ESPAM) "Manuel Félix López" ("MFL") located in Calceta-Manabí, with the following code identification:

TACv1 = *Trichoderma* spp. Area of conventional production # 1.

TACv2 = *Trichoderma* spp. Area of conventional production # 2.

TAC1 = *Trichoderma* spp. Area of the cacao # 1.

TAC2 = *Trichoderma* spp. Area of the cacao # 2.

TAC3 = *Trichoderma* spp. Area of the cacao # 3.

TAC4 = *Trichoderma* spp. Area of the cacao # 4.

TAE1 = *Trichoderma* spp. Area of ecological production # 1.

TAE2 = *Trichoderma* spp. Area of ecological production # 2.

The experimental design used in this bioassay was a complete aleatory (DCA) with three replications. Two factors were studied. "strains" of (Factor A) and "culture medias" (Factor B). The best results were obtained in the strains: TAC1, TAE1, TAC2 and the culture media codified as: PDA. Which were used subsequently in the bioassay 2. Where was evaluated the antagonist capacity of selected strains in bioassay # 1 in from of the phytopathogens *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. and *Rhizopus* spp. It was established a randomized block design with a complete aleatory (DCA); which four replications. Here it was confirmed "*in vitro*" that the

Thichoderma spp., holds the control of 100% up the three pathogens in the fifth day of evaluate stady.

In conclusion, the strains TAC1, TAE1 and TAC2 producing a good biological control "in vitro" of the phytopathogens used in this study; however, the strains codified as:TAC2 showed the best characteristic to be multiplied and liberated in the field, because a the higher sporulations observed during its development. This last characteristic is fundamental to fast establish in the field. While the strains TAC1 and TAE1 showed a poor sporulation although it's good development.

I. ANTECEDENTES

1.1. – INTRODUCCIÓN.

El uso de microorganismos antagonistas de fitopatógenos habitantes del suelo, cobra cada vez más importancia ya que su aplicación no genera desequilibrios biológicos, y más bien regula o minimiza las poblaciones de fitopatógenos habitantes del suelo, esta acción de los antagonistas indudablemente conduce a la disminución o eliminación del uso de productos químicos que son nocivos para el entorno.

En nuestro país estos estudios son muy incipientes o se los ha realizado muy superfluamente, desaprovechando de esta manera la posibilidad de manejar problemas fitopatológicos a muy bajos costos y sin riesgos para el medio ambiente.

Para Baker, K. y Cook, J. (1983), se entiende por control biológico la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente del antagonistas del patógeno que se quiere controlar, hablemos de control biológico haciendo referencia a la utilización de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades, entendiéndose por antagonistas aquellos organismos que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

Los autores antes en mención, manifiestan que el control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir la incidencia de enfermedades, excluyendo el control químico. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya

enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, el control biológico funciona naturalmente.

Rollán, M. *et al* (1998), mencionan que en condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. La disminución de la flora de competencia por prácticas agrícolas como lavado de frutos, aplicación de fungicidas, y desinfección de suelos entre otras, favorecen el desarrollo de los patógenos.

La posibilidad de desarrollar y aplicar esta tecnología en el país debe ser estudiada, como una alternativa de manejo inocuo de problemas fitosanitarios causado por hongos habitantes del suelo, que parasitan las raíces de las plantas.

1.2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Incremento de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos habitantes del suelo, unido al uso indiscriminado de agroquímicos que no funcionan bien en el manejo de las enfermedades, pero que si perjudican a la flora benéfica del suelo que por desconocimiento de su uso, clasificación, mecanismo de acción no son aprovechados por nosotros para el control de fitopatógenos.

Ya en el año 1987 un estudio realizado por la National Academy of Sciences (NAS) reportaba que 9 compuestos oncogénicos abarcaban el 90 % de todas las ventas de fungicidas. Este mismo reporte indica que los fungicidas constituyen el 60% del riesgo de contraer cáncer, de todos los pesticidas usados en la producción de alimentos Wilson, Ch., y Wisniewski, M. (1989).

En nuestras zonas de producción no contamos con una cepa nativas de *Trichoderma* spp., para ser usada en el control eficiente de enfermedades y evitar el uso de fungicidas que tanto daño han causado. Mas aún si consideramos los reportes médicos que confirman que los

ecuatorianos tienen uno de los mayores índices de cáncer de estómago en el mundo Suquilanda, M. (1996), siendo una de las causas los alimentos contaminados.

1.3.- JUSTIFICACIÓN.

El presente trabajo de investigación pretende aislar, purificar y multiplicar cepas del género ***Trichoderma*** spp., nativos, que realicen un eficiente control de enfermedades e inhiban el crecimiento de fitopatógenos habitantes del suelo. Con ello se puede evitar el uso de fungicidas que contaminan nuestros suelos.

Como se conoce los fungicidas no son selectivos y también eliminan la flora benéfica provocando un desequilibrio natural, lo mismo que ha permitido que los hongos fitopatógenos adquieran resistencia y sean más agresivos; con este trabajo se busca obtener a nivel *in vitro* cepas nativas de ***Trichoderma*** spp., que tengan características parasíticas contra fitopatógenos de suelo, con la finalidad que sean evaluadas en trabajos futuros a nivel de campo.

Pero para poder obtener buenos resultados en la liberación de ***Trichoderma*** en campo, se hace necesario obtener el conocimiento y dominio en la cría, multiplicación, liberación y sobre todo evaluación de estos organismos a nivel *in vitro*. Con la obtención de cepas nativas de cada zona de producción por su adaptabilidad a las condiciones climáticas presentes en la zona donde fue aislada.

Con estos antecedentes se justifica la realización de este trabajo para la obtención de cepas nativas del género ***Trichoderma*** spp., y así obtener mayor conocimiento sobre el mecanismo de este hongo a nivel *in vitro*; contribuyendo a fomentar el interés de buscar organismos que pueden ser usados en la producción agrícola y el enriquecimiento de la microflora de nuestros suelos agrícolas con un microorganismo que

tiene grandes propiedades benéficas, por todos estos antecedentes se planifico esta investigación, que tubo los siguientes objetivos.

1.4.- OBJETIVOS.

1.4.1.- GENERAL:

- ❖ Evaluar *in vitro* el crecimiento y la eficacia antagónica de ***Trichoderma*** spp., aislados de diferentes áreas de producción de la ESPAM“MFL”, como una alternativa de control biológico de distintos fitopatógenos.

1.4.2.- ESPECÍFICOS:

- ❖ Aislar cepas del genero ***Trichoderma*** spp. de diferentes áreas de producción agrícola de la ESPAM“MFL”.
- ❖ Determinar el medio de cultivo mas eficaz para el crecimiento de las cepas de ***Trichoderma*** locales.
- ❖ Observar algunas características de las cepas aisladas de ***Trichoderma*** spp.
- ❖ Medir el antagonismo de ***Trichoderma*** spp., frente a los hongos fitopatógenos ***Fusarium*** spp., ***Sclerotinia*** spp., y ***Rhizopus*** spp., para determinar la efectividad biológica (cultivo dual).

II. MARCO TEÓRICO

2.1.- IMPORTANCIA DEL CONTROL BIOLÓGICO.

DeBach, P. (1974), al referirse al control biológico lo hace en estos términos: “El control biológico en un sentido ecológico se puede definir como la regulación por medio de enemigos naturales la densidad poblacional de otro organismo, a un promedio menor del que existiría en ausencia de tales enemigos”. La utilización intencional de enemigos naturales de plagas y enfermedades para regular sus poblaciones involucra una serie de actividades que forman parte del control biológico aplicado, cuya historia se remonta al siglo pasado.

Por otra parte Andrews, K., y Quezada, J. (1989), sostiene que el control biológico posee un gran potencial que solo aflora en relación al esfuerzo que se ponga en su desarrollo y el apoyo que reciban esos esfuerzos. Las inversiones en las investigaciones básicas sobre el control biológico, la importación de enemigos naturales, el desarrollo de centros de cría de enemigos naturales, siempre se ven colmadas de buenas retribuciones, como se ha probado en muchos países que han dedicado recursos humanos y financieros a esas actividades.

Para Landez, E. (1999), el control biológico utiliza los mismos mecanismos de la naturaleza para combatir a las plagas y enfermedades esto incluye el uso de insectos, ácaros, y nemátodos benéficos; el empleo de productos biológicos derivados de otros vegetales; el uso de virus, hongos y bacterias que afecten a las plagas, e inhiban el crecimiento de fitopatógenos.

El control biológico involucra el uso de parasitoides, depredadores y patógenos para evitar los problemas fitosanitarios, esto es un fenómeno natural que cuando es aplicado exitosamente provee una solución

permanente, armoniosa y económica a muchos de los problemas con plagas y enfermedades.

Según Hall, I. (1974), el potencial o capacidad de diseminación de un organismo bio-controlador depende de varios factores: la virulencia del microorganismo, susceptibilidad del huésped y transmisión de un individuo a otro o de una población a otra. La mayoría de los patógenos depende para su movilidad de factores físicos (agua, viento) o bióticos (parásitos y depredadores).

Esposito, E. y DaSilva, M. (1998), manifiestan que el género ***Trichoderma*** es un grupo de hongos ampliamente utilizado, debido a sus múltiples usos en la agricultura, es el fungicida biológico más estudiado y empleado; de igual forma es estimulador de crecimiento en plantas y utilizado como agente de bioremediación, ya que degrada algunos grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente.

Bell, D. *et al.* (1982), mencionan que las primeras investigaciones en ***Trichoderma*** sp., fueron realizadas por Porter en 1924, Weindling en 1936, Allen y Naenseler en 1940; pero estos estudios fueron rápidamente abandonados, sea por el auge que la lucha química asumía en aquellas épocas, como también por su complejidad.

Biocontrol, (2005), manifiesta que las especies de ***Trichoderma***, ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagonistas, poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas. Según Dennis y Webster, (S/F); citado por Biocontrol, (2005), dicen que lo que permite diferenciar las especies de ***Trichoderma*** es un pronunciado aroma a coco que se desprende del medio de cultivo.

Trichoderma harzianum por ejemplo, es un bio-regulador y antagonista natural de los fitopatógenos ***Rhizoctonia solani***, ***Fusarium oxysporum***, ***Fusarium rosseum***, ***Botrytis cinerea***, ***Sclerotium rolfsii***,

Sclerotinia sp., ***Phythium*** sp., ***Alternaria*** sp., ***Armillaria mellea***, ***Rosellinia*** sp., ***Trichoderma*** sp., actúa como agente de control biológico, disminuyendo o eliminando la necesidad de tratar con fungicidas químicos, Biocontrol, (2005).

El mismo autor antes citado, señala que en Cuba a partir de 1990 se efectuaron diversos estudios dirigidos al Biocontrol de hongos del suelo patógenos al tabaco, hortalizas y otros cultivos con aislamientos de ***Trichoderma*** que fueron seleccionados "*in vitro*" por su elevada capacidad hiperparásita y posteriormente utilizados en forma de bio-preparados para combatir ***Phytophthora nicotianae***, ***Phytophthora capsici***, ***Rhizoctonia solani*** y otros fitopatógenos en condiciones de campo.

Jiménez, J. (1990), señala que el país antes mencionado tiene 15 años de experiencia en la producción de bio-plaguicidas a base de ***Bacillus thuringiensis*** y varios hongos entomopatógenos como ***Beauveria bassiana***, con una producción de 913 toneladas en 1995, ***Metarrhizium anisopliae*** se produjeron 157,59 toneladas y de ***Trichoderma*** sp., se elaboran un promedio de 250 toneladas por año, que permiten proteger mas de 100000 hectáreas (ha), de cultivos de importancia económica, que constituyen el soporte del Programa Nacional de Producción de Medios Biológicos del Ministerio de la Agricultura, supervisado por el Centro Nacional de Sanidad Vegetal.

De La Cruz, W. (1987), estudió la actividad antagónica de ***Trichoderma*** sp., contra ***Fusarium*** sp., ***Phyitium*** sp., y ***Rhizoctonia*** sp., agentes causales del mal de almacigo en pruebas "*in vitro*", determinando que ***Trichoderma*** spp., paraliza el crecimiento de los hongos patógenos, además se ha evidenciado la influencia de los medios de cultivo en el desarrollo de los hongos.

2.2.- CARACTERÍSTICAS RELEVANTES DE *Trichoderma* spp.

2.2.1- CLASIFICACIÓN TAXONOMÍA.

Bold, H. (1980), clasifica al género *Trichoderma* de la siguiente manera:

Reino	<i>Myceteae</i>
División 3	<i>Amastigomycota</i>
Sub-división 4	<i>Deuteromycetes</i>
Clase-forma 1	<i>Deuteromycetes</i>
Sub-clase 2	<i>Hyphomycetidae</i>
Forma-orden 1	<i>Moniliales</i>
Familia-forma	<i>Moniliaceae</i>
Género-forma	<i>Trichoderma</i>
Especie	spp.

2.2.2- ASPECTOS GENERALES.

El *Trichoderma* spp., es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenece a la subdivisión *Deuteromycete* que se caracterizan por no poseer o no presentar un estado sexual determinado.

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por estos

microorganismos Harman, G. (2001); citado por Biocontrol, (2005). Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* spp., la posibilidad de ser utilizado en la industria de la biotecnología.

Para Biocontrol (2005), las especies de *Trichoderma* ampliamente difundidas en la comunidad microbiana de los suelos y con marcadas propiedades antagónicas, poseen representantes caracterizados por su alta producción de sustancias gaseosas. Según Dennis, A., y Webster, W; citados por Biocontrol, (2005) lo que permite diferenciar a estas últimas, es un pronunciado aroma a coco que se desprende del cultivo.

Trichoderma spp., tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, a parte de esto produce una gran cantidad de enzimas, inducidas con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y a hábitat donde los hongos causan enfermedad le permiten ser eficiente agente de control, de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos Trosno, A., y Gordon, L. (1998); citado por Biocontrol, (2005). Además su gran variabilidad se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos.

Los preparados a base de este hongo se pueden presentar tanto en formulación líquida, como en sólida, conteniendo en cualquier caso un mínimo de 1×10^7 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de peso seco, o por mililitro de producto Biocontrol, (2005).

BIOLOGÍA.

El género agrupa a 33 especies, el hongo se identifica como una mota de color verde habitante natural del suelo. Visto al microscopio parece

un árbol pequeño, que produce esporas o conidias asexuales, las cuales son similares a semillas, que aseguran la sobrevivencia del hongo en la próxima generación, y lo que da la apariencia de mota son ramificaciones del cuerpo del hongo llamado micelio compuesto por hifas. *Trichoderma* spp., produce en el micelio, unos ensanchamientos, que luego toman forma globosa u ovoide llamadas clamidósporas, las cuales son bastante tolerantes a condiciones ambientales adversas y son consideradas estructuras de sobrevivencia, ya que pueden perdurar a través del tiempo Esposito, E., y Da-Silva, M. (1998); Harman, G. (2001); Papavizas, G. (1985).

2.2.3.- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

Para Rifai, M. (1969), las características generales para todas las cepas o razas de *Trichoderma* spp., son las siguientes:

COLONIA.

Las especies del género *Trichoderma* spp., pueden formar colonias flojas o compactas, pudiendo presentarse numerosas variaciones entre éstos dos extremos; ocasionalmente se presentan estas dos características sobre una misma colonia. La compactación de las colonias se debe posiblemente o está relacionada con la estructura de los conidióforos.

El color de las colonias se debe a la pigmentación de las fialosporas, así como, a la cantidad de esporas producidas; algunos aislamientos pueden producir cristales o secretar pigmentos que decolora el medio, el pH del medio posible influya en la coloración de las colonias de *Trichoderma* spp., puede mostrar una coloración diferente, que varía de amarillo a amarillento o verde claro; además la presencia de elongaciones de las hifas estériles sobre los penachos de los conidióforos de *Trichoderma hamatum*, hacen que las colonias

aparezcan blancuzcas o verde grisáceas. Algunas colonias presentan desprendimiento de olores”, termina indicando el autor arriba anotado.

MICELIO.

El micelio se encuentra constituido por hifas hialinas, septadas de paredes lisas y con abundante ramificación.

CLAMIDÓSPORA.

Las clamidósporas están presentes en muchas especies, las mismas que pueden ir intercaladas, ocasionalmente terminales o sobre una ramificación lateral de una hifa corta, es globosa o elipsoidal, incolora y de pared lisa.

CONIDIÓFORO.

Los conidióforos poseen una estructura compleja, caracterizada por su abundante ramificación, cónicos o piramidales. Sobre las ramificaciones principales de los conidióforos se producen ramificaciones principales laterales cortas, individuales o en grupos de tres, otros se colocan hacia fuera, alejado de las ramificaciones laterales cortas. El ápice de cada rama termina en una fiálide, excepto en *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma polysporum*, en las cuales la ramificación principal de los conidióforos comúnmente termina en una prolongación simple, curvada o recta, con elongaciones de hifas estériles a manera de látigo; por lo general los conidióforos tienen apariencia similar a la forma de las coníferas.

FIALIDES.

Son estructuras que se parecen a un frasco, a una pera, por lo general reducida en su base, con una hinchazón en la parte media, luego atenuado bruscamente cerca del ápice en un cono angosto y con cuello

subcilíndrico. Las fialides se disponen en grupos irregulares de hasta cinco alrededor del extremo de las penúltimas células de las ramificaciones o pueden originarse a lo largo de las mismas, en forma individual, alternadamente o en pares opuestos. Generalmente las fialides terminales son ligeramente más largas que las originales bajo ellas.

ESPORAS.

Las esporas son fialosporas producidas individualmente o sucesivamente acumuladas en el ápice de las fialides, conformando una cabeza de esporas, cuyo diámetro es inferior a 15 micras, rápidamente pueden estar en cadenas cortas; ovoides, elípticas, cilíndricas o casi oblongas, a veces con apariencia angular, ocasionalmente trucada en su base.

2.2.4.- MECANISMOS DE ACCIÓN.

Harman, G. (2001), reporta varios mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* spp., actúa como bio-controlador y como colonizador de las raíces, como son:

- Micoparasitismo.
- Antibiosis.
- Competición por nutrientes y espacio.
- Desactivación de las enzimas de los patógenos.
- Tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radicular.
- Solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos.
- inducción de resistencia

MICOPARASITISMO.

El micoparasitismo es el fenómeno por el cual un hongo coloniza a otro, cubriendo una gran cantidad de eventos en este tipo de interacción.

En el mico parasitismo son varias las enzimas producidas por *T. harzianum* capaces de hidrolizar las paredes celulares de numerosos hongos. Estas enzimas incluyen endoquitinasas, proteasas, exoglucan-b-1,3 glucosidasas, endoglucan-b-1,6 glucosidasas, etc. Lorito, M. (1998). Estas enzimas son inducidas por los diferentes polímeros componentes de la pared de distintas estructuras de los hongos diana u objetivo.

Este proceso puede ser dividido en cuatro sucesos principales:

- a. **CRECIMIENTO QUIMIOTRÓFICO:** Donde exudados del patógeno atraen a *Trichoderma* spp.
- b. **RECONOCIMIENTO:** Algunos aislamientos de *Trichoderma* spp., son específicos a algunos fitopatógenos y es en esta etapa donde el fenómeno de especificidad de ataque se define. Esta etapa es mediada por lecitinas.
- c. **ADHESIÓN:** Una vez *Trichoderma* spp., ha reconocido al patógeno lo envuelve y se adhiere a las hifas cubriéndolo totalmente.
- d. **DEGRADACIÓN:** El paso final es la degradación de la pared celular del hongo fitopatógeno por medio de la producción de enzimas como proteasas y endohidrolasas. Según (Tronsmo y Hhjelijord, 1998; citado por Biocontrol, 2005), en el micoparasitismo es fundamental la producción de enzimas que puedan degradar al patógeno. Diversos estudios se han realizado en enzimas tales como quitinasas, glucanasas, quitobiosidasas, hidrolasas,

proteasas, etc., su actividad sobre la germinación de esporas y todos los estados de vida de los patógenos y se ha encontrado una clara correlación entre la producción de enzimas y la actividad antifúngica.

ANTIBIOSIS.

Esta ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos de un organismo con acción directa sobre otro. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir antibióticos en cultivos puros, lo cual es la más fuerte evidencia de la posible acción de este tipo de compuestos como mecanismo de ataque de *Trichoderma* spp. No obstante para este hongo en particular la producción de metabolitos está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo Tronsmo y Hhjelijord, (1998); citado por Biocontrol, (2005).

COMPETENCIA.

Esta ocurre cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. La competencia entre agentes de control biológico y el fitopatógeno puede resultar en control biológico por aniquilación de la población perjudicial, y puede darse favor de *Trichoderma* sp., debido a su alta frecuencia de crecimiento y desarrollo Tronsmo y Hhjelijord, (1998); citado por Biocontrol, (2005).

INTERACCIÓN DIRECTA CON EL PATÓGENO.

Existen dos tipos de interacciones directas entre los antagonistas y los patógenos. Ellas son el parasitismo y la predación:

- **PARASITISMO.**

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo

parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerotos. Melgarejo, P., *et al.* (1989), y Ulloa, C. (1996).

- **PREDACIÓN.**

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento Campbell, R. (1989).

INDUCCIÓN DE RESISTENCIA.

Para Rifai, M. (1969), las plantas como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra lo que les llevó a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores. De esta forma se acostumbra a postular que la resistencia es la regla mientras que la susceptibilidad es la excepción. Si elegimos una planta cualquiera y comparamos el inmenso número de microorganismos que existe en su entorno sobre la tierra con el limitado número de microorganismos patógenos de ella debemos concluir que esto es así. Las plantas presentan entonces mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente.

Se puede inducir resistencia en productos cosechados mediante el uso de diferentes inductores como bajas dosis de luz ultravioleta, compuestos naturales de las plantas como quitosano (producto de la

deacetilación de la quitina), y también mediante el uso de microorganismos antagonistas. Se ha demostrado que levaduras utilizadas para el biocontrol de patógenos de post-cosecha además de competir por espacio y nutrientes son capaces de inducir resistencia en la planta. Tal es el caso de *Pichia guillermondii* (US-7), la cual ha mostrado ser inductora de la producción de fitoalexinas en frutos cítricos Wilson, C. *et al*, (1994).

2.2.5.- BENEFICIOS DE LA APLICACIÓN DE *Trichoderma* spp.

Biocontrol (2005), manifiesta que los beneficios son:

- *Trichoderma* spp. Ofrece un control eficaz de enfermedades de plantas.
- Posee un amplio rango de acción.
- Este hongo esta propagándose en el suelo, aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos.
- Este hongo ayuda a descomponer materia orgánica, haciendo que los nutrientes se convierten en forma disponible para la planta, por lo tanto tiene un efecto indirecto en la nutrición del cultivo.
- Varios estudios demuestran que *Trichoderma* spp. Estimula el crecimiento de los cultivos porque poseen metabolitos que promueven los procesos de desarrollo en las plantas.
- Puede ser aplicado en compostaje o materia orgánica en descomposición para acelerar el proceso de maduración de estos materiales, los cuales a su vez contendrá el hongo cumpliendo también funciones de biofungicidas.
- Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagónicos.
- No necesita plazo de seguridad para recolección de la cosecha.

- Preservación del medio ambiente al disminuir el uso de fungicidas.
- Ataca patógenos de la raíz (***Pythium***, ***Fusarium***, ***Rhizoctonia***) y del follaje (***Botritis*** y ***Mildiw***) antes que puedan ser los detectados y evita el ataque de (***Phytophthora***).
- Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje.
- Promueve el crecimiento de pelos absorbente y raíces alimenticias.
- Mejora la nutrición y absorción de agua.
- Disminuye o elimina la dependencia de fumigantes químicos.
- No se ha registrado ningún efecto fitotóxico.

2.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOPATOGENOS.

2.3.1.- *Fusarium* sp.

Este hongo afecta y ocasiona pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas, muchas plantas del campo como el algodón y el tabaco, plantaciones tales como el plátano, tomate, llantén, café y caña de azúcar, así como en algunos árboles de sombra. Los marchitamientos causados por ***Fusarium*** se ven favorecidos ampliamente bajo condiciones climáticas favorables. El marchitamiento causado por este hongo se caracteriza por el acaparamiento de las plantas, las cuales en poco tiempo se marchitan y finalmente mueren Agrios, G. (1991).

Monzón A., y Rodríguez J. (S/F), manifiestan cuales son las características de identificación del hongo ***Fusarium*** sp., las mismas que a continuación son descritas:

IDENTIFICACIÓN.

Su marcada variabilidad en cuanto a sus características fisiológicas y morfológicas explica su capacidad para colonizar diversos nichos ecológicos diseminados por todo el mundo, pero también dificulta el establecimiento de unas claves taxonómicas estables y ampliamente aceptadas para el género. Además, muchas especies requieren condiciones específicas para desarrollarse adecuadamente y otras sufren mutaciones rápidamente. Esto explica la cantidad de clasificaciones y especies descritas por los diversos autores. Actualmente, la mayoría de estas clasificaciones se basan en las características macro y microscópicas del cultivo. Se consideran un género anamórfico dentro de los Ascomicetos.

CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS PRIMARIAS DE IDENTIFICACIÓN.

Si se cultivan en condiciones estándar de luz, temperatura y substrato, las características macroscópicas son útiles para la descripción de las especies, pero no para su diferenciación. La morfología y la pigmentación de la colonia y la ausencia o presencia de esporoquias, esclerotia o estroma en diferentes medios son una sustancial ayuda.

En medios habituales las colonias presentan un crecimiento rápido, que suele ocupar toda la placa (8-9 cm de Ø en 1 semana).

El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. Estas coloraciones también pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. La velocidad de crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia son datos importantes para la identificación.

2.3.2.- *Sclerotinia* sp.

Los hongos del género ***Sclerotinia***, que hasta hace poco se les dio el nombre de *Whetzelinia*, en particular ***S. sclerotiorum***, producen enfermedades devastadoras de numerosas plantas suculentas, en particular de hortalizas y plantas florales, así como de algunos arbustos. Otra especie, ***S. homeocarpa***, produce una enfermedad que destruye a los pastos para céspedes. Las enfermedades por ***Sclerotinia*** se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo y afecta a las plantas en cualquiera de las etapas de su desarrollo, incluyendo plántulas, plantas maduras y órganos cosechados durante su transporte y almacenamiento Agrios, G. (1991).

SÍNTOMAS.

Según Agrios, G. (1991), los síntomas primarios más característicos y evidentes de las enfermedades por ***Sclerotinia*** es la aparición, sobre la planta infectada de un micelio veloso y blanco en el que en poco tiempo se desarrollan grandes estructuras compactas de resistencia o esclerocios. Estos esclerocios son blancos al principio, pero más tarde se ennegrecen y endurecen a nivel de su superficie y su diámetro pueden ser de 2 a 10 mm o más, aunque a menudo son más aplanados y largos que esféricos. En las primeras etapas de desarrollo de la lesión en el tallo, el follaje muestra muy pocos signos del ataque por el hongo, de ahí que las plantas infectadas pasen fácilmente inadvertidas, a menos que el hongo se desarrolle totalmente sobre el tallo y lo pudra. Debido a esto el follaje localizado arriba de la lesión se marchita y muere más o menos con gran rapidez.

2.3.3.- *Rhizopus* sp.

La enfermedad causada por este hongo se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y aparece en órganos carnosos de

hortalizas, en plantas florales y en frutos que han sido cosechados y es importante solo durante el almacenamiento, transporte y venta en el mercado de estos productos. Entre las plantas de cultivo que son atacadas con mayor frecuencia por esta enfermedad se encuentran las fresas, camotes, todas las cucurbitáceas, los duraznos, cerezas, cacahuates y varios otros frutos y hortalizas. El hongo afecta al maíz y otros cereales bajo condiciones altas de humedad. Cuando las condiciones son favorables, la enfermedad avanza con gran rapidez en los recipientes, de ahí que las pérdidas sean considerables en tan solo un corto periodo de tiempo. Agrios, G. (1991).

SÍNTOMAS.

Al principio, las zonas infectadas de los órganos carnosos aparecen como si estuvieran embebidas en agua y son muy blandas. Aun cuando la cáscara de los tejidos que han sido infectados se mantenga intacta, el órgano carnoso ablandado pierde humedad gradualmente hasta que se arruga y momifica. Sin embargo, es más frecuente que la cáscara ablandada se rompa durante su manipulación o cuando se le aplica cierta presión, como ocurre cuando se amontonan los frutos; esto hace que de ellos salga un líquido amarillo blanquizco. En poco tiempo, las hifas del hongo crecen hacia fuera a través de las heridas del fruto y cubren las zonas afectadas al producir grupos de esporangiosforos filamentosos de color gris que portan esporangios negros en sus puntas. El hongo se extiende hasta la superficie de las porciones sanas de los frutos afectados cuando se humedecen son exudados líquidos e incluso hasta la superficie de los recipientes donde se almacenan los frutos. Agrios, G. (1991).

2.4.- MÉTODO PARA REALIZAR EL ANTAGONISMO.

Para Biocontrol (2005), se prepara una suspensión con 1 gramo (g) del preparado biológico en 10 mililitros (mL) de agua destilada estéril, la

cual se deja 1 hora. Transcurrido este tiempo se realizan diluciones hasta 10^{-4} conidias/ml. En cajas de Petri con Agar-Papa-Dextrosa con los antibióticos Rosa de Bengala 17 partes por millón (ppm) y sulfato de estreptomina 30 ppm, se siembra 1 ml de la suspensión usando una espátula. Se preparan tres cajas por muestra estas se incuban por 72 h a 25 ± 2 °C. Transcurrido este tiempo se examina el crecimiento de *Trichoderma*, contando el total de colonias por caja petri. Se siembra una porción del micelio y conidias en una caja con Agar agua.

Se deja crecer durante 58 horas y posteriormente se obtienen discos de 0,5 cm. En cajas de Petri conteniendo Agar-Papa-Dextrosa se siembra un disco de *Trichoderma* spp., en un extremo y en el otro extremo de la caja un disco similar con el crecimiento del patógeno. Se hacen 3 repeticiones. Posteriormente, se mide el crecimiento lineal de cada colonia con una regla al enfrentarse una con otra (entre 4-6 días), valorando la actividad competitiva por el sustrato.

El valor promedio del crecimiento lineal de *Trichoderma* spp., esta entre 5-6 cm. en comparación con la cepa probada. Podrá observarse hiperparasitismo y en muchos casos incremento de la esporulación cuando crece sobre la colonia del patógeno.

2.5.- METODO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS.

Este método puede ser usado para el aislamiento de cualquiera de los fitopatógenos en estudio.

Herrera, L. y Mayea, S.,(1994), Lograr el aislamiento del agente causal de una determinada sintomatología o enfermedad, permite, en primer lugar, establecer la causa que origina dichos trastornos, es decir permite llegar a diagnosticar la naturaleza del agente causal. No obstante, es muy común cuando se utilizan técnicas o métodos para el aislamiento del agente causal, que más de un microorganismo sea obtenido, por lo

que irreversiblemente se debe complementar una serie de postulados establecidos por el bacteriólogo alemán Roberto Koch y que son conocidos hoy en día como los postulados de Koch, cuyos pasos son los siguientes:

- El organismo debe estar constantemente asociado con los síntomas observados.
- Debe ser aislado y purificado, y encontrarse libre de otros organismos.
- Al inocularlo sobre una planta hospedante susceptible debe reproducir los mismos síntomas observados.
- El organismo debe ser reaislado de la planta hospedante inoculada y en cultivo puro debe mostrar las mismas características que el cultivo original.

Para el aislamiento de hongos productores de micelio aéreo esporógeno resulta exitoso simplemente transfiriendo directamente el micelio o masas de esporas formadas sobre el tejido de la planta, sobre un medio determinado (PDA). Cuando el crecimiento de micelio o la formación de esporas no es apreciable sobre el tejido de la planta hospedante se emplea la técnica conocida como cámara húmeda, que consiste en tomar porciones o pedazos de dicho tejido, lavarlo débilmente a chorro continuo de agua corriente durante 10 ó 15 minutos para remover de la superficie las esporas de otros hongos saprofitos y colocarlos luego sobre papel filtro humedecido dentro de placas de petri e incubar durante varias horas a temperatura entre 26 y 30 °C. En caso de que determinados microorganismos saprofitos crezcan a mayor velocidad y cubran la superficie del tejido, enmascarando el verdadero agente causal, debe procederse a la desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 1 %, antes de colocar en cámara húmeda los pedazos de tejido enfermo. Herrera, L. y Mayea, S. (1994).

El autor antes mencionado nos dice que para el aislamiento de hongos presentes en el interior de las plantas (haces vasculares, frutos, tuberculos) debe proceder a la desinfección externa con el producto antes descrito, cortar el tejido con un bisturí o escarpelo estéril y extraer porciones afectadas de la parte interna y colocarlas o sembrarlas en un medio apropiado que favorezca el crecimiento de las estructuras vegetativas o reproductoras. El ajuste del pH en los medios empleados para el aislamiento debe garantizar valores bajos (alrededor de 5,5) que impidan el crecimiento de bacterias.

2.6.- MEDIOS DE CULTIVOS USADOS EN EL AISLAMIENTO DE HONGOS.

Monzón A., y Rodríguez J. (S/F), manifiesta que los medios de cultivo utilizados habitualmente y que se encuentran en el mercado son:

- Agar extracto de malta (AEM). Se pueden valorar aspectos morfológicos microscópicos y macroscópicos, se consigue una buena esporulación.
- Agar patata dextrosa (PDA). Es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia. Su alto contenido de carbohidratos condiciona un mayor crecimiento, en detrimento de la esporulación que suele retrasarse hasta un mes, las colonias pueden ser atípicas.

Otros medios de cultivo como agar harina de avena (OA), agar clavel (CLA), agar arena, agar nutriente sintético (SNA), medio de komada, etc., se suelen utilizar en laboratorios especializados. La temperatura habitual de incubación de hongos es entre 25 y 28 °C.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1.- UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

El presente trabajo de investigación se lo realizó en las instalaciones (Campus, Laboratorio de Microbiología) de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, ubicada en Calceta, cabecera cantonal del cantón Bolívar, de la provincia de Manabí, situada geográficamente entre las coordenadas 0°49'27,9" Latitud Sur; 80°10'47,2" Longitud Oeste y una altitud de 48 msnm^{/1}.

3.2.- PROCEDIMIENTO.

Esta investigación se la realizó en dos fases:

- Fase de campo.
- Fase de laboratorio.

3.2.1.- FASE DE CAMPO.

En esta primera fase se obtuvieron las muestras de suelo de tres diferentes áreas de producción de la ESPAM “MFL” y de donde salieron los códigos de cada organismo de *Trichoderma* aislados los mismos que son:

- Área de producción convencional Cepa 1 TACv1, Cepa 2 TACv2.
- Área de cultivo de cacao Cepa 1 TAC1, Cepa 2 TAC2, Cepa 3 TAC3 y Cepa 4 TAC4
- Área de producción Ecológica Cepa 1 TAE1 y Cepa 2 TAC2.

^{/1}. www.ElDiario.Com.Ec/variados/especiales/cantones/Bolivar.Asp-85k-3 de agosto 2004.

TOMA DE MUESTRA DE SUELO.

- Las muestras de suelo para esta investigación se colectaron en diferentes lotes de producción agrícola de la ESPAM “MFL”: área de cultivo de cacao, área de producción ecológica y área de producción convencional.
- El muestreo se realizó por el método de bandera inglesa y se tomaron las muestras abriendo un hoyo de 20 cm. de profundidad.
- Las muestras de suelo se las envasó en fundas plásticas y se trasladaron al laboratorio.

3.2.2.- FASE DE LABORATORIO.

En la realización de este trabajo se procuró la máxima asepsia en especial en la preparación de los medios de cultivo que se utilizaron en el estudio, esterilizándolos en autoclave a 15 lb./pulg.² de presión durante 15 minutos como lo indica la técnica.

El traslado y manipuleo de las muestras de suelo al laboratorio se las realizó con el mayor cuidado y asepsia.

El laboratorio se desinfectó, al igual que el área de aislamiento y las incubadoras antes y después de cada procesamiento de muestras, aislamientos, experimentos y bioensayos efectuados con una mezcla de 5 gramos de permanganato de potasio y 10 mililitros de formol comercial lo que produce un gas que esteriliza y elimina cualquier microorganismo contaminante, los materiales se esterilizaron en estufa de aire seco a 121 °C durante 1 hora y los materiales de metal como equipos de disección se esterilizaron en autoclave a 15 lb./pulg.² de presión

durante 20 minutos para brindarle al estudio la garantía de asepsia requerida.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

PAPA DEXTROSA AGAR (PDA).

- Tubérculos de papa (peladas) ----- 200 g
- Dextrosa ----- 20 g
- Agar-agar ----- 15 g
- Agua destilada y estéril ----- 1 L

PROCEDIMIENTO:

Se cocinó la papa pelada en 1 litro de agua destilada y estéril, se coló este preparado en un trozo de gasa y se enraso en un matraz de Erlenmeyer de 1000 mL, se agrego el agar-agar y la dextrosa, realizando la mezcla para que quede uniforme en el agitador magnético y plancha de calefacción hasta que quede uniforme, se observa que no hayan grumulos y cuando se presencie espuma esta listo y se lo retira, se mide el pH el que debe estar en un rango de 5,5 a 6.2. Si no esta en este rango se lo regula con una solución de ácido clorhídrico al 1 % si es alcalino y si es acido con una solución de hidróxido de sodio al 40 %, por ultimo se auto clava durante 15 minutos a 121°C o 15 libras de presión.

AGAR EXTRACTO DE MALTA (AEM).

- Extracto de malta ----- 50 g.
- Agar-agar----- 15 g.
- Agua destilada ----- 1 L.

PROCEDIMIENTO:

En un matraz de Erlenmeyer con 500 mL, de agua destilada se incorporaron los ingredientes como se describe a continuación, pesar el extracto de malta, el agar-agar he introducirlo en el matraz con los 500 mL. de agua destilada, mezclarlo en el agitador magnético y plancha de calefacción hasta que este uniforme, observar que no hayan grúmulos, en el momento que haya presencia de espuma esta listo y se lo retira, medir el pH el que debe estar entre 5.5 a 6.2, si el pH no esta en esos rangos se lo regula con una solución de ácido clorhídrico al 1 % si es alcalino y si es ácido con una solución de hidróxido de sodio al 40%, pero no fue necesario ya que el medio de cultivo tenía un pH 5.6, luego auto clavar durante 15 minutos a 121⁰C o 15 libras de presión.

LLENADO DEL MEDIO DE CULTIVO EN SUS RESPECTIVOS RECIPIENTES.

- La cantidad apropiada para cajas petri es de 10 mL. de medio de cultivo.
- La cantidad de cajas petri van de acuerdo a las que necesitaras del trabajo a realizar y a los tratamientos de cada bioensayo. En este trabajo se utilizaron 48 cajas petri en el bioensayo 1 y 36 cajas petri para el bioensayo 2.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUELO.

- Las muestras se homogenizaron triturándolas en un mortero y tamizándolas en un tamiz con (malla de 1 mm) con el objetivo de eliminar restos vegetales y demás elementos.
- Pesar 10 gramos de suelo.

- Preparar las diluciones mezclando los 10 gramos de suelo en 100 mL. de agua destilada y estéril, obteniendo la solución madre.
- De esta solución madre preparar 3 diluciones más, a diferentes concentraciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} lo que es conocido en microbiología con el término flora total.
- Posteriormente de cada solución realizar tres siembras, tomando 2 mL. de solución de cada una de las muestras y vertiéndolas sobre el medio a utilizar (PDA).
- Pasar a incubadoras a una temperatura de 27 grados centígrados.
- Revisar su crecimiento a los 3, 4, 5 y 7 días.
- En la siembra se contabilizan las colonias puntuales de *Trichoderma* spp. por cada caja petri. Esta operación se la realiza de acuerdo a su característica en cuanto al color verde intenso de sus colonias provocadas por la esporulación y por la forma de botella que tienen las fialides, las mismas que se pueden observar al microscopio realizando diluciones 1:10 relación peso/volumen, y mediante preparaciones de placas fijas.

PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* spp.

Conforme aparecían las colonias en las cajas petri con el medio de cultivo de los distintos microorganismos, entre el quinto y séptimo día, se llevaron al microscopio para observar la forma de las estructuras de las mismas y las que fueron de *Trichoderma* con estas se efectuaron repiques sucesivos para purificarlas, luego que estaban completamente puras. Las cepas se codificaron usando como clave la letra del área muestreada y el número del orden en que eran aisladas. Las colonias

puras se las mantienen en tubos de ensayo con PDA inclinados para conservación de las mismas a 15 °C y en cajas petri para ser utilizadas en los ensayos.

3.3.- BIOENSAYO 1: EVALUACION DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO *in vitro* DE CEPAS DE *Trichoderma* spp., EN DOS MEDIOS DE CULTIVO. ESPAM”MFL”.

3.3.1.-FACTORES EN ESTUDIO.

FACTORES	NIVELES
<p>A.CEPAS DEL GENERO <i>Trichoderma.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • TACv1= <i>Trichoderma</i> spp. área de agricultura convencional # 1. • TACv2= <i>Trichoderma</i> spp. área de agricultura convencional # 2. • TAC1= <i>Trichoderma</i> spp. área del cacao # 1. • TAC2= <i>Trichoderma</i> spp. área del cacao # 2. • TAC3= <i>Trichoderma</i> spp. área del cacao # 3. • TAC4= <i>Trichoderma</i> spp. área del cacao # 4. • TAE1= <i>Trichoderma</i> spp. área de agricultura ecológica # 1. • TAE2= <i>Trichoderma</i> spp. área de agricultura ecológica # 2.
<p>B. MEDIOS DE CULTIVO.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Papa dextrosa agar • Agar extracto de malta

3.3.2.-DETALLE DE LOS TRATAMIENTOS.

Cuadro 03. 02.- Detalle de los tratamientos para la evaluación de la velocidad de crecimiento de los organismos del genero *Trichoderma* spp., ESPAM”MFL”. Ver anexos N^o 2.

No	Códigos	Descripción	
		Clave de cepas	Medios de cultivo
1	T1	TACv1	PDA
2	T2	TACv1	AEM
3	T3	TACv2	PDA
4	T4	TACv2	AEM
5	T5	TAC1	PDA
6	T6	TAC1	AEM
7	T7	TAC2	PDA
8	T8	TAC2	AEM
9	T9	TAC3	PDA
10	T10	TAC3	AEM
11	T11	TAC4	PDA
12	T12	TAC4	AEM
13	T13	TAE1	PDA
14	T14	TAE1	AEM
15	T15	TAE2	PDA
16	T16	TAE2	AEM

3.3.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se empleo el Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con tres replicas. Con arreglo factorial A x B.

3.3.4.- UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental la constituye la caja petri con la cepa correspondiente de acuerdo al tratamiento.

3.3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos se utilizó el programa estadístico, paquete de diseños experimentales FAUANL de la Universidad de Nuevo León. México.

Para determinar si había diferencia significativa entre los tratamientos se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey al ($p < 0,05$).

3.3.6.- MANEJO DEL EXPERIMENTO.

- Se tomaron discos de 7 mm de diámetro con un sacabocado de las 8 cepas del género *Trichoderma* spp., aislados de las diferentes áreas de producción de la ESPAM "MFL", las que fueron sembradas como lo indican los tratamientos.
- Se incubaron los tratamientos en la estufa a 27⁰C durante 2 días.

3.3.7.- DATOS TOMADOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN.

CRECIMIENTO EN milímetro/día.- Con una regla estandarizada en milímetros se midió el diámetro de crecimiento de las colonias de *Trichoderma* spp., en sus respectivos tratamientos, cada 24 horas durante 2 días a partir de la siembra.

MORFOLOGÍA.- Al quinto día se observaron las cajas petri al microscopio con el objetivo de 40 X, para determinar algunas de las características de las cepas de *Trichoderma* spp., y los medios de cultivo en estudio en el bioensayo 1 como: forma del micelio, color del micelio, tipo de micelio, esporulación, color que adquiere el medio de cultivo y el olor que emite cada una de las cepas en estudio.

3.4.- BIOENSAYO 2: ANTAGÓNISMO DE *Trichoderma* spp., FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., Y *Rhizopus* spp.

Para poder realizar este bioensayo previamente se evaluó la velocidad de crecimiento de las 8 cepas de *Trichoderma* aisladas de las áreas de producción de la ESPAM”MFL”, en el bioensayo 1, mismas que se les realizó un análisis estadístico, y entre las mas promisorias fueron las cepas: TAC1, TAE1 y TAC2, mismas que se utilizaron para medir su antagonismo frente a tres fitopatógenos como se muestra en el siguiente cuadro del bioensayo 2. Ver anexos N^o 4.

3.4.1.- FACTORES EN ESTUDIO.

FACTORES	NIVELES
<ul style="list-style-type: none">• Cepas promisorias del genero <i>Trichoderma</i>.	<ul style="list-style-type: none">• TAC1• TAE1• TAC2
<ul style="list-style-type: none">• Fitopatógenos.	<ul style="list-style-type: none">• <i>Fusarium</i> spp.• <i>Sclerotinia</i> spp.• <i>Rhizopus</i> spp.

3.4.2.- DETALLE DEL TRATAMIENTO.

Cuadro 03. 03.- Tratamientos del Bioensayo 2., en los que se midió la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp., frente a *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp. Ver anexos N^o 5.

No.	Códigos	Descripción	
		Clave de cepas	Fitopatógenos
1	T1	TAC1	<i>Fusarium</i> spp.
2	T2	TAC1	<i>Sclerotinia</i> spp.
3	T3	TAC1	<i>Rhizopus</i> spp.
4	T4	TAE1	<i>Fusarium</i> spp.
5	T5	TAE1	<i>Sclerotinia</i> spp.
6	T6	TAE1	<i>Rhizopus</i> spp.
7	T7	TAC2	<i>Fusarium</i> spp.
8	T8	TAC2	<i>Sclerotinia</i> spp.
9	T9	TAC2	<i>Rhizopus</i> spp.

3.4.3.- MANEJO DEL EXPERIMENTO.

- Se tomaron discos de 7 mm de diámetro con un sacabocado de las 3 cepas del genero *Trichoderma* seleccionadas del bioensayo 1 y de los tres fitopatógenos en estudio, y fueron sembradas de forma simultanea como lo indican los tratamientos.
- Luego se procedió a incubar los tratamientos en la estufa a 27⁰C durante 5 días.

3.4.4.- DATOS TOMADOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN.

ANTAGONISMO.- Con una regla estandarizada en (mm) se midió el diámetro de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp., y cada uno de los fitopatógenos en su respectivo tratamiento cada 24 horas durante 5 días a partir de siembra. Para determinar la diferencia entre

tratamiento se utilizo el programa Excel 2003, expresado en un histograma de barras.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

4.1.- BIOENSAYO 1.

4.1.1.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO *in vitro* DE CEPAS DE *Trichoderma* spp., EN DOS MEDIOS DE CULTIVO.

En el cuadro 04.01., se presenta los promedios de las 8 cepas evaluadas, donde el primer día presenta dos rangos de igualdad estadística, sobresaliendo como la mejor la cepa 1, *Trichoderma* spp., del cultivo de cacao 1 (TAC1) con un promedio de crecimiento de 18.3 mm., siendo estadísticamente igual a la cepa 1, *Trichoderma* spp., del área ecológica 1 (TAE1) la cepa que obtuvo el menor promedio en este análisis fue la cepa 2 *Trichoderma* spp., del área ecológica 2 (TAE2), con 2.2 mm., de crecimiento.

El segundo día presentó cinco rangos de igualdad estadística, sobresaliendo como la mejor, la cepa 1, *Trichoderma* spp., del cultivo de cacao 1 (TAC1) con 46.2 mm., de crecimiento, siendo estadísticamente igual a la cepa 1, *Trichoderma* spp., del área ecológica 1 (TAE1), la cepa que obtuvo el menor promedio en este análisis fue la cepa 2 *Trichoderma* spp., del área convencional 2 (TACv2) con 2.7 mm., de crecimiento.

Cuadro 04.01.- Promedios de la variable crecimiento de las 8 cepas de *Trichoderma* spp., en el trabajo de investigación “Evaluación del crecimiento “in vitro” de *Trichoderma* spp., en dos medios de cultivo y su antagonismo frente a los hongos fitopatógenos, *Fusarium* spp.

Sclerotinia spp., y *Rizopus* spp.

Número	Cepas	DÍAS EVALUADOS	
		**	**
		1	2
1	TACv1	2.7 b	17.3 cd
2	TACv2	3.0 b	2.7 e
3	TAC1	18.3 a	46.2 a
4	TAC2	11.3 ab	40.5 a
5	TAC3	3.7 b	15.4 d
6	TAC4	14.7 a	30.4 b
7	TAE1	18.0 a	45.7 a
8	TAE2	2.2 b	24.0 bc
Tukey =		10.5	7.75
C.V.=		60.76%	15.02%

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 0.05% de probabilidad.

**

Diferencias estadísticas altamente significativas.

En el cuadro 04.02., se presenta los promedios de crecimiento de las ocho cepas en cada uno de los medios de cultivo los mismos que presentan en el primer día dos rangos de igualdad estadística, sobresaliendo como el mejor, el medio de cultivo PDA (Papa dextrosa agar) con un promedio de 11 mm., y el medio que obtuvo el menor promedio fue AEM (Agar extracto de malta) con 7.5 mm.

El segundo día presentó dos rangos de igualdad estadística, sobresaliendo como el mejor, el medio de cultivo PDA (Papa dextrosa agar) con un promedio de 29.7 mm., y el medio que obtuvo el menor promedio fue AEM (Agar extracto de malta) con 29.9 mm.

Cuadro 04.02.- Promedios de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp., en dos medios de cultivo en la investigación “Evaluación del crecimiento “in vitro” de *Trichoderma* spp., en dos medios de cultivo y su antagonismo frente a los hongos fitopatógenos, *Fusarium* spp. *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp.

Medio de cultivo	DÍAS EVALUADOS	
	*	**
	1	2
PDA	11.0 a	29.7 a
AEM	7.5 b	25.9 b
MDS=	3.3	2.94
C.V=	60.76%	15.02%

Promedios con diferentes letras difieren estadísticamente MDS al 0.05% de probabilidad.

* Diferencias estadísticas significativas.

** Diferencias estadísticas altamente significativas.

En el cuadro 04.03, se observan los promedios de los 16 tratamientos evaluados, donde el primer día presenta dos rangos de igualdad estadística, sobresaliendo como el mejor, el tratamiento 13 (TAE1+ PDA) con 23 mm de crecimiento, siendo estadísticamente igual al tratamiento 5 (TAC1+PDA), el tratamiento que obtuvo el menor promedio en esta variable fue el 16 (TAE2+AEM), con 2 mm de crecimiento.

El segundo día presentó siete rangos de igualdad estadística, sobresaliendo como el mejor, el tratamiento 13 (TAE1+ PDA) con 55.7 mm., de crecimiento, siendo estadísticamente diferente al tratamiento 7 (TAC2+PDA), el tratamiento que obtuvo el menor promedio en esta variable fue el 4 (TACv2+AEM), con 2.3 mm., de crecimiento.

Cuadro 04.03. Promedios de la variable crecimiento en mm., de cada uno de los tratamientos, relación cepas de *Trichoderma* spp., y medios de cultivos en el trabajo de investigación “Evaluación del crecimiento *in vitro*” de *Trichoderma* spp., en dos medios de cultivo y su antagonismo frente a los hongos fitopatógenos, *Fusarium* spp. *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp.

Tratamientos	CODIGO	DÍAS EVALUADOS	
		**	**
		1	2
1	TACv1+PDA	2.7 b	16.3 e
2	TACv1+AEM	2.7 b	18.3 de
3	TACv2+PDA	2.3 b	3.0 g
4	TACv2+AEM	3.7 b	2.3 g
5	TAC1+PDA	22.3 a	46.0 ab
6	TAC1+AEM	14.3 ab	46.3 ab
7	TAC2+PDA	13.7 ab	51.7 a
8	TAC2+AEM	9.0 ab	29.3 cd
9	TAC3+PDA	3.7 b	3.5 fg
10	TAC3+AEM	3.7 b	27.3 cde
11	TAC4+PDA	17.7 ab	45.0 ab
12	TAC4+AEM	11.7 ab	15.7 ef
13	TAE1+PDA	23.0 a	55.7 a
14	TAE1+AEM	13.0 ab	35.7 bc
15	TAE2+PDA	2.3 b	16.0 ef
16	TAE2+AEM	2.0 b	32.0 c
Tukey =		15.84	12.57
C.V.=		60.76%	15.02%

Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente según Tukey al 0.05% de probabilidad.

** Diferencias estadísticas altamente significativas.

4.1.2.- ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS DE *Trichoderma* spp. Y DEL MEDIO DE CULTIVO (PDA).

Cuadro 04.04.- Características de las cepas aisladas de *Trichoderma* spp., y del medio de cultivo.

Cepas	Forma micelio	Color del micelio	Tipo de micelio	Esporas	Color del medio	Olor
TACv1	Retorcido	Blanco	Aéreo	Verde	Cre moso	Ninguno
TACv2	Retorcido	Blanco	Plano	Verde	Cre moso	Ninguno
TAC1	Retorcido	Blanco	Aéreo	Verde	Cre moso	Aroma a Coco
TAC2	Retorcido	Blanco	Plano y aéreo	Verde	Cre moso	Ninguno
TAC3	Retorcido	Blanco Hialino	Plano y aéreo	Verde	Anaranjado	Ninguno
TAC4	Retorcido	Blanco	Plano y aéreo	Verde	Anaranjado	Ninguno
TAE1	Retorcido	Crema	Aéreo	Verde	Cre moso	Aroma a Coco
TAE2	Retorcido	Hialino	Plano	No	Cre moso	Aroma a Coco

Fuente.- Piero Cristóbal Fajardo Navarrete. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. “Manuel Félix López”. ESPAM “MFL”. Laboratorio de Microbiología. 2006.

4.2.- BIOENSAYO 2.

4.2.1 ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. (Cepa TAC1) FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Rhizopus* spp.

En las figura 04.01, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp., del área del cacao 1 (TAC1) frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp., el primer día evaluado la cepa TAC1 tuvo un crecimiento de 14 mm., y *Fusarium* spp., creció 10 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAC1 tuvo un crecimiento de 37 mm., y *Fusarium* spp., creció 16 mm., en el tercer día la cepa TAC1 creció 62.3 mm. y *Fusarium* spp., creció 18 mm., en el cuarto día la cepa TAC1 creció 86.3 mm. y *Fusarium* spp., redujo su crecimiento a 6.7 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAC1 creció 93 mm., mientras que *Fusarium* spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

En la figura 04.02, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área del cacao 1 (TAC1) frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia* spp., el primer día evaluado la cepa TAC1 tuvo un crecimiento de 15.3 mm., y *Sclerotinia* spp., creció 11.5 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAC1 tuvo un crecimiento de 38.5 mm., y *Sclerotinia* spp., creció 19.8 mm., en el tercer día la cepa TAC1 creció 71.8 mm. y *Sclerotinia* spp., creció 31 mm., en el cuarto día la cepa TAC1 creció 88.3 mm. y *Sclerotinia* spp., redujo su crecimiento a 4.7 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAC1 creció 93 mm., mientras que *Sclerotinia* spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

En la figura 04.03, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área del cacao 1 (TAC1) frente al hongo fitopatógeno *Rhizopus* spp., el primer día evaluado la cepa TAC1 tuvo un crecimiento de 16.3 mm., y

Rhizopus spp., creció 9 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAC1 tuvo un crecimiento de 41.3 mm., y *Rhizopus* spp., creció 13.3 mm., en el tercer día la cepa TAC1 creció 70 mm. y *Rhizopus* spp., creció 15 mm., en el cuarto día la cepa TAC1 creció 91 mm. y *Rhizopus* spp., redujo su crecimiento a 2 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAC1 creció 93 mm., mientras que *Rhizopus* spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

Figura 04.01.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. (TAC1) frente a *Fusarium* spp. Tratamiento 1 (T1).

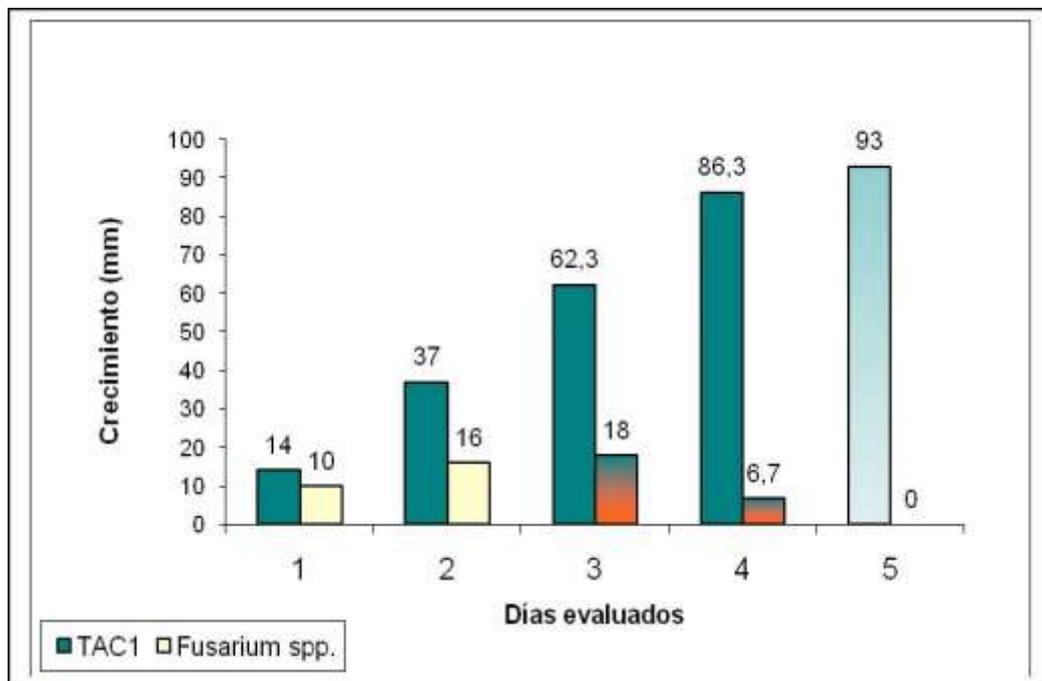


Figura 04.02.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. (TAC1) frente a *Sclerotinia* spp., Tratamiento 2 (T2).

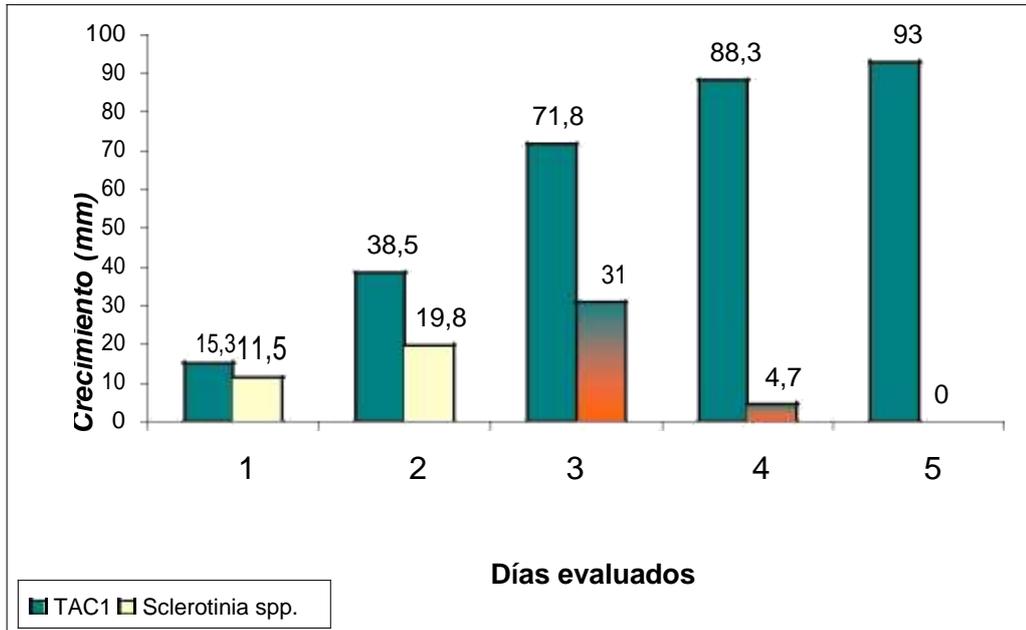
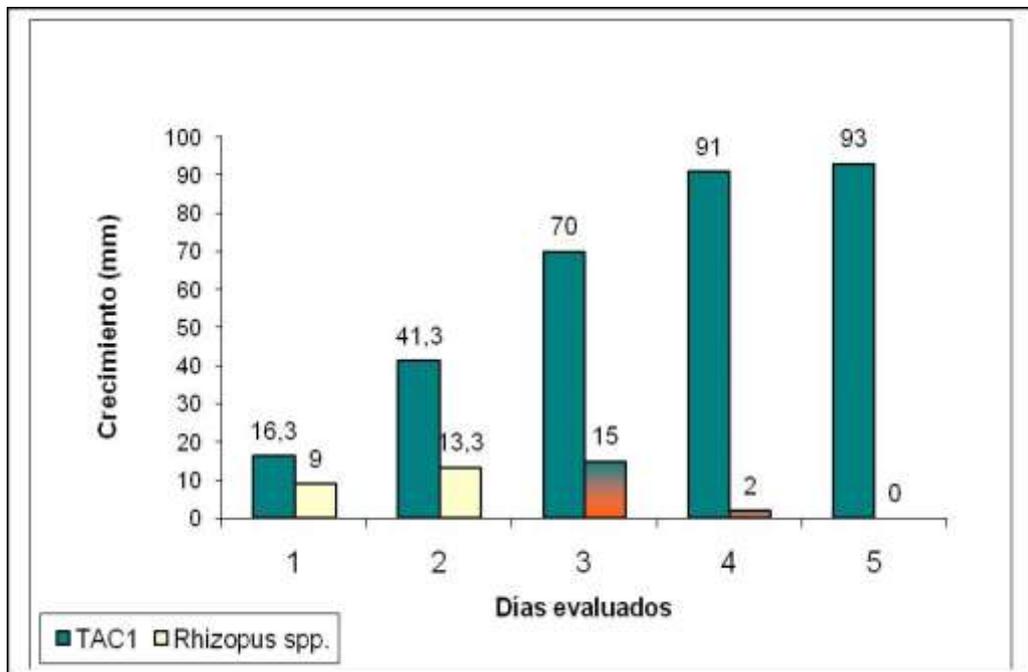


Figura 04.03.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. (TAC1) frente a *Rhizopus* spp., Tratamiento 3 (T3).



4.2.2.- ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. (Cepa TAE1) FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp.

En las figura 04.04, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área Ecológica 1 (TAE1) frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp., el primer día evaluado la cepa TAE1 tuvo un crecimiento de 13.5 mm., y *Fusarium* spp., creció 9.5 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAE1 tuvo un crecimiento de 31.5 mm., y *Fusarium* spp., creció 15 mm., en el tercer día la cepa TAE1 creció 51.3 mm. y *Fusarium* spp., creció 20 mm., en el cuarto día la cepa TAE1 creció 82.9 mm. y *Fusarium* spp., redujo su crecimiento a 10.1 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAE1 creció 93 mm., mientras que *Fusarium* spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

En la figura 04.05, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área Ecológica 1 (TAE1) frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia* spp., el primer día evaluado la cepa TAE1 tuvo un crecimiento de 14.5 mm., y *Sclerotinia* spp., creció 10.8 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAE1 tuvo un crecimiento de 36.3 mm., y *Sclerotinia* spp., creció 18.5 mm., en el tercer día la cepa TAE1 creció 62.5 mm. y *Sclerotinia* spp., creció 30.5 mm., en el cuarto día la cepa TAE1 creció 85 mm. y *Sclerotinia* spp., redujo su crecimiento a 8 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAE1 creció 93 mm., mientras que *Sclerotinia* spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

En la figura 04.06, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área Ecológica 1 (TAE1) frente al hongo fitopatógeno *Rhizopus* spp., el primer día evaluado la cepa TAE1 tuvo un crecimiento de 14.3 mm., y *Rhizopus* spp., creció 9 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAE1 tuvo un crecimiento de 33.8 mm., y *Rhizopus* spp., creció 13.8 mm., en el tercer día la cepa TAE1 creció 59.5 mm. y *Rhizopus* spp., creció 17

mm., en el cuarto día la cepa TAE1 creció 85 mm. y *Rhizopus* spp., redujo su crecimiento a 12 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAE1 creció 93 mm., mientras que *Rhizopus* spp., disminuyó a 0 mm., su crecimiento.

Figura 04.04.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. TAE1 frente a *Fusarium* spp., Tratamiento 4 (T4).

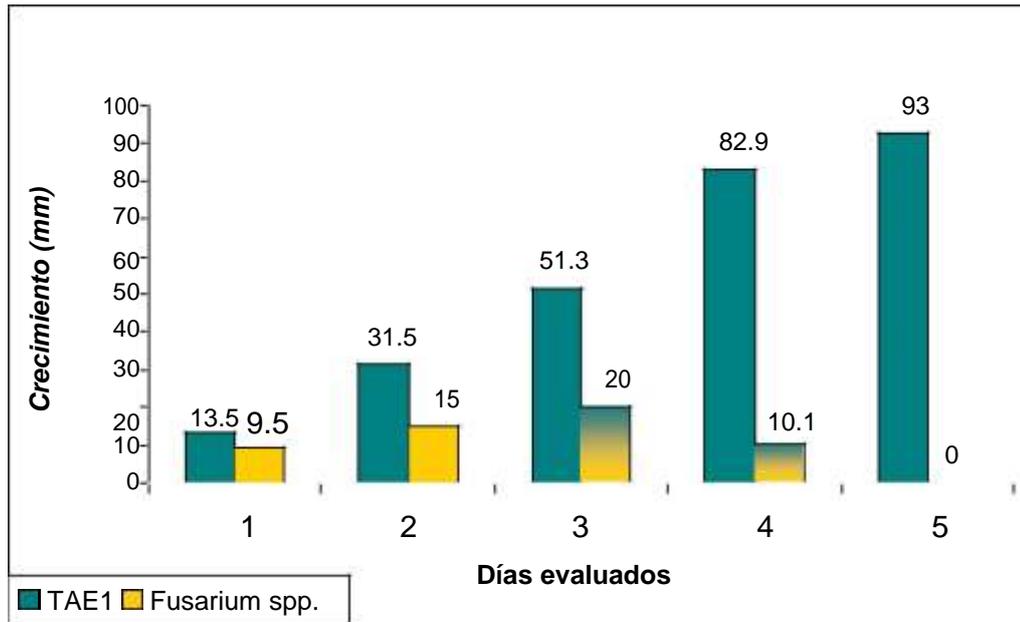


Figura 04.05.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. TAE1 frente a *Sclerotinia* spp., Tratamiento 5 (T5).

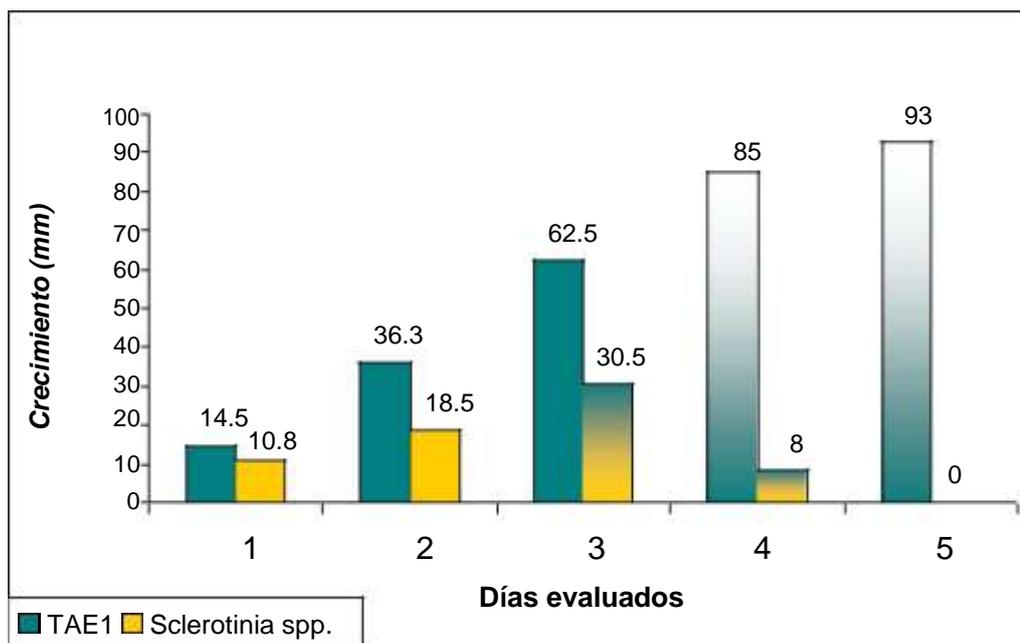
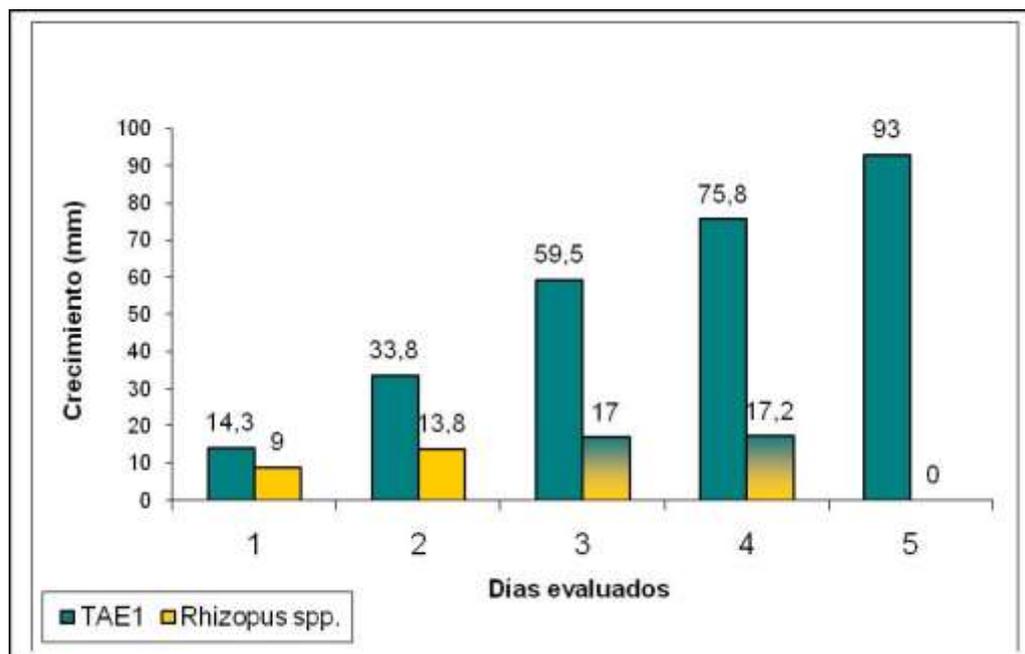


Figura 04.06. - Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. TAE1 frente a *Rhizopus* spp., Tratamiento 6 (T6).



4.2.3.- ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. (Cepa TAC2) FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., y *Rhizopus* spp.

En las figura 04.07, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área del Cacao 2 (TAC2) frente al hongo fitopatógeno *Fusarium* spp., el primer día evaluado la cepa TAC2 tuvo un crecimiento de 12 mm., y *Fusarium* spp., creció 10 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAC2 tuvo un crecimiento de 36.8 mm., y *Fusarium* spp., creció 19 mm., en el tercer día la cepa TAC2 creció 68.3 mm. y *Fusarium* spp., creció 27.8 mm., en el cuarto día la cepa TAC2 creció 80.8 mm. y *Fusarium* spp., redujo su crecimiento a 12.2 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAC2 creció 93 mm., mientras que *Fusarium* spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

En la figura 04.08, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa *Trichoderma* spp. del área del Cacao 2 (TAC2) frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia* spp., el primer día evaluado la cepa TAC2 tuvo un crecimiento de 9.3 mm., y

Sclerotinia spp., creció 10 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAC2 tuvo un crecimiento de 36.5 mm., y **Sclerotinia** spp., creció 26 mm., en el tercer día la cepa TAC2 creció 66.8 mm. y **Sclerotinia** spp., creció 26.2 mm., en el cuarto día la cepa TAC2 creció 87 mm. y **Sclerotinia** spp., redujo su crecimiento a 6 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAC2 creció 93 mm., mientras que **Sclerotinia** spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

En la figura 04.09, se presenta por medio de un histograma de barras, la confrontación antagónica de la cepa **Trichoderma** spp. del área del Cacao 2 (TAC2) frente al hongo fitopatógeno **Rhizopus** spp., el primer día evaluado la cepa TAC2 tuvo un crecimiento de 9 mm., y **Rhizopus** spp., creció 8 mm., en el segundo día evaluado la cepa TAC2 tuvo un crecimiento de 38 mm., y **Rhizopus** spp., creció 13.3 mm., en el tercer día la cepa TAC2 creció 61.3 mm. y **Rhizopus** spp., creció 16 mm., en el cuarto día la cepa TAC2 creció 86.5 mm. y **Rhizopus** spp., redujo su crecimiento a 6.5 mm., y en el quinto día de evaluación la cepa TAC2 creció 93 mm., mientras que **Rhizopus** spp., disminuyo a 0 mm., su crecimiento.

Figura 04.07.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. TAC2 frente a *Fusarium* spp., Tratamiento 7 (T7).

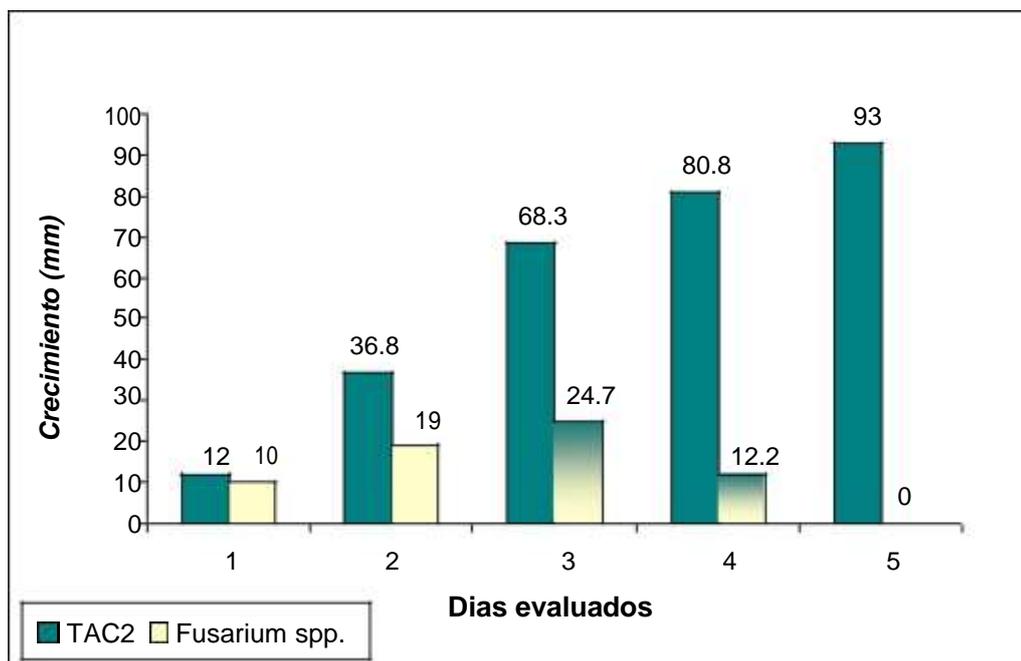


Figura 04.08.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. TAC2 frente a *Sclerotinia* spp., Tratamiento 8 (T8).

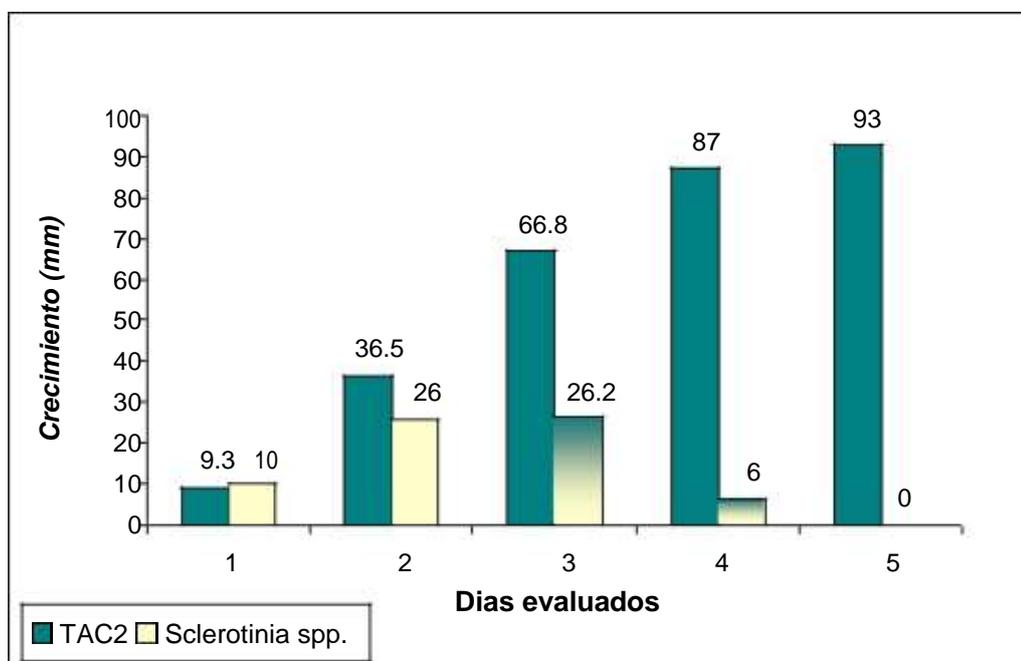
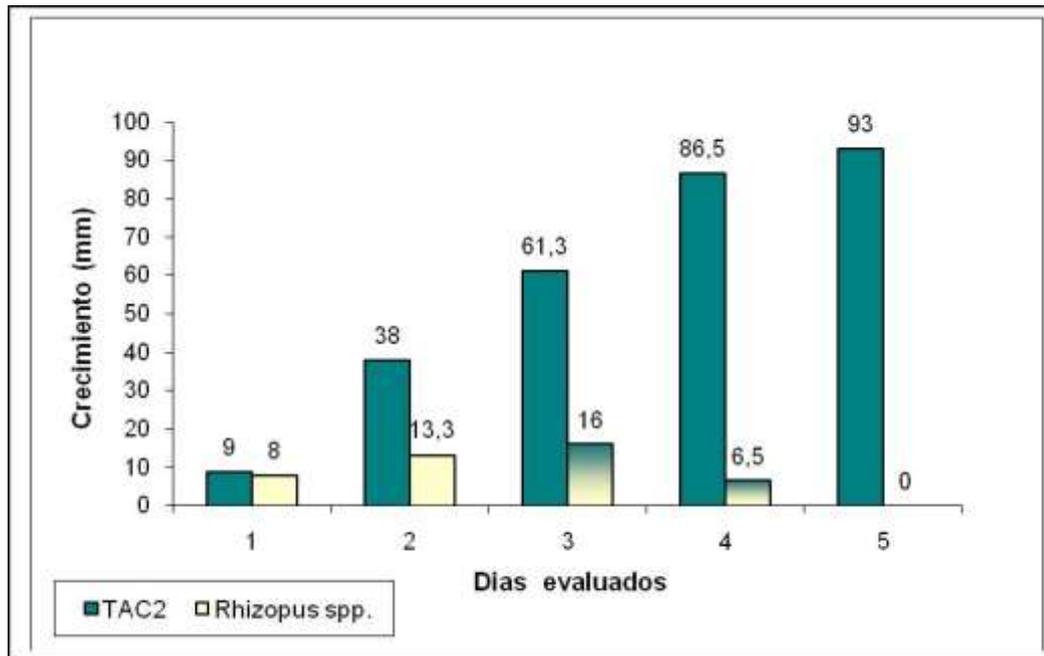


Figura 04.09.- Bioensayo 2: Antagonismo de la cepa de *Trichoderma* spp. TAC2 frente a *Rhizopus* spp., Tratamiento 9 (T9).



V. DISCUSIÓN.

BIOENSAYO 1.

De las ocho cepas evaluadas en el bioensayo 1 se seleccionaron tres, dos de las cuales fueron aisladas del área de producción del cacao y una del área de producción ecológica en la producción de estos suelos no se ha usado agroquímicos, sino que productos biológicos y una fertilización a base de materia orgánica, lo que puede haber favorecido a que estas cepas hallan tenido mejor eficiencia en su crecimiento con relación a las del área de producción convencional, ya que para la producción de estos suelos se usa una gran cantidad de productos químicos y quizás por esta razón no tuvieron la misma eficiencia en cuanto a crecimiento que las tres cepas seleccionadas estadísticamente para ser usadas en el bioensayo 2. Ven anexos N^o 4.

El medio de cultivo PDA tiene influencia contundente en el crecimiento del hongo *Trichoderma* spp., corroborando lo que manifiesta Monzón A. y Rodríguez, J. (S/F) en que el alto contenido de carbohidratos que contiene el medio de cultivo, condiciona a que los hongos tengan un mayor crecimiento.

En la interacción Cepas-Medio de cultivo los tratamientos con mejores promedios de crecimiento fueron las tres cepas seleccionadas estadísticamente las que pertenecen a: dos del área del cacao y una del área ecológica y su mayor crecimiento fue en el medio de cultivo (PDA) papa dextrosa agar.

Entre las características mas relevantes de las cepas en estudio, se observa que todas adquirieron en la fase de multiplicación una esporulación de coloración verde, lo cual corresponde a una característica específica para hongos del orden *Trichoderma*, como lo manifiesta Esposito, E., y Da-Silva, M. (1998); Harman, G. (2001);

Papavizas, G. (1985). En cuanto a la percepción del olor a coco que emiten tres de las cepas en estudio, concuerda con lo que manifiesta Dennis y Webster, S/F; citado por Biocontrol, (2005), en que una de las características de *Trichoderma* es el pronunciado aroma a coco que emite el medio de cultivo, lo que certifica que el hongo con que se trabajó pertenecía al género *Trichoderma*, las cepas que no emitieron el característico olor a coco, posiblemente se debió a la influencia del medio de cultivo para ello, pero las observaciones microscópicas en placas fijadas de las fialides, estructuras únicas de este orden, permitió certificar su pertenencia a este género de hongo. Ver anexos N^o 8.

El coeficiente de variación en el bioensayo 1 es alto debido a la alta variabilidad de los materiales biológicos evaluados en esta investigación.

BIOENSAYO 2.

5.2.1.- ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. (Cepa TAC1) FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Rhizopus* spp.

En los tratamientos 1, 2 y 3 (T1, T2 y T3) en el primer día evaluado, el crecimiento de los dos hongos fue homogéneo, pero para los días 2 y 3 el crecimiento de *Trichoderma* spp., se incrementa mucho con relación al fitopatógeno, cubriendo la mayor parte del sustrato, en este caso PDA (Papa dextrosa agar), la velocidad del crecimiento que tiene *Trichoderma* spp., es aprovechada por este como un mecanismo de control biológico conocido como competencia de recurso vital, corroborando lo expresado por Tronsmo y Hhjeljord (1998); citado por Biocontrol, (2005). El tercer día evaluado es el momento en que se confronta el crecimiento del hongo benéfico con el fitopatógeno en la caja petri, es cuando comienza el micoparasitismo, al cuarto y quinto día *Fusarium* spp.; *Sclerotinia* spp. y *Rhizopus* spp., es invadido por las hifas de *Trichoderma* spp., en el medio de cultivo y este cambia de color, pasando de crema a un color anaranjado intenso, este fenómeno

puede ser provocado por la liberación de enzimas que realiza *Trichoderma* spp., al momento que micoparasita al fitopatógeno, degradándolo y alimentándose de este, corroborando lo expresado por Harman, G (2001).

5.2.2.- ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. (Cepa TAE1) FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Rhizopus* spp.

En los tratamientos 4, 5 y 6 (T4, T5 y T6) en los días evaluados tuvieron un comportamiento similar en cuanto a crecimiento y mecanismo de acción con la diferencia que en estos tratamientos no hubo cambio de coloración en los fitopatógenos como ocurrió en los tratamientos (T1, T2 y T3), solo en el tratamiento 5 la cepa TAE1 al cuarto día evaluado, en el momento que *Trichoderma* spp., invadía la mitad del crecimiento de *Sclerotinia* spp., comenzó a esporular y al quinto día, cubrió por completo al fitopatógeno realizando una esporulación abundante sobre el, corroborando lo expresado por Biocontrol (2005), quien manifiesta que en estas pruebas se puede observar hiperparasitismo y en muchos casos incremento de la esporulación cuando *Trichoderma* spp., crece sobre la colonia del patógeno, siendo este uno de esos casos, degradándolo y alimentándose del fitopatógeno, corroborando lo expresado por Harman, G (2001).

5.2.3.- ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. (Cepa TAC2) FRENTE A *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Rhizopus* spp.

En los tratamientos 7, 8 y 9 (T7, T8 y T9) en los días evaluados tuvieron un comportamiento similar en cuanto a crecimiento y mecanismo de acción ejercido sobre *Fusarium* spp; *Sclerotinia* spp. y *Rhizopus* spp., con la diferencia que en estos tratamientos no hubo cambio de coloración en los fitopatógenos como ocurrió en los tratamientos (T1, T2 y T3), pero en el tratamiento 9 la cepa TAC2 al quinto día evaluado, invadió por completo a *Rhizopus* spp.,

parasitándolo y realizando una esporulación abundante sobre este, corroborando lo expresado por Biocontrol (2005), quien manifiesta que en estas pruebas se puede observar hiperparasitismo y en muchos casos incremento de la esporulación cuando **Trichoderma** spp., crece sobre la colonia del patógeno, siendo este uno de esos casos, degradándolo y alimentándose del fitopatógeno, corroborando lo expresado por Harman, G (2001).

En los histogramas de los tratamientos se puede observar la inhibición antagónica, competencia por el sustrato y el micoparasitismo que ejercen las cepas TAC1, TAE1 y TAC2 sobre los fitopatógenos, a partir del tercer día evaluado, corroborando lo expresado por De la Cruz, (1987), que la actividad antagónica de **Trichoderma** spp., contra hongos fitopatógenos en pruebas “*in vitro*” es eficiente, determinado que **Trichoderma** spp., paraliza el crecimiento de los hongos patógenos.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1.- CONCLUSIONES.

- ❖ En nuestros suelos contamos con una excelente microfauna benéfica que puede ser aprovechada y multiplicada a nivel de laboratorio y liberada en nuestros campos par mantener el equilibrio natural de organismos fitopatógenos.
- ❖ Se aislaron 8 cepas de las tres áreas de producción de la ESPAM“MFL”: dos cepas del área convencional, codificadas TACv1 y TACv2, cuatro del área del cacao, codificadas TAC1, TAC2, TAC3 y TAC4 y dos del área ecológica codificadas TAE1 y TAE2.
- ❖ De los 16 tratamientos analizados en el bioensayo 1 se seleccionaron los tratamientos T5 (TAC1), T13 (TAE1) y T7 (TAC2) por su mayor velocidad en crecimiento al segundo día, aunque todas las cepas son buenas pero estas tres son las mejores estadísticamente.
- ❖ Todas las cepas en estudio tuvieron una esporulación color verde y dos de las seleccionadas para el bioensayo 2 emitieron un aroma a coco y fueron las codificadas: TAC1 y TAE1.
- ❖ Las cepas TAC1, TAE1 y TAC2 estudiadas en el bioensayo 2 son de excelente calidad ya que inhiben por completo a los fitopatógenos, y el micoparasitismo empieza al tercer día de realizada la siembra, al cuarto y quinto día habían cubierto a los fitopatógenos alimentado de ellos, esto significa que tienen un alto grado de hiperparasitismo.

- ❖ De las tres cepas en estudio la TAE1 en el T4, T5 y T6 en especial contra ***Sclerotinia*** spp., fitopatógeno que tuvo el mayor crecimiento con referencia a los otros dos, al cuarto día de micoparasitismo la cepa TAE1 emitió una gran cantidad de esporas sobre este patógeno en especial, concluyo que es un mecanismo de acción que garantiza la eliminación total del mismo.
- ❖ La cepa TAC2 micoparasió a los tres fitopatógenos en estudio al tercer día de realizada la siembra y al quinto día los elimino y su esporulación fue al quinto día, pero solo en el tratamiento 9, frente a ***Rhizopus*** spp.
- ❖ El mecanismo de acción de las cepas de ***Trichoderma*** spp., en estudio fueron, primero por competencia del sustrato por su velocidad de crecimiento y liberación de gases que inhiben el crecimiento del fitopatógeno y luego por micoparasitismo con la eliminación total del organismo.

6.2.- RECOMENDACIONES.

- ❖ Mantener las ocho cepas estudiadas en el bioensayo 1 en el Laboratorio de Microbiología de la ESPAM”MFL”, para ser utilizadas en futuras investigaciones e identificarlas por especie ya que entre ellas puede haber una que aun no ha sido identificada.
- ❖ Que las tres cepas estudiadas en el bioensayo 2, sean utilizarlas en pruebas de liberación en campo, para evaluar su resultados.
- ❖ La cepa TAC2 detuvo el crecimiento de ***Rhizopus*** spp., sea multiplicada en laboratorio y utilizada en una investigación en campo para evaluar la inhibición del fitopatógeno antes

mencionado que tanto daño causa en post-cosecha en frutos de papaya y otros.

- ❖ La cepa TAE1 controla a ***Fusarium*** spp., “*in Vitro*” se la utilice en pruebas para controlar este hongo que tanto daño causa a nivel de semillero y en todo el ciclo de las plantas.

- ❖ La cepa TAC1 inhibió y micoparásito con gran éxito a ***Sclerotinia*** spp., por esta razón debe ser probado en campo para evaluar su control contra este hongo que provoca la pudrición algodonosa en el tomate en semillero y plantas en crecimiento.

- ❖ Las cepas TAC1, TAE1 y TAC2 ejercen un control eficiente de los fitopatógenos en estudio a nivel “*in vitro*” pero la que tiene mejores características para ser multiplicada y liberada en campo es la cepa TAC2, ya que su esporulación es mayor durante todo su desarrollo, esta característica es fundamental para ser establecida con mayor rapidez en un campo determinado, con relación a la TAC1 y TAE1 que su esporulación es pobre a pesar que su crecimiento es bueno.

- ❖ Montar un Laboratorio de Identificación y multiplicación de Entomopatógenos en la ESPAM”MFL”, el mismo que brindará hongos benéficos de nuestras zonas de producción que garanticen un control eficiente de plagas y enfermedades evitando el uso de agroquímicos que tanto daño nos causan.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. (1991). Manual de enfermedades de las plantas, Tomo 2. Academic press, INC. Versión al Español. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Banderas 95, C. P. 06040, Mexico, D.F. p. 266, 267, 371, 386.

Andrews K., y Quezada, J. (1989). Manejo integrado de plagas insectil es en la Agricultura. Estado actual y futuro, Ed. Departamento de Protección Vegetal. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. Tegucigalpa Honduras. p. 120-217.

Baker, K. F., y Cook, J. R. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens, St. Paul, Minnesota. APS Press. 539p.

Bell, D. *et al.* (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* sp., against six fungal plant pathogens. Phytopathology.

Biocontrol. (2005). *Trichoderma*: fungicida biológico, estimulador de crecimiento en plantas y degrada algunos grupos de pesticidas, Bolo san Isidro, Grano de Oro, Km. 5 Vía Palmira-Candelaria. Palmira. Colombia. gerencia@controlbiologico.com

Bold, H. (1980). Morfología de plantas y hongos. 4a. Edition. New York. Harper and Row.

Campbell, R. (1989). Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge p. 218.

DeBACH, P. (1974). Biological Control by Natural Enemies, Cambridge University Prees. p. 323.

De La Cruz, W. (1987). Combate biológico de *Phytium* sp. *Rhizoctonia* sp., y *Fusarium* sp. Agentes causales del mal del almácigo en

semilleros de *Pinus radiata* , con ***Trichoderma*** sp. En condiciones de laboratorio y campo, Tesis Ing. Agr. ESPOCH. Riobamba, Ecuador.

Esposito, E. y DaSilva M. (1998). Systematics and enviromentai application of the genus ***Trichoderma***, Critical review in microbiology p. 24, 89-98.

Harman, G. (2001). ***Trichoderma*** sp., Including ***T. Harzianum***, ***T.virtde***, ***T. Koningil***, ***T. Hamatum*** and other sp. Deuteromycetes, moniliales (asexual ciassification system) , <http://www.birdhybrids.com/t-22 .htm>

Herrera, L. y Mayea, S. (1994). Fitopatología General, Edición Ventura Publisher-Juana Maria Pérez. Editorial Félix Varela. El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. p. 290, 291.

Jiménez, J. (1990). El Control Biológico en Plagas de Banano, Planta Piloto INISAV. Calle 110 y 5ta B # 514 Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Papavizas, G. C. (1985). ***Trichoderma*** and gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol, Annual review of phytopathology p 23, 23-54.

Solís, S., y Ellis, M. (2004). Información obtenida en Estación Experimental Pichilingue. Laboratorio de Fitopatología.

Suquilanda, M. (1996). Agricultura orgánica, Alternativa tecnológica del futuro. Ed. UPS, FUNDAGRO. Cayambe, Ecuador. p. 258 y 261.

Landez, E. (1999). Cómo hacer insecticidas agrícolas utilizando plantas de la huerta, Editado por el SURCO. Domingo Espinar N 24-54 y Av. La Gasca. Telefax: 526021 – Casilla: 17-08-8055. Quito-Ecuador. p. 11.

Melgarejo, P., De Cal, A., et M. Sagasta, E. (1989). Influence of ***Penicillium frequentans*** and two of its antibiotics on production of stromata by ***Monilinia laxa*** in culture, Can. J. Bot. 67:83-87.

Monzón, A. y Rodríguez, L. (S/F). Infecciones causadas por el género ***Fusarium***, Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.

http://www.accionecologica.org/webaer/index.php?option=con_content&task=view&=89&Itemid=39#pat

RIFAI, M.A. (1969). A Revision of the genus *Trichoderma*, Commonwealth Mycological Institute. England.

Rollán, M., Mónaco, C. Lampugnani, G. y Arteta, N. (1998). Variación de la población de hongos antagonistas de ***Sclerotinia sclerotiorum*** en el suelo por la aplicación de agroquímicos. Primer congreso argentino de control biológico de enfermedades de plantas. Acta de resúmenes. Universidad de Buenos Aires, Secretaría de Agricultura, Ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina. p. 27.

Monzón, A. y Rodriguez, J. L. (S/F). Infecciones causadas por el género ***Fusarium***. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.

Ulhoa, C. (1996). Enzimas micolíticas produzidas por agente de biocontrole ***Trichoderma harzianum***, V sincobiol Simposio de controle biológico. Anais: conferencias y palestras. Foz de Iguacu-Parana-Brasil. p.234-238.

Hall, I. (1974). Dispersión of pathogens, Ed. In F.G. Maxwell y F.A.Harris. Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and. Diseases. Univ. Press. Jackson. Mississippi. p. 591, 598.

Wilson, C., Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Khan, V. and Arul, J. (1994). Potential of induced Resistance to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables, *Plant Disease* 78:9: 837 – 844.

Wilson, Ch., y Wisniewski, M. (1989). Futures alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases en *Biological Control Of Plant diseases*, edited by E.S. Tjamos et al., Plenum Press, New York. p.133, 138.

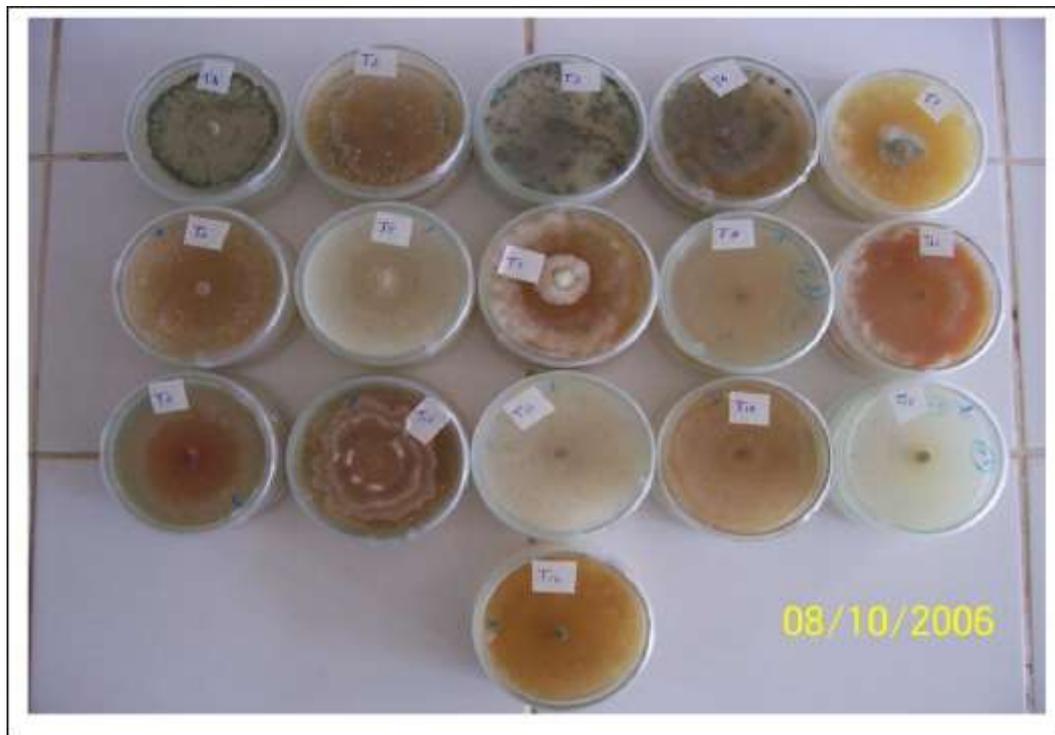
ANEXOS

FOTOGRAFÍAS

N^o. 1.- Siembra de las cepas en estudio. Laboratorio de Microbiología de la ESPAM. "MFL". 2006.



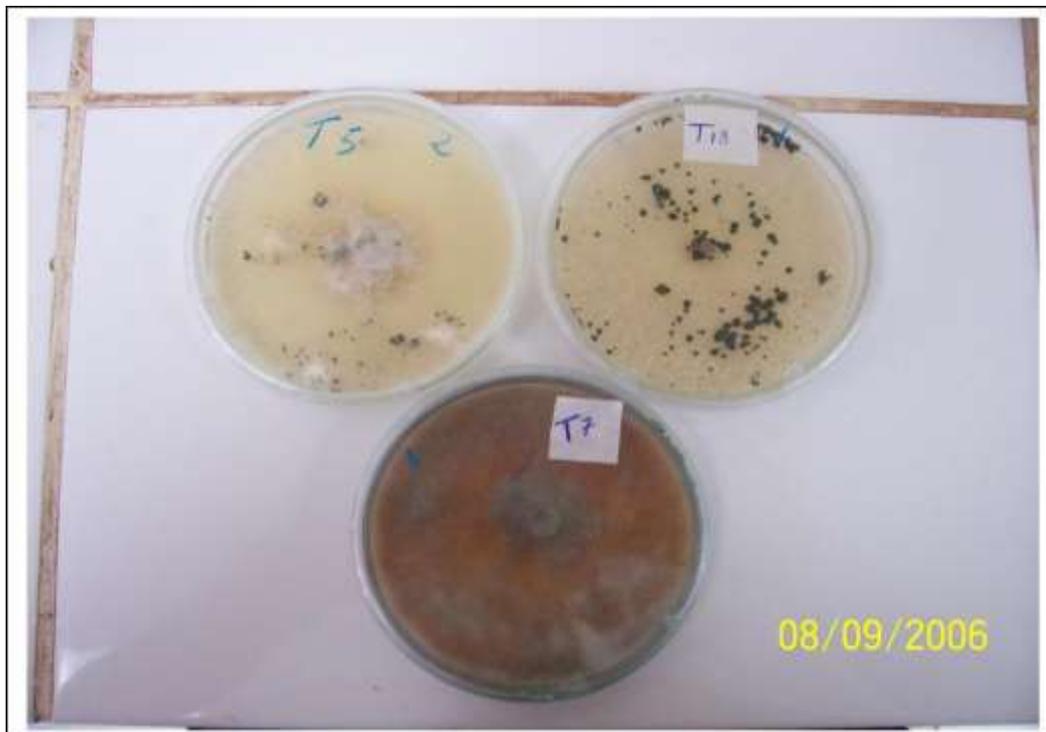
N⁰. 2.- Tratamientos del bioensayo 1, en el laboratorio de Microbiología de la ESPAM."MFL". 2006.



N⁰ 3.- Toma de datos en uno de los días evaluados.



N⁰ 4.- En esta fotografía se encuentran las tres cepas de *Trichoderma* spp., que por medio de un análisis estadístico fueron seleccionadas para el bioensayo 2. Las que pertenecen al los códigos: T5 = TAC1, T13 = TAE1 Y T7 = TAC2.



N^o 5.- Tratamientos del bioensayo 2. Laboratorio de Microbiología de la ESPAM."MFL". 2006.



N^o. 6.- Antagonismo ejercido por cada una de las cepas en estudio contra los diferentes fitopatogenos. Laboratorio de Microbiología de la ESPAM."MFL". 2006.



Trichoderma spp., codificada TAE1 inhibiendo y micoparasitando a *Sclerotinia* sp.

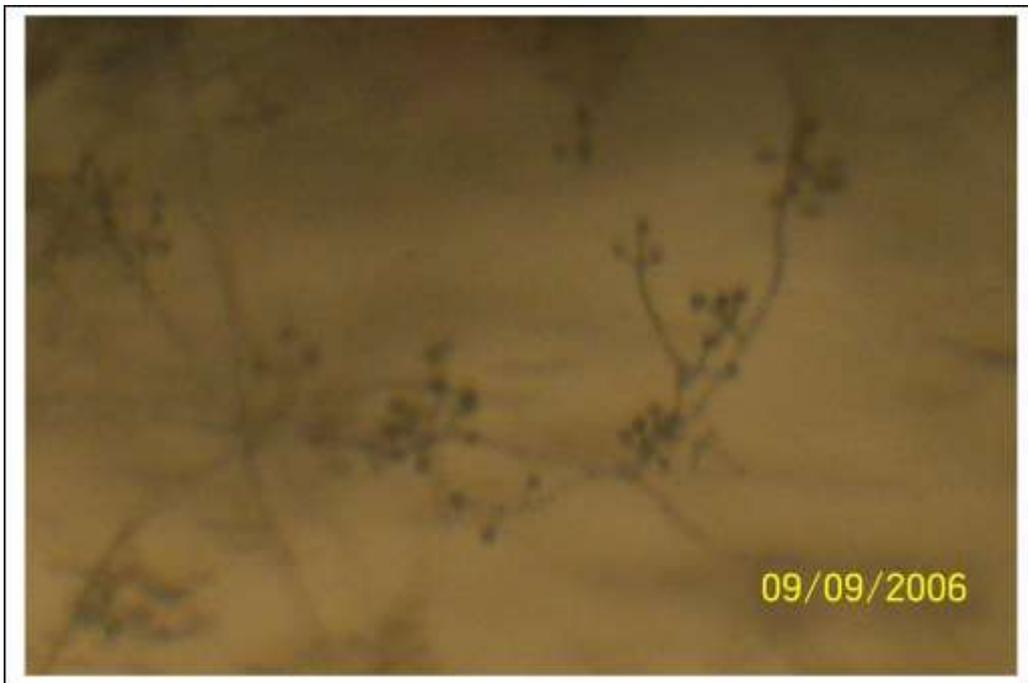


Trichoderma spp., codificada TAC1 inhibiendo y micoparasitando a *Fusarium* sp.



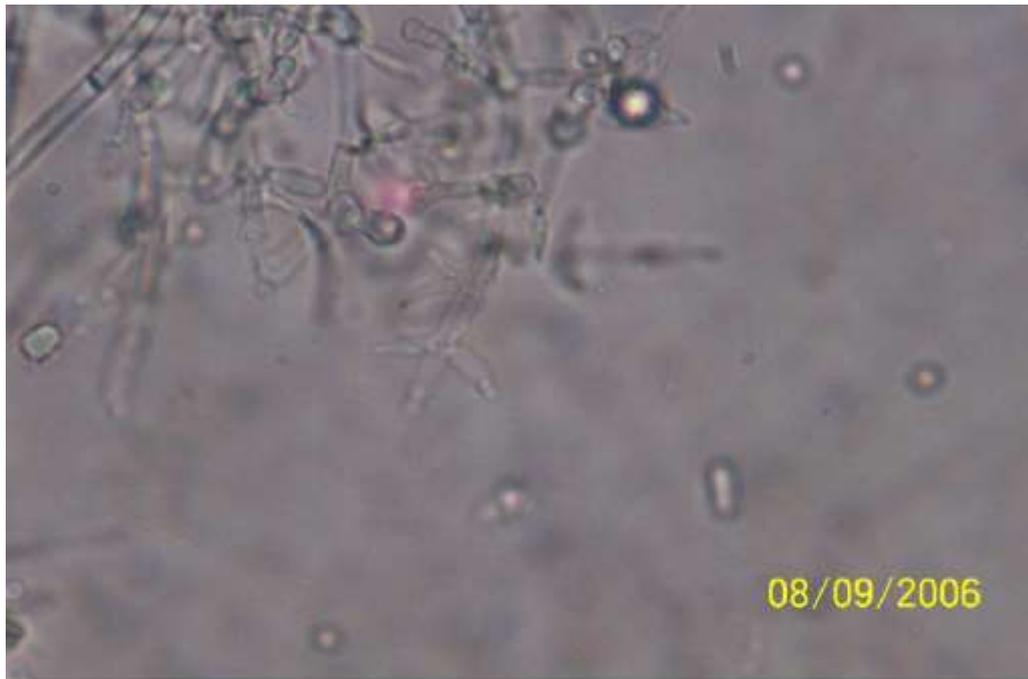
Trichoderma spp., codificada TAC2 inhibiendo y micoparasitando a *Rhizopus* sp.

N^o. 7.- Estructuras microscopicas de *trichoderma* spp. Laboratorio de Microbiología de la ESPAM."MFL". 2006.

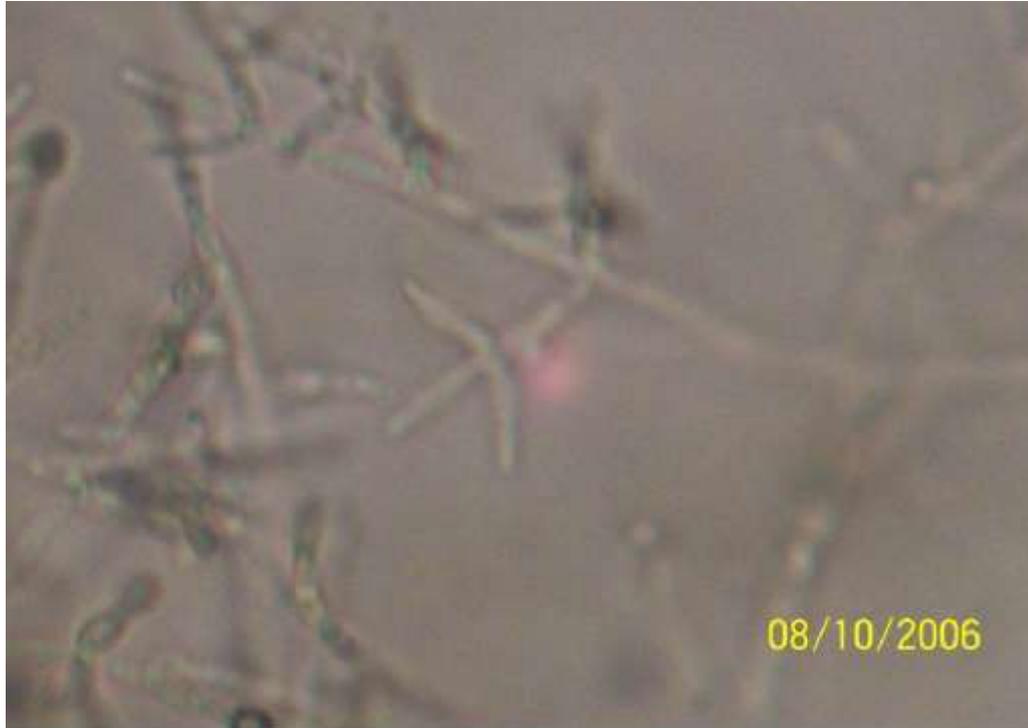


N⁰. 8.- Aquí se observa claramente las fialides en forma de botella, estructuras únicas que garantizan que el hongo en estudio pertenece al genero *Trichoderma* spp. Laboratorio de Microbiología de la ESPAM."MFL". 2006.

N⁰. 8.1.- FOTOS MICROSCOPICA CON OBJETIVO DE 40X DE LA CEPA (TAC1)



N^o. 8.2.- FOTOS MICROSCOPICA CON OBJETIVO 40X DE LA CEPA (TAE1)



**N^o. 8.3.- FOTOS MICROSCOPICA CON OBJETIVO 40X DE LA
CEPA (TAC2)**



N^o. 9.- ADEVAS Y TABLAS DE DATOS DEL BIOENSAYO 1.

DATOS TOMADOS DEL BIOENSAYO 1. Velocidad de crecimiento en mm/día						
No	CODIGO DE TRATAMIENTOS	DÍA 1				
		REPLICAS			E	X
		I	II	III		
1	TACv1 + PDA	2	2	4	8	2,67
2	TACv1 + AEM	4	2	2	8	2,67
3	TACv2 + PDA	3	2	2	7	2,33
4	TACv2 + AEM	5	4	2	11	3,67
5	TAC1 + PDA	28	3	36	67	22,33
6	TAC1 + AEM	15	26	2	43	14,33
7	TAC2 + PDA	13	15	13	41	13,67
8	TAC2 + AEM	11	13	3	27	9,00
9	TAC3 + PDA	3	3	5	11	3,67
10	TAC3 + AEM	3	3	5	11	3,67
11	TAC4 + PDA	15	15	23	53	17,67
12	TAC4 + AEM	12	12	11	35	11,67
13	TAE1 + PDA	23	23	23	69	23,00
14	TAE1 + AEM	13	13	13	39	13,00
15	TAE2 + PDA	2	3	2	7	2,33
16	TAE2 + AEM	2	2	2	6	2,00
					443	147,67

ADEVA DÍA 1						
FV	GL	SC	CM	Fc	Ft	
TOTAL	47	3474,48	---	---	0,05	0,01
TRATAMIENTO	15	2474,48	164,97	5,28**	2,02	2,71
ERROR	32	1000,00	31,25			
CEPAS	7	2138,98	305,57	9,78**	2,32	3,25
MEDIO DE CULTIVO	1	143,52	143,52	4,60*	4,20	7,50
C x M. C	7	191,98	27,43	0,90NS		

DATOS TOMADOS DEL BIOENSAYO 1. Velocidad de crecimiento en mm/día						
No	CODIGO DE TRATAMIENTOS	DÍA 1				
		REPLICAS			E	X
		I	II	III		
1	TACv1 + PDA	13	19	17	49	16.3
2	TACv1 + AEM	19	13	23	55	18.3
3	TACv2 + PDA	3	3	3	9	3.0
4	TACv2 + AEM	1	3	3	7	2.3
5	TAC1 + PDA	55	36	47	138	46.0
6	TAC1 + AEM	48	47	44	139	46.3
7	TAC2 + PDA	52	53	50	155	51.7
8	TAC2 + AEM	34	34	20	88	29.3
9	TAC3 + PDA	2.8	2.8	5	10.6	3.5
10	TAC3 + AEM	28	28	26	82	27.3
11	TAC4 + PDA	45	40	50	135	45
12	TAC4 + AEM	19	14	14	47	15.7
13	TAE1 + PDA	53	57	57	167	55.7
14	TAE1 + AEM	35	40	32	107	35.7
15	TAE2 + PDA	13	16	19	48	16.0
16	TAE2 + AEM	31	36	29	96	32.0
					1332.6	444.20

ADEVA DÍA 2						
FV	GL	SC	CM	Fc	Ft	
TOTAL	47	14834,37	-----	-----	0,05	0,01
TRATAMIENTO	15	14276,48	951,77	54,60**	2,02	2,71
ERROR	32	557,89	17,43			
CEPAS	7	10397,15	1485,31	85,22**	2,32	3,25
MEDIO DE CULTIVO	1	171,01	171,01	9,81**	4,20	7,50
C x M. C	7	3708,33	529,76	30,39**		