
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Efectividad biológica de *Trichoderma harzianum* sobre hongos fitopatógenos in vitro e in vivo y su papel en el desarrollo de plántulas.

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta

Karen Malanco Nieto

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. septiembre del 2011.



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-150/2010.

C. KAREN MALANCO NIETO
PRESENTE

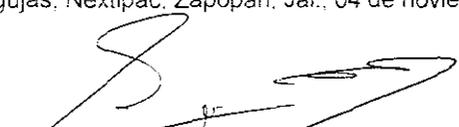
Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**Efectividad biológica de *Trichoderma harzianum* sobre hongos fitopatógenos *in vitro* e *in vivo* y su papel en el desarrollo de plántulas**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo al **Dr. Gil Virgen Calleros**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 04 de noviembre de 2010.



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRÉSIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIATURA EN BIOLÓGIA



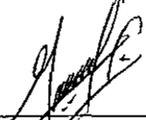
M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

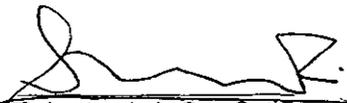
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: **"Efectividad biológica de *Trichoderma harzianum* sobre hongos fitopatógenos *In Vitro* e *In Vivo* y su papel en el desarrollo de plántulas"** que realizó la pasante Karen Malanco Nieto con número de código B04008316 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

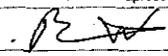
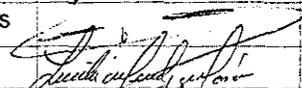
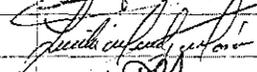
Atentamente
 Guadalajara, Jal. Al 8 de septiembre de 2011.

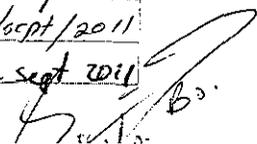


 Dr. Gil Virgén Calleros
 Director de tesis



 Dr. Salvador de la Paz Gutiérrez
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Ramón Rodríguez Macías		12-sept-2011
Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias		9/Sept-2011
Dra. Lucila Méndez Morán		12/Sept/2011
Supl. M.C. José Armando Arias García		12 sept 2011



El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de fitopatología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara bajo la dirección del Dr. Gil Virgen Calleros.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Gil Virgen Calleros por sus múltiples y valiosas enseñanzas, por hacer siempre ameno el trabajo y por ser siempre un ejemplo de dedicación y entrega.

A mis compañeros de laboratorio Carmen Espitia, Mónica Limón y Sergio Morales por su amistad y ayuda desinteresada. A Magaly Sánchez por su paciencia y porque siempre estuvo ahí cuando la necesité.

A mis sinodales la Dra. Teresa Esquivias, el Dr. Ramón Rodríguez y el Dr. Armando Arias por sus valiosas críticas constructivas, su tiempo, dedicación y disposición para la revisión de esta tesis.

Un especial agradecimiento a la Dra. Lucila Méndez por sus sabias observaciones, por su ayuda en la redacción de éste trabajo y el tiempo invertido en él.

DEDICATORIAS

A mis padres:

*Que siempre me han enseñado el camino correcto,
gracias por su infinito amor, motivación y apoyo para
lograr mis metas. Los amo* ♥

A mi esposo:

*El amor de mi vida, por alentarme en la culminación
de éste trabajo, por su apoyo, amor incondicional y
felicidad que siempre me contagia.*

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	i
ÍNDICE DE CUADRO	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
<u>1 INTRODUCCIÓN.....</u>	1
<u>2 ANTECEDENTES.....</u>	3
2.1 Importancia del cultivo de la papa y cucurbitáceas.....	3
2.2 Principales enfermedades del cultivo de la papa.....	4
2.3 Enfermedades causadas por <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	4
2.4 La problemática del uso de agroquímicos.....	6
2.5 Actividad fungicida e influencia del quitosán en la estimulación del crecimiento de las plantas.....	7
2.6 Importancia del control biológico.....	8
2.7 <i>Trichoderma</i> spp. y su papel en el control biológico.....	10
2.8 Control biológico de <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i> usando <i>Trichoderma</i> spp.....	13
2.9 El papel de <i>Trichoderma</i> spp. en el desarrollo de las plantas.....	13
2.10 <i>Trichoderma</i> spp. en el suelo.....	15
2.11 Técnicas de aplicación de <i>Trichoderma</i> spp.....	16
2.12 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. para el control biológico..	16
2.12.1 Antibiosis.....	17
2.12.2 Parasitismo.....	21
2.12.3 Competencia.....	23
2.12.4 Resistencia Sistémica Inducida.....	24

2.13 Morfología y caracteres culturales de <i>T harzianum</i>	25
2.14 Taxonomía y genética de <i>T. harzianum</i>	27
<u>3 JUSTIFICACIÓN.....</u>	28
<u>4 HIPÓTESIS.....</u>	29
<u>5 OBJETIVOS.....</u>	29
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos particulares.....	29
6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
6.1 Preparación de medios de cultivo.....	30
6.2 Experimentos in vitro.....	30
6.2.1 Obtención y aislamiento de hongos.....	30
6.2.2 Evaluación microparasítica de <i>T. harzianum</i>	31
6.2.3 Obtención de extractos de <i>T. harzianum</i>	32
6.2.4 Pruebas de actividad biológica de extractos de <i>T. harzianum</i>	33
6.3 Experimentos in vivo.....	33
6.3.1 Metodología para la aplicación de extracto crudo de <i>T. harzianum</i> en plántulas de cucurbitáceas.....	33
6.3.2 Métodos de inoculación de <i>T. harzianum</i> en papa para la evaluación del control de la enfermedad causada por <i>R. solani</i> en papa.....	34
6.3.3 Aplicaciones de Composta y Fertilización e inoculación de <i>T. harzianum</i> en plantas de pepino.....	37

<u>7..RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	40
7.1 Micoparasitismo in vitro de <i>T. harzianum</i> sobre <i>S. rolfsii</i> y <i>R. solani</i> e inhibición del crecimiento micelial.....	40
7.2 Pruebas de actividad biológica de extractos de <i>T. harzianum</i> crecidos previamente en presencia de quitosán sobre hongos fitopatógenos.....	45
7.3 Influencia de la aplicación de extractos de <i>T. harzianum</i> en el desarrollo de plántulas de cucurbitáceas.....	53
7.4 Evaluación de la severidad de la enfermedad causada por <i>R. solani</i> en papa con la inoculación de <i>T. harzianum</i>	57
7.5 Desarrollo de plantas de pepino después de la inoculación de <i>T. harzianum</i> , y la aplicación de composta y fertilización a diferentes porcentajes.....	61
<u>8 CONCLUSIONES.....</u>	67
<u>9 BIBLIOGRAFÍA.....</u>	68

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Antibióticos producidos por especies de <i>Trichoderma</i> spp. (Mohiddin et al. 2010).....	21
Cuadro 2. Tratamientos aplicados en suelo para evaluar severidad de la enfermedad causada por <i>R. solani</i> (R.s.) en papa.....	36
Cuadro 3. Propiedades de la composta utilizada (Iñiguez – Covarrubias et al., 2011).....	38
Cuadro 4. Tratamientos a evaluar en plántulas de pepino sembradas en charolas.....	38
Cuadro 5. Tratamientos a evaluar en plantas de pepino con distintas proporciones composta/ <i>T. harzianum</i> /fertilización. (x= no inoculadas con <i>T. harzianum</i>).....	39
Cuadro 6. Plan de fertilización de plantas de pepino en sus diferentes etapas.....	39
Cuadro 7. Porcentaje de crecimiento de <i>T. harzianum</i> sobre <i>R. solani</i> y <i>S. rolfsii</i> en base al número de discos germinados tomados de la zona de traslape entre <i>T. harzianum</i> y los fitopatógenos, en donde el 100% se considera en base al crecimiento único de <i>T. harzianum</i> lo que representa una inhibición completa del patógeno, datos tomados 5 días después de la siembra.....	42
Cuadro 8. Crecimiento radial del micelio de <i>S. rolfsii</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio envenenado con extractos de diferentes cepas de <i>T. harzianum</i> a diferentes concentraciones extracto/PDA.....	44
Cuadro 9. Crecimiento radial del micelio de <i>R. solani</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio envenenado con extractos de diferentes cepas de <i>T. harzianum</i> a diferentes concentraciones extracto/PDA.....	45
Cuadro 10. Crecimiento radial del micelio de <i>S. rolfsii</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de <i>T. harzianum</i> TC1.....	47

Cuadro 11. Crecimiento radial del micelio de <i>S. rolfsii</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de <i>T. harzianum</i> TC3.....	48
Cuadro 12. Crecimiento radial del micelio de <i>S. rolfsii</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de <i>T. harzianum</i> TCActino.....	49
Cuadro 13. Crecimiento radial del micelio de <i>R. solani</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de <i>T. harzianum</i> TC1.....	50
Cuadro 14. Crecimiento radial del micelio de <i>R. solani</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de <i>T. harzianum</i> TC3.....	51
Cuadro 15. Crecimiento radial del micelio de <i>R. solani</i> 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de <i>T. harzianum</i> TCActino.....	52
Cuadro 16. Días a emergencia y altura de la plántula de sandía después de 30 días de la siembra y tratadas con diferentes extractos de <i>T. harzianum</i>	55
Cuadro 17. Días a emergencia y altura de la plántula de melón después de 30 días de la siembra y tratadas con diferentes extractos de <i>T. harzianum</i>	56
Cuadro 18. Días a emergencia y altura de la plántula en calabaza después de 30 días de la siembra y tratadas con diferentes extractos de <i>T. harzianum</i>	57
Cuadro 19. Resultados de la severidad de la enfermedad causada por <i>R. solani</i> con inoculación de <i>T. harzianum</i> . Los resultados fueron obtenidos en función del daño físico (porcentaje de superficie) observado en la raíz y tallo de la planta, considerando la siguiente escala: Planta sana= 0 , 1 a 25% de daño= 1, 26 a 50% de daño= 2, 51 a 75% de daño=3 y 75 a 100% daño o muerte de la planta=4.....	60
Cuadro 20. Comparación del desarrollo de plántulas de pepino utilizando diferentes porcentajes de sustrato composta/peatmost.....	63

Cuadro 21. Efecto del sustrato con diferentes porcentajes de composta y fertilización y la inoculación de <i>T. harzianum</i> sobre las variables evaluadas días a floración y número de flores.....	64
Cuadro 22. Efecto del sustrato con diferentes porcentajes de composta y fertilización y la inoculación de <i>T. harzianum</i> sobre la variable evaluada longitud de las guías.....	65
Cuadro 23. Efecto del sustrato con diferentes porcentajes de composta y fertilización y la inoculación de <i>T. harzianum</i> sobre las variables evaluadas número de hojas y diámetro del tallo de pepino.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Métodos de aplicación de <i>T. harzianum</i> en suelo para la evaluación de la severidad de la enfermedad causada por <i>R. solani</i> en papa.....	35
Figura 2. Confrontación de <i>T. harzianum</i> contra <i>S. rolfsii</i> (izquierda) y <i>R. solani</i> (derecha) donde se observa la zona de traslape entre el crecimiento de estos hongos.....	42
Figura 3. Micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> TC1 sobre <i>R. solani</i> . A. Enrollamiento de <i>T. harzianum</i> sobre hifas de <i>R. Solani</i> . B. Lisis y penetración de haustorios de <i>T. harzianum</i> dentro de hifas de <i>R. solani</i> .100X.....	43
Figura 4. Micoparasitismo <i>T. harzianum</i> TC1 sobre <i>S. rolfsii</i> , donde se observa el enrollamiento de hifas del antagonista sobre su hospedero. 40X.....	43
Figura 5. Observaciones del crecimiento de <i>T. harzianum</i> después de 72 h de la siembra de <i>R. solani</i> en medio PDA envenenado con extracto de <i>T. harzianum</i> . A. Inhibición del crecimiento del micelio de <i>R. solani</i> con extractos de la cepa TC3. B. Inhibición del crecimiento del micelio de <i>R. solani</i> con extractos de la cepa TCActino, ambos a concentración de 50/50 (extracto/PDAA). C. Testigo, crecimiento de <i>R. solani</i> en PDA.....	43

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica in vitro de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, así como su influencia en el desarrollo de algunas cucurbitáceas. Se determinó el parasitismo mediante la confrontación en placa de los fitopatógenos *R. solani* y *S. rolfsii* y tres cepas de *T. harzianum* (TC3, TC1 y TCActino), presentando de un 60 a 100% de actividad micoparasítica sobre los fitopatógenos evaluados, así como enrollamiento y penetración de las hifas sobre éstos por parte del antagonista (*T. harzianum*). La actividad antibiótica de *T. harzianum* frente a los aislamientos de *S. rolfsii* y *R. solani*, fue evaluada en relación a la inhibición del crecimiento radial del micelio de los fitopatógenos en medio envenenado (PDA adicionado con extractos de *T. harzianum*). Las 3 cepas de *T. harzianum* presentaron una alta capacidad inhibitoria del crecimiento micelial sobre *R. solani* y *S. rolfsii*, con un 88.3, 46.6 y 72.5% de inhibición con las cepas TC1, TC3 y TCActino respectivamente en el caso de *S. rolfsii*, mientras que en el caso de *R. solani* se presentó un 54.1, 61.6 y 56.6% de inhibición por parte de las cepas TC1, TC3 TCActino respectivamente. La evaluación de los extractos de *T. harzianum* de las cepas TC3, TC1, TCF y TCT crecidos previamente en caldo de papa adicionados con quitosán, mostraron que la concentración del mismo reduce el crecimiento del micelio de los patógenos en comparación con extractos de *T. harzianum* crecidos sin quitosán, así mismo se encontró que a mayor concentración de quitosán, existe una mayor inhibición en el crecimiento micelial. Ninguno de los extractos de *T. harzianum* obtenidos mostraron actividad fungicida, sino fungistática. En relación a la influencia en el desarrollo de plántulas, los extractos de *T. harzianum* redujeron hasta un 50 % los días a emergencia en las tres especies de plantas evaluadas (calabaza, sandía y melón) con respecto al testigo. En cuanto a la altura de las plántulas, los mejores tratamientos incrementaron el doble de su altura en relación al testigo en sandía y melón, mientras que en calabaza no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo. En el ensayo de papa in vivo, se encontró un efecto positivo en todos los tratamientos donde se utilizaron las cepas de *T. harzianum* para el control de *R. solani*, donde el porcentaje de área dañada en tallo y raíz fue de un 10% con los mejores tratamientos y de un 83% en el testigo, reduciendo la severidad de la enfermedad, sin embargo en relación a la incidencia no se encontraron diferencias entre los tratamientos con *T. harzianum* y el testigo. De manera general el nivel de daño en las plantas, fue menor cuando los tratamientos de *T. harzianum* se aplicaron antes de la inoculación del patógeno. En el ensayo de desarrollo de pepino inoculado con *T. harzianum* y aplicaciones de fertilización y

composta a diferentes porcentajes, los tratamientos presentaron un efecto significativo en las variables, longitud del tallo, días a floración y el número de hojas, sin embargo, en las variables diámetro de tallo y el número de flores no se registraron diferencias entre los tratamientos y el testigo. Se tuvieron mejores resultados cuando se combinaron esporas de *T. harzianum*, composta y fertilización.

1 INTRODUCCIÓN

El control de microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedades en las plantas se realiza principalmente con productos químicos, los cuales en la mayoría de los casos, son efectivos (Oh y Lee, 2000); sin embargo, su uso trae como consecuencia efectos nocivos sobre el ambiente, esto debido a su residualidad ocasionando que se acumulen en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales; sin olvidar los efectos que causan en la salud humana (Paoletti y Pimentel, 2000) y las limitaciones económicas que conlleva la aplicación de químicos costosos en áreas agrícolas con cosechas de poco valor (Virgen y Estrada, 2004).

Además, el uso indiscriminado de agroquímicos y fertilizantes inorgánicos causan un empobrecimiento de los suelos, disminuyen su fertilidad, la vida microbiana y la estabilidad estructural, lo que conduce a una alta infestación y resistencia de patógenos del suelo, así como a una reducción progresiva de su productividad, por lo que cada vez es mayor el fracaso del uso de agroquímicos para lograr un control eficiente de las enfermedades causadas por fitopatógenos (Terry, 2005).

Esto provoca que se tengan que buscar nuevas alternativas para evitar el uso de los agroquímicos. En los últimos años se ha dado mayor importancia a organismos que pueden ser usados como agentes de control biológico (BCAs) (Elad, 2000). Hasta la fecha existen un gran número de informes acerca de microorganismos capaces de excretar sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, las cuales conllevan a variaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, o con actividad parasítica y antagonica, que controlan enfermedades causadas por fitopatógenos de interés comercial.

Tanto los hongos como las bacterias, son microorganismos reconocidos por ser participantes comunes para suprimir naturalmente fitopatógenos en los cultivos, que limitan la severidad de las enfermedades (Windels y Lindow, 1985). Por ello es importante aislar, propagar y evaluar cepas nativas adaptadas a ciertas condiciones ambientales en un determinado lugar.

Los hongos más utilizados en el control biológico pertenecen a la clase Hyphomycetes (Jensen y Wolffhechel, 1995) y de éstos, varias especies correspondientes a los géneros *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. y *Gliocladium* spp. La efectividad del género *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos habitantes del suelo está bien demostrada, sobre todo cuando se aplica tratamientos preventivos y/o curativos. Este género ha mostrado una gran capacidad para controlar enfermedades causadas por una gran variedad de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium roseum* Link, *Sclerotium Rolfsii* Sacc., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. y *Alternaria* spp., entre otros (Infante et al.2009).

Particularmente la enfermedad conocida como costra negra de la papa, causada por *R. solani*, está presente en todas las áreas productoras de papa, y se caracteriza por causar lesiones en el tallo a más del 90% de las plantas infectadas (Estrada, 2004), reduciendo significativamente el rendimiento hasta en un 50% de la productividad (García et al. 2002); éste fitopatógeno junto con *S. rolfsii*, están considerados entre algunos de los patógenos económicamente más importantes que habitan el suelo (Estrada, 2004). En la mayoría de las regiones productoras de papa en México, el uso de fungicidas constituye la práctica más común para su control; sin embargo, los resultados han sido muy variables debido a que éstos patógenos muestran diferente sensibilidad a fungicidas, por lo que en los últimos años se ha recurrido al control biológico como una alternativa al uso exclusivo de estos (Kataria, 1991).

Debido a la importancia que ha tomado el control biológico (CB), se hace necesaria la búsqueda de nuevos BCAs potencialmente controladores de enfermedades. Aunque está demostrado que *T. harzianum* es capaz de controlar enfermedades y contribuir en el desarrollo de las plantas, se sabe que no todas la cepas de este antagonista controlan igual a ciertos fitopatógenos ni contribuyen de igual manera en el desarrollo de ciertas especies de plantas, por lo cual es necesario ampliar el conocimiento acerca de la actividad biocontroladora de distintos aislamientos de *T. harzianum* en condiciones in vitro e in vivo.

De ésta manera, posteriormente se podrá continuar con la identificación de los mecanismos que utilizan los microorganismos para su aplicación en el control biológico y el desarrollo de una formulación que permita su producción a gran escala.

2 ANTECEDENTES

2.1 Importancia del cultivo de la papa y cucurbitáceas

La superficie nacional dedicada a cultivos agrícolas asciende a un total de 20,031 millones de hectáreas. El 67% de esa superficie se dedica a granos, el 3% al cultivo de hortalizas y el 6% al cultivo de frutas (Siller-Cepeda, 1999).

A pesar de que en nuestro país se destina la mayor superficie al cultivo de granos, estos cultivos solamente aportan el 36% del valor total de la producción. Las frutas y las hortalizas, que en conjunto ocupan una superficie del 9%, aportan el 18% y el 16% del valor total de la producción respectivamente. De estos el 70% del comercio internacional se concentra en siete productos, los cuales son papa, tomate, cebolla, sandía, pepino, lechuga y melón. Entre las hortalizas del grupo de las cucurbitáceas que componen el 40% de la oferta exportable están el pepino con un 11.2%, melón 9.7%, sandía 9.7% y calabaza 8.4% (Siller-Cepeda, 1999).

El cultivo de papa es el cuarto cultivo más importante del mundo y constituye anualmente la mitad de la producción mundial de raíces y tubérculos (FAO, 2006). Se estima que el tubérculo es consumido por más de mil millones de personas a nivel mundial y forma parte importante de la dieta de 500 millones de personas en los países en vías de desarrollo (Roach, 2002). En México, el consumo por persona alcanza los 14 kilogramos anuales, se produce prácticamente todo el año y en más de veinte estados de la República (Claridades agropecuarias, 1998; citado por Zuno, 2008).

México ocupa el lugar número 32 como productor de papa con un área sembrada de 68, 810 (Ha) y una producción de 1, 734, 810 (toneladas métricas) de esta producción nacional los primeros cinco estados productores son: Chihuahua (205,995 ton), Sonora (172,166 ton), Nuevo León (142,773 ton), Guanajuato (113,265 ton) y México (78, 735 ton) (FAO, 2006), sin embargo el cultivo de la papa ha disminuido a nivel mundial, principalmente por el ataque de diferentes nematodos, insectos, bacterias, hongos y virus (Alonso, 2002).

2.2 Principales enfermedades del cultivo de la papa

Son múltiples las enfermedades y plagas que atacan la planta de papa, incluyendo las ocasionadas por bacterias, hongos, virus, nematodos y micoplasmas, los cuales han provocado un deterioro en el rendimiento, calidad y sanidad de este cultivo. Los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar.

Algunas de las enfermedades fungosas que atacan a la papa con mayor relevancia son la *Sarna polvorienta* o *Roña causada por Spongospora subterránea*, la cual afecta la calidad de los tubérculos que en variedades susceptibles afecta hasta un 97,5% de las papas con una severidad de 81 a 95%; el Tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, es una de las enfermedades que causa mayores pérdidas en el mundo entero ya que puede destruir un cultivo en cuestión de días, pues el hongo se multiplica muy rápido cuando las condiciones ambientales son las adecuadas; el Tizón temprano causado por *Alternaria solani* provoca una maduración incompleta de las papas y un desprendimiento de la corteza de los tubérculos durante su transporte o almacenamiento ocasionando graves pérdidas en la cosecha; la Sarna o Costra plateada (*Helminthosporium solani*) ha cobrado importancia en los últimos años afectando la calidad de la papa y la Costra negra y Cancro del tallo (podredumbre de la raíz) causadas por *R. solani* se manifiestan con fallas de emergencia de las semillas en campo, producto del ataque del hongo en brotes emergentes, y canchales en estolones y tallos, que reducen el número de plantas por hectárea, lo que da como resultado una disminución en el rendimiento final. Sin embargo, el mayor daño es el incremento en la producción de papas pequeñas, deformes y agrietadas, que disminuyen su capacidad comercializadora (Castro y Contreras, 2011).

2.3 Enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*

Los fitopatógenos *R. solani* y *S. rolfsii* causan enfermedades en los tallos y en las raíces de una gran variedad de cultivos y son responsables del volcamiento de plántulas de semillero y pudriciones en etapas de pre y pos emergencia. Estas dos especies de fitopatógenos ocupan nichos ecológicos similares y su rango de hospederos es semejante; sus estructuras de resistencia están constituidas por esclerocios que pueden permanecer viables en el suelo hasta por 10 años y pueden escapar con facilidad de la acción de

los fungicidas de origen sintético. El control con fungicidas de origen sintético se hace difícil debido a que se deben atacar los esclerocios remanentes en el suelo y mantener la acción tóxica en el tiempo (Hoyos-Carvajal et al. 2008).

Sclerotium rolfsii es un hongo fitopatógeno habitante del suelo con más de 500 hospederos pertenecientes a 100 familias susceptibles a su ataque, pero se desconoce con exactitud el total de sus hospedantes. Su distribución es mundial, con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Ataca desde plántulas, plantas herbáceas, plantas leñosas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo (Flores-Moctezuma et al. 2006).

Los síntomas que ocasiona *S. rolfsii* en los tejidos afectados son: amarillamientos en las hojas inferiores y lesiones en las bases de los hipocotileos de las plantas, caracterizadas por hundimientos, ablandamientos y decoloraciones de la corteza, justamente debajo de la línea del suelo. A medida que la enfermedad avanza, las hojas de las ramas superiores pueden marchitarse y al final toda la planta cae y se quiebra por la base del tallo. Los esclerocios del hongo aparecen generalmente en grandes cantidades, adheridos a la base de los tallos de las plantas afectadas, junto con masas de micelios de color blanco, característico de esta especie (Reyes et al. 2002).

Las pérdidas que causa *S. rolfsii* se consideran importantes en el cultivo de algodón, cacahuete, jitomate, remolacha (Jenkins-Averre, 1986) zanahoria y pimiento (Reyes, et al. 2002). En México existen reportes de su importancia en la costa de Hermosillo, en donde se han encontrado huertos de manzano con 33 a 64% de árboles dañados, en Sinaloa ha cobrado importancia en el cultivo de soya (Ramírez-Arredondo, 1986; citado por Reyes, 2002), en cultivos de ajo y cebolla en el centro del país. La enfermedad conocida como marchitez sureña ha llegado a causar pérdidas desde un 30% hasta un 50% de la producción (Montes-Belmont et al. 2003); sin embargo hasta la fecha se conoce poco sobre cómo controlar a esta enfermedad en estos cultivos. Dentro de las alternativas de manejo de la enfermedad se ha considerado que el control químico es una alternativa viable, sin embargo los datos generados sugieren una gran variabilidad en el comportamiento del hongo, ya que se han obtenido resultados contrastantes en diferentes regiones del mundo cuando se han hecho evaluaciones de productos químicos para el combate de *S. rolfsii* (Pérez-Moreno et al, 2009).

Rhizoctonia solani es un hongo fitopatógeno que se distribuye por todo el mundo, y es uno de los principales fitopatógenos limitantes de la producción

agrícola que afecta a más de 500 géneros de plantas superiores (González, 2008), incluyendo a casi todos los cultivos hortícolas que se desarrollan dentro o sobre el suelo. Cabe destacar que para la mayoría de éstos cultivos no existe ningún fungicida efectivo para las enfermedades que causa este patógeno (Agnios, 1998). Principalmente provoca *damping off* (marchitamiento fúngico) en plántulas, lesiones necróticas en raíces, semillas y tallos, además de daños foliares (González, 2008). La importancia de este fitopatógeno radica en su distribución, supervivencia, rango amplio de hospederos y variabilidad.

Una de las enfermedades más devastadoras que causa el hongo *R. solani* es la rhizoctoniasis o costra negra de la papa, la cual se ha venido incrementando en incidencia y distribución en los últimos años. Esta enfermedad se ha observado en plantaciones y ocasiona plantas achaparradas, amarillentas, con tubérculos aéreos y aspecto blanquecino, que al ser cosechadas, producen tubérculos con evidentes deformaciones, altamente manchados por la presencia de esclerocios del hongo y con rajaduras, lo que causa una reducción del rendimiento de hasta un 50% (García et al. 2002).

2.4 La problemática del uso de agroquímicos

Desde los años 40, el uso de plaguicidas se ha incrementado de una manera continua (Torres y Capote, 2004), y aunque no hay datos claros sobre la cantidad de plaguicidas que se usa actualmente en el país, en el año 2000 se consumieron alrededor de 50,000 toneladas de ingrediente activo, teniendo una relación plaguicidas/ha para hortalizas de aproximadamente 35 Kg/ha.

Los plaguicidas agrícolas se han usado desde fines del Siglo XIX y hasta mediados del siglo pasado se utilizaban cerca de 40 compuestos de tipo botánico o inorgánico. La aplicación intensiva de plaguicidas sintéticos se inició en el país hacia 1948, con la introducción del DDT, posteriormente se utilizaron otros plaguicidas organoclorados y después diversos organofosforados, carbamatos y una gran variedad de herbicidas y fungicidas (Albert, 2005).

Aunque varía según el cultivo, en términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas entre los que destacan el paraquat y el glifosato, los insecticidas más usados son los organofosforados, en especial, paratión metílico, metamidofó, malatión y algunos fungicidas como mancozeb y clorotalonil. En las zonas noroeste y centro de México (Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Baja California, Guanajuato y Jalisco) se utilizan cantidades importantes de plaguicidas de todo tipo para producir granos y una gran

variedad de hortalizas de exportación, entre ellas, tomate, cucurbitáceas y chile (Albert, 2005).

Los riesgos en el uso de plaguicidas en México y en muchos otros países es su invisibilidad, pues aunque se sabe que son dañinos para la salud y el ambiente, la atención que se presta a este problema es casi nula. Al final de la década de los 80', la Organización Mundial de la Salud estimó que 750 mil personas en el mundo sufrieron alguna enfermedad originada por pesticidas, y que de éstas, 14 mil murieron. Algunos estudios muestran que durante 1997, en México se notificaron 4,853 casos de intoxicación aguda por plaguicidas, causados principalmente por sustancias conocidas como *organofosforados* y *carbamatos*, que producen la inhibición de colinesterasa, una enzima vital para el organismo (Sánchez y Betanzos, 2006) Entre muchos otros casos, un estudio realizado en Veracruz por Waliszewski et al.(1996), citado por Torres y Capote (2004), demostró que en jóvenes menores de 20 años de edad los niveles de contaminación con DDT eran altísimos, encontrándose entre 9 y 20 ppm.

Sin embargo, hoy en día, el control de las enfermedades en los cultivos por métodos químicos continúa siendo imprescindible para mantener una agricultura económicamente rentable, de buena calidad y con altos rendimientos en la cosecha, a pesar de que sólo un 0.1 % de la cantidad de plaguicidas aplicado llega a la plaga, mientras que el restante circula por el medio ambiente (Torres y Capote, 2004).

2.5 Actividad fungicida e influencia del quitosán en la estimulación del crecimiento de las plantas

El quitosán, es un polisacárido que se obtiene de la quitina parcialmente desacetilada y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (Rodríguez-Pedroso et al. 2009). Su actividad fungicida se ha estudiado tanto in vitro como in vivo (Yu et al. 2007) y se ha demostrado que inhibe el desarrollo de una gran cantidad de especies de hongos, siendo menos efectivo con aquellas que presentan quitosán en sus paredes celulares (Roller y Covill, 1999), ya que éstos son menos sensibles a la aplicación de dosis razonables de quitosán debido a que la presencia natural de quitosán en sus paredes celulares no le genera efectos adversos.

Algunos estudios han revelado que para lograr una mayor efectividad fungicida del quitosán se debe encontrar la dosis adecuada para cada

patógeno, ya que existe una alta correlación entre la concentración de quitosán aplicada y la inhibición fúngica, además la sensibilidad de los hongos patógenos hacia el quitosán puede cambiar en los diferentes estadios de su desarrollo, como lo reportado por Liu et al. (2007), quienes demostraron que el quitosán es mejor inhibidor de la germinación de *Penicillium expansum* que la de *Botrytis cinerea*, contrariamente a lo que se observó en el crecimiento micelial de estas especies. De manera similar, un estudio reciente ha mostrado que el quitosán es más efectivo sobre los conidios que sobre las hifas de algunos hongos fitopatógenos (Palma-Guerrero et al. 2008).

La actividad fungicida del quitosán se ha asociado a su carácter catiónico, a su actividad como inhibidor de la síntesis de algunas enzimas presentes en los hongos y a la ocurrencia de alteraciones citológicas, como se ha reportado en el caso de *B. cinerea*, donde se ha observado al microscopio la aparición de vesículas y/o células vacías carentes de citoplasma, después del tratamiento con soluciones acuosas al 1.75% de quitosán (Barka, et al. 2004).

En términos generales, la aplicación de quitosán ha mostrado efectos positivos en el crecimiento de las plantas, tanto en la estimulación de la germinación de semillas como en el crecimiento de partes de la planta tales como; raíces, retoños y hojas. En algunos casos, se ha observado que la estimulación de la germinación de semillas por tratamiento con quitosán ha logrado elevar el porcentaje de germinación. Los efectos beneficiosos del quitosán se han observado en plantas florales y en plantas de cosecha. Se han aplicado soluciones muy diluidas en raíces de orquídeas, en forma de aerosol, y éstas han mostrado una estimulación en su crecimiento y renovación en la producción de flores (Chandrkrachang, 2002 y Bhaskara et al. 1999; citados por Lárez-Velázquez, 2008).

En relación al crecimiento de tejidos vegetales, se ha demostrado que el origen del quitosán es un aspecto importante, ya que el quitosán procedente de hongos necesita de dosis menores para la inducción de la diferenciación de tejidos de plantas de orquídeas que los oligómeros procedentes de caparzones de camarones (Nge et al. 2006).

2.6 Importancia del control biológico

En los últimos años se ha ido incrementando a escala internacional una producción consiente de alimentos utilizando los recursos del propio agroecosistema, para garantizar de esta manera una alimentación de mayor

calidad biológica y una mayor protección de los recursos naturales, esto implica la disminución en el uso de agroquímicos para el control de enfermedades (Terry, 2005), lo cual puede lograrse en gran medida mediante prácticas culturales como la rotación de cultivos y la modificación de fechas de siembra, la adición de residuos orgánicos y el control biológico, entre otros (Virgen, 2000). Este último es una de las principales técnicas usadas como alternativa al uso exclusivo de productos químicos y consiste en la utilización de enemigos naturales como hongos, bacterias, virus o insectos que reduzcan la población de plagas y enfermedades para mantenerlas por debajo de los niveles que causen daño económico a los cultivos (Terry, 2005; Guédez et al. 2008).

El control biológico es un fenómeno natural que se da en todos los cultivos y es la principal razón de porqué los cultivos no son enteramente destruidos durante su desarrollo, y aunque, generalmente las poblaciones silvestres pueden enfrentar sin problemas a sus patógenos potenciales, los cultivos genéticamente uniformes que cubren áreas extensas, pueden sufrir graves daños por fitopatógenos que reducen la productividad (García y Lozoya, 2004). Entre algunos de los microorganismos más utilizados en el control biológico están algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. y algunos hongos como *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. y *Chaetomium* spp., los cuales han demostrado controlar de alguna manera el ataque de hongos causantes de enfermedades como *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp. y *Pythium* spp., entre otros (Samaniego y Gámez, 2000).

Otros microorganismos, que tienen efectos positivos sobre las plantas, son los hongos formadores de micorrizas arbusculares, los cuales en su relación simbiótica actúan como mediadores del intercambio de nutrientes, permitiéndole a las plantas explotar mejor los recursos de su entorno (Azcón, 2000). También los productos bioactivos pasan a desempeñar un papel importante en la agricultura; así algunos productos derivados del vermicompost se han utilizado como bioestimulantes ecológicos con efectos positivos en diferentes cultivos de interés económico (Terry, 2005). Particularmente, los brasinoesteroides son un grupo de hormonas vegetales con un marcado efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Núñez y Robaina, 2000). Una combinación adecuada de microorganismos benéficos y productos bioactivos puede contribuir al propósito de mejorar la calidad biológica de las cosechas agrícolas, especialmente en las hortalizas que en los últimos años han alcanzado una elevada demanda en el mercado nacional e internacional (Terry, 2005).

El control biológico tiene unas propiedades y requerimientos muy distintos a los métodos de control tradicionales, y debe ser puesto en práctica integrándolo con los métodos y con las estrategias de producción actualmente existentes. Debido a que las poblaciones nativas de microorganismos participan de manera importante en la fluctuación de la población de un fitopatógeno, al utilizar agentes de CB, es necesario entender los sistemas de cultivo, la epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas y la interacción entre todas ellas, para de esta manera tener una mayor efectividad en el control (Adams, 1990; Deacon, 1991).

En los últimos años se han lanzado al mercado un gran número de agentes de biocontrol. En 1996 existían más de 40 productos de biocontrol, de los que 12 se utilizan actualmente en USA para controlar enfermedades fúngicas. En Europa han aumentado moderadamente la cantidad de agentes de biocontrol disponibles (parasitoides, depredadores y entomopatógenos) que actualmente superan las 125 especies diferentes; dichos agentes son empleados especialmente para el control de plagas en cultivos bajo invernadero con resultados muy satisfactorios.

Actualmente, existen varias empresas que comercializan enemigos naturales utilizables en programas de control biológico. Fundamentalmente se sitúan en Holanda, Francia, Italia, Gran Bretaña y Rusia. En 1970 solo existían 400 Ha en todo el mundo sometidas a control biológico, mientras que en 1988 se estima que ya existían 12000 ha. La mayor parte de esta superficie es cultivo protegido, ya que el control biológico es mucho más eficaz en ambientes confinados al estar el agente de biocontrol en un entorno cerrado y en condiciones ambientales más favorables para su desarrollo (Rubio y Fereres, 1995).

2.7 *Trichoderma* spp. y su papel en el control biológico

El género *Trichoderma* spp. fue descrito por primera vez en 1791 en Alemania, posteriormente, en 1927, Gilman y Abbott reconocieron cuatro especies en base al color, forma de sus conidios y en la apariencia de la colonia (Mohiddin et al. 2010). Su potencial como agente de biocontrol (BCA) fue sugerido por primera vez por Weidling en 1932, quien demostró su actividad micoparasítica hacia patógenos como *R. solani*. Desde entonces se han realizado numerosas investigaciones, convirtiéndose en el hongo antagonista más estudiado (Humeres, 2004., Mohiddin et al. 2010). Su capacidad como

BCA se debe a su elevada capacidad reproductiva, habilidad de sobrevivir bajo condiciones desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad de modificar la rizósfera, fuerte agresividad frente a hongos fitopatógenos, y elevada eficiencia en la promoción del crecimiento de las plantas y estimulación de los mecanismos de defensa de las mismas. Estas propiedades hacen de *Trichoderma* spp. un género muy ubicuo presente en la mayoría de los hábitats, con altas densidades de población por lo que son los hongos antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas causadas por hongos, además de su inocuidad, su facilidad para ser aisladas y cultivadas y su crecimiento rápido en un gran número de sustratos (Infante et al. 2009).

La utilización de *Trichoderma* spp. como antagonista está ampliamente referenciada, entre las cepas más importantes actualmente reconocidas y utilizadas como BCAs se encuentran las cepas pertenecientes a las especies *T. virens*, *T. vride* y sobre todo a *T. harzianum*. Estas cepas muestran una amplia gama de hospedantes, entre los que están algunos de los hongos fitopatógenos de interés comercial, tales como los pertenecientes a los géneros *Colletotrichum* (Cubillos-Hinojosa et al. 2009), *Fusarium* spp., *Botrytis* spp., *Rhizoctonia* spp. *Sclerotium* spp., *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp. (Infante, 2009; Samuels, 1996), *Verticillium* spp., *Botrytis* spp. (Benítez et al. 2004), *Thelaviopsis* spp., (Samuels, 1996) *Armillaria* spp., *Chondrostereum* spp., *Dematophora* spp., *Diaporthe* spp., *Endothia* spp., *Fulvia* spp., *Fusicladium* spp. , *Helminthosporium* spp., *Macrophomina* spp., *Monilia* spp., *Nectria* spp., *Phoma* spp., *Plasmopara* spp., *Pseudoperonospora*, spp. *Rhizopus* spp., *Venturia* spp., y *Verticillium* spp. (Monte y Llobell, 2003). Principalmente contra *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Botrytis* spp. se han obtenido excelentes resultados de control biológico y control integrado en cultivos de algodón, papa y tabaco (Benítez et al. 2004).

Las cepas de *Trichoderma* spp. pueden ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente, compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa o produciendo antibióticos. También pueden realizar ese biocontrol directamente, mediante micoparasitismo. Estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada y su importancia en los procesos de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma* spp., del hongo al que antagoniza, del tipo de cultivo y de las condiciones ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura o la concentración de hierro.

La activación de cada uno de los mecanismos implica la producción de metabolitos y compuestos específicos tales como factores de crecimiento de plantas, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos y permeasas de carbono y nitrógeno. Estos metabolitos pueden sobreexpresarse o combinarse con cepas de biocontrol apropiadas, a fin de obtener nuevas formulaciones que puedan ser más eficaces en el control de enfermedades de plantas y en la protección de frutos post-cosecha (Benítez et al. 2004).

Trichoderma spp. también se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la semilla y del sustrato contra los hongos involucrados en el "damping-off" en tomate, tabaco y chile; además es compatible con biofertilizantes, bioestimulantes y plaguicidas (Stefanova, 1997). La especie *T. harzianum* es efectiva contra *R. solani* y *S. rolfsii* en cacahuete, en tomate (Well et al. 1972), en frijol y en pepino bajo condiciones de campo (Elad et al. 1980). En viveros comerciales se aplica en plántulas de pepino y chile incorporándolo al sustrato logrando reducir los problemas por "secadera" hasta en un 67%, además de mejorar la calidad de la planta (Inbar et al. 1994). *T. hamatum* tiene potencial como agente de biocontrol, al ser incorporado en suelo, puesto que ataca a *Pythium* spp. y *R. solani*, hongos que causan "secadera" de plántulas (Chet et al. 1981), además de prevenir problemas por "damping-off" en algodón, rábano y caña de azúcar bajo condiciones de invernadero (Lewis y Papavizas, 1985). Por otro lado, ensayos revelan que al aplicar *T. koningii* en la semilla, se ha logrado incrementar los rendimientos del trigo hasta un 65%. Así también se ha determinado que es factible la inoculación conjunta de micorrizas arbusculares y *T. aeroviride*, dado que se presenta un doble efecto antagónico contra los fitopatógenos, no se afecta el desarrollo de la colonización micorrízica de la raíz por *Glomus intradices* y se tiene un efecto sinérgico en el desarrollo de *Citrus reshni*. (Camprubí et al. 1995).

En el control de enfermedades aéreas se ha demostrado que *Trichoderma* spp. es efectivo, ya que ha logrado reducir hasta un 84% el daño por *Botrytis cinerea* en tomate (O'Neil et al. 1996). Actualmente se tienen cepas de *Trichoderma* spp. resistentes a los fungicidas comúnmente utilizados, entre ellos, benomil, metalaxil y propiconazol; de esta forma, se pueden utilizar al mismo tiempo y de manera alterna en un control integrado de fitopatógenos (Bettiol, 1996; Elad, 2000).

2.8 Control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* usando *Trichoderma* spp.

Las enfermedades causadas por patógenos nativos del suelo como *R. solani* y *S. rolfsii*, han sido objeto de varias investigaciones y está bien documentado que *Trichoderma* spp. es un efectivo BCAs contra éstas dos especies de hongos fitopatógenos. Se ha observado que existe un biocontrol de *R. solani* y *Pythium* spp. mediante el recubrimiento de semilla y radícula con *Trichoderma hamatum* (Harman et al. 1980) y que la aplicación de granos colonizados por *T. harzianum* en suelos infestados por *R. solani* y *S. rolfsii* reduce la incidencia de enfermedades causadas por estos patógenos en frijol (Elad et al. 1980).

Hadar et al. (1979) demostró que al aplicar pequeñas dosis no efectivas (1-2 µg/kg) de Pentacloronitrobenzeno (PCNB) en suelo adicionado con una preparación de *Trichoderma* spp. (2g/kg), la incidencia de enfermedades causadas por *R. solani* en berenjena se redujeron de un 13 a un 40%, mientras que al aplicar únicamente *Trichoderma* spp., la incidencia de la enfermedad se redujo solo un 26%. Por su parte Elad et al. (1982) demostró que al tratar plantas de tomate con *T. harzianum* en suelo fumigado con bromuro de metilo se reduce la incidencia de la enfermedad causada por *R. solani* y *S. rolfsii* hasta un 93%.

También se ha demostrado que la combinación de un tratamientos térmicos con *T. harzianum* en dosis subletales bajo condiciones de invernadero, incrementa el control de enfermedades causadas por *S. rolfsii* en frijoles de un 90 a 100% (Elad et al. 1980). Por su parte Lewis y Papavizas (1980) encontraron que el manejo integrado mediante la prevención de colonización de patógenos en residuos de plantas y la combinación de *Trichoderma* spp. con el arado a una profundidad de 20-25 cm reduce la putrefacción de la raíz causada por *R. solani* en frijol. Además un estudio realizado por Cook y Baker (1983) en frijol reveló que la adición de conidios pregerminados de *T. lignorum* al suelo, reduce la germinación de esclerocios de *R. solani* en la rizósfera y fuera de la misma en un 30% y 28% respectivamente.

2.9 El papel de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de las plantas

Además de la capacidad para controlar enfermedades, otros de los beneficios reportados sobre el uso de *Trichoderma* spp. son; el incremento en el desarrollo y rendimiento de la planta, el incremento del sistema radicular y

tolerancia a la sequía, incremento en la toma de nutrientes con la consecuente eficacia en la utilización de fertilizantes, un incremento en el enverdecimiento de hojas lo que se relaciona probablemente en un aumento en la tasa fotosintética y el incremento en el porcentaje de germinación de semillas (Harman et al. 2008). Algunos de los beneficios anteriores se han asociado al gen de la enrollina, el cual tiene un papel importante ya que estimula la colonización en las raíces y la respuesta de defensa de las plantas (Brotman et al. 2008). *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Cubillos- Hinojosa, et al.2009).

Los análisis celulares, han revelado que la estimulación del crecimiento que se observa en plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. ocurre por un efecto promotor de la división y elongación celular y sugiere que la ruta de señalización de las auxinas es importante para la respuesta de la planta a la inoculación. Los análisis de compuestos secretados por el hongo muestran la identificación de tres compuestos de naturaleza auxínica; el ácido indol-3-acético (AIA), el indol-3-acetaldehído (IAld) y el indol-3-etanol (IEt), los cuales son esenciales en el proceso de desarrollo de la planta (López et al. 2008). Estos compuestos producidos por *T. harzianum* actúan como catalizadores o aceleradores de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular, logrando que las plantas se desarrollen más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con dicho microorganismo (Cubillos- Hinojosa et al. 2009)

Se ha comprobado que la inoculación de *T. harzianum* aporta otros beneficios a las plantas; a través de la descomposición de materia orgánica, libera nutrientes en formas disponibles para la planta y presenta actividad solubilizadora de fosfatos y algunos metales como Zn, Mn, Fe y Cu convirtiéndolos en formas asimilables por la planta por lo cual se utiliza frecuentemente como un organismo biofertilizante en diferentes productos comerciales; promueve el crecimiento y desarrollo de los cultivos produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal.

Como consecuencia de interacciones entre *Trichoderma* spp. y la planta, muchos patógenos de las raíces y partes superficiales de las plantas causan menos enfermedad cuando las raíces son colonizadas por *Trichoderma* spp., además de que a menudo son más robustas. Aún en ausencia de un patógeno o enfermedad, las plantas frecuentemente tienen raíces más largas y más altos niveles de productividad en presencia de *Trichoderma* spp. (Harman et al.2004).

2.10 *Trichoderma* spp. en el suelo

Este género *Trichoderma* spp. frecuentemente es aislado de suelo, se encuentra ampliamente distribuido y está presente en prácticamente cualquier tipo de suelo, puede colonizar entre otros, madera y plantas herbáceas, existiendo una marcada preferencia por aquellos sustratos con altos contenidos en restos vegetales y madera en descomposición. Se caracteriza por su rápido crecimiento y su abundante esporulación debido a sus bajos requerimientos nutritivos y a la resistencia frente a condiciones adversas del medio (Cubillos-Hinojosa et al. 2009).

El movimiento de las especies de *Trichoderma* spp. en la rizósfera, es por medio de sus hifas que están en continuo crecimiento, que exploran y penetran la corteza de las raíces, colonizando los tejidos de las plantas (Yedidia et al. 1999; Vinale et al. 2008). Esto favorece un nicho nutricional para *Trichoderma* spp. y una simbiosis con la planta al protegerla de las enfermedades. *Trichoderma* spp. prolifera como conidia asexual que se mantiene en masas de esporas húmedas y sobrevive como segmentos vegetativos de micelio, llamadas clamidiosporas, normalmente incrustadas en materia orgánica. Las esporas son diseminadas y transportadas en restos orgánicos, en suelo o agua y no pueden ser transportadas por aire. (Samuels y Rehner, 1993). La propagación de *Trichoderma* spp. aumenta en suelos húmedos con niveles bajos de pH, por lo que la acidificación del mismo podría incrementar la población de *Trichoderma* spp. (Chet y Baker, 1980; Ruppl et al.1983).

Las especies de *Trichoderma* spp. producen ácidos orgánicos, como el ácido glucónico, ácido cítricos y fumárico; estos ácidos disminuyen el pH del suelo y permiten la solubilización de fosfatos, micronutrientes y minerales cationes del tipo de hierro, magnesio y manganeso, útiles para los metabolitos de la planta (Benítez et al. 2004; Vinale et al. 2008).

Se ha demostrado que los conidios de *T. harzianum* agregados al suelo sin aplicar nutrientes, pueden sobrevivir de 110 a 130 días, dependiendo del aislamiento (Papavizas et al. 1982), otros autores reportan que el número de conidios inoculados en el suelo inicialmente disminuyen su número y posteriormente se estabiliza durante un periodo de 2 años, una décima parte del número original de conidios inoculados (Davet, 1979).

2.11 Técnicas de aplicación de *Trichoderma* spp.

Según Rodríguez (2002) existen cuatro técnicas diferentes para la aplicación de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol y cada una puede ser efectiva en el campo, estas técnicas incluyen:

1. Diseminación, en este caso el preparado de *Trichoderma* spp. se disemina sobre la superficie y se incorpora dentro del suelo infestado.
2. En surcos, la preparación se coloca dentro del surco a plantar.
3. Zona radicular, para esto se mezcla el suelo del campo con *Trichoderma* spp. antes del trasplante.
4. Cubriendo la semilla de esporas de *Trichoderma* spp. usando un adhesivo.

Chet y Baker (1980) descubrieron que la mínima cantidad efectiva de *Trichoderma* spp. es de 106 unidades formadoras de colonia (ufc)/g de suelo, además de que la temperatura óptima para el crecimiento de los aislamientos es de alrededor de 20 °C, ya que a temperaturas menores a 18 °C el crecimiento es muy lento.

2.12 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. para el control biológico

Se han descrito diferentes mecanismos de acción por parte de *Trichoderma* spp. que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno. Además se conoce que *Trichoderma* spp. presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que elicitán o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos, como es la activación de compuestos relacionados con la resistencia de la planta (Inducción de Resistencia), la destoxificación de toxinas excretadas por patógenos, la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección y la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Además, tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Infante et al. 2009).

2.12.1 Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a éstos, que normalmente actúan a muy bajas concentraciones. *T. harzianum* genera antibióticos volátiles y no volátiles, así como enzimas capaces de afectar el crecimiento de las células de sus hospederos (Rubio y Fereres, 1995).

Tanto la cantidad como la concentración de metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. son determinantes, ya que existe una correlación positiva entre la cantidad de enzimas producidas y el porcentaje de micoparasitismo y la actividad antibiótica; y por consiguiente la reducción de la enfermedad (Madi et al. 1997).

La antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico, por lo que la máxima eficacia en el control de fitopatógenos se puede lograr con un sistema enzimático completo (Lorito et al. 1990), inclusive un control integral, donde intervengan diferentes modos de acción como competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis, lo que favorece el control por un lado y disminuye la posibilidad de que surja resistencia en el patógeno al antagonista por el otro (Vero y Mondino, 1999).

2.12.1.1 Antibiosis por enzimas hidrolíticas.

El sistema enzimático mediante el cual, *Trichoderma* spp. compete con los patógenos, incluye, entre otras, la secreción de quitinasas, quitobiosidasas endoquitinasas, exoquitinasas, DNasas, α -amilasas, celulasas, lipasas, manasas, xilasas (Lorito et al. 1993), glucanasas (Fravel, 1988) y actividad ureasa (Lorito et al. 1993). Las quitinasas son proteínas abundantes encontradas en gran variedad de semillas y hay una fuerte evidencia de que son proteínas de defensa con actividad antifúngica; las enzimas quitinolíticas de *T. harzianum* en comparación con otras son más efectivas que las de plantas y bacterias contra un rango amplio de patógenos de plantas (Magolles-Clark et al. 1996). Se ha probado la efectividad de endoquitinasas y quitinobiosidasas purificadas de *T. harzianum* sobre varios hongos, los resultados han mostrado que éstas enzimas han inhibido la germinación de esporas y elongación del tubo germinativo de todos los hongos probados cuya pared celular está

compuesta de quitina, además de que el grado de inhibición ha sido proporcional al contenido de quitina de la pared celular, siendo éste mayor como resultado de la acción sinérgica de varias enzimas (Lorito et al. 1998).

También se ha demostrado que las endoquitinasas (Ech42) causan hidrólisis en las paredes de *B. cinerea*, y además inhiben la germinación de conidios y el crecimiento de tubos germinativos de varios hongos (Carsiolo et al. 1999). Debido a que las quitinasas son capaces de hidrolizar la pared celular de hongos que contienen quitina, se piensa que éstas, participan de manera importante en la respuesta de las plantas. Una de las estrategias para incrementar la tolerancia de las plantas hacia patógenos lo constituye la sobreexpresión de proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas (Schickler y Chet, 1997).

El sistema quitinolítico del *T. harzianum* está integrado por dos acetilglucosaminidasas (CHIT 102 y 74) y cuatro endoquitinasas (CHIT 52, 42, 33 y 31) el cual está finamente regulado y sincronizado, ya que el hospedero afecta su regulación específica durante la interacción con el patógeno y define cuál de las 6 enzimas se expresa primero y así sucesivamente todas las demás (Haram et al. 1995 y 1996; Woo et al. 1999). La inducción de las enzimas quitinolíticas en *Trichoderma* spp. es la fase inicial de reconocimiento, siendo la primera etapa en la cascada de eventos en la actividad parasítica del antagonista (Inbar y Chet, 1995).

Las enzimas 1,3 y 1,6-glucanolíticas son producidas por diferentes cepas de *Trichoderma* spp., las cuales dependen de las diferentes fuentes de carbono al que esta sometido este BCA (Lorito et al.1994). *T. harzianum* IM1206040 secreta 1,3-glucanasas en presencia de diferentes polímeros de glucosa y paredes celulares de hongos y los niveles secretados son proporcionales a la cantidad de inductores (glucosa y paredes celulares) o laminarina (un 1,3-glucano soluble).

Lorito et al. (1994), reportan efectos inhibitorios de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas de *T. harzianum* sobre la germinación de esporas de *B. cinerea* conforme se incrementa la concentración enzimática; ellos encontraron que individualmente se necesita de 200 a 600 μ g/mL de éstas enzimas para inhibir completamente al patógeno que se manifiesta un efecto sinérgico en la mezcla de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas. Hadar et al. (1979) reportan mayor producción de glucanasas que de quitinasas por *T. harzianum*, y que a

mayor cantidad del hongo adicionado al suelo se manifiesta una reducción de *R. solani* y la enfermedad en condiciones de invernadero.

La capacidad de producir enzimas hidrolíticas por las especies de *Trichoderma* spp. se incrementa en presencia del patógeno. Los aislados de *Trichoderma* spp. hidrolizan la gelatina, caseína, leche, carboximetilcelulosa y la quitina, lo que indica la presencia de enzimas hidrolíticas de carácter proteolítico, celulolítico y quitinolítico (Stefanova y Sandoval, 1995). El método basado en la actividad de enzimas hidrolíticas que se utiliza en *Trichoderma* spp. no es garantía, ya que a veces no hay correlación entre la actividad in vitro e in vivo (Knudsen et al. 1997), y generalmente la infección por patógenos en las plantas se reduce cuando se aplica primero al antagonista y después al patógeno (Postmaster et al. 1997).

2.12.1.2 Antibiosis por metabolitos secundarios.

Muchas cepas de *Trichoderma* spp. producen metabolitos secundarios, los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos inclusive sin hacer contacto físico. (Martínez et al. 1994) Los metabolitos secundarios con capacidad antibiótica reportados son el 6-pentyl- α -pyrona (6PAP) (Dumas et al.; 1996, Pavlovicova, 1998) y varias toxinas como la pacibasina, trichodermina, gliotoxina, trichodermona, viridiol (Fravel, 1988), suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos, trichorziamina (Martínez et al. 1994), viridina (Wilhite y Straney, 1996) y furanona (Ordentlich et al. 1992). La producción de estos metabolitos por parte de *Trichoderma* spp. presenta determinada especificidad.

Un ejemplo de ello son las cepas *Trichoderma* spp. "Q" que producen gliotoxinas que son efectivas frente a *R. solani*, pero no frente a *Pythium ultimum*; mientras que otro grupo de cepas "P" que excretan gliovirina, han mostrado resultados opuestos (Lorito et al. 1990). Se ha demostrado que la presencia de algunos de éstos metabolitos con actividad antifúngica, reducen el crecimiento micelial de algunos fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae* y *R. solani* en medios de cultivo envenenado, además de causar a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Stefanova, 1999).

La gliotoxina y la viridina, pueden producirse en un periodo muy corto de 16 horas durante su crecimiento (Wilhite y Straney, 1996); la pacibasina y trichodermina participan en la reducción del inóculo de algunos fitopatógenos, la trichorziamina, es un metabolito capaz de producir cambios en el patrón morfogenético del micelio de *S. rolsii* y del propio *T. harzianum*, lo cual se considera como la ausencia de inmunidad por parte de éste último (Correa et al. 1995).

Entre los metabolitos que produce *Trichoderma* spp., el alquil pirona 6PAP es de los más conocidos y estudiados debido a su potente actividad antifúngica (Cutler y Hill, 1994), que es capaz de inhibir in vitro a muchos hongos, entre ellos a *R. solani* (Fravel, 1988), la toxicidad de este compuesto esta relacionada con su habilidad hidrofóbica, la cual forma una capa hidrorrepelente sobre la pared celular, que impide la absorción de agua por la célula del hongo (Scarselletti y Faull, 1994). La habilidad de las cepas de *Trichoderma* spp. para producir el alquil pirona 6PAP es muy variada entre las diferentes especies y aún entre cepas de la misma especie; además de que una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos a diferentes estados de desarrollo según las condiciones de cultivo (Cooney y Lauren, 1999).

El 6PAP producido por *T. harzianum* (IMI 288012) con dosis de 0.3 mg/ml en el medio de cultivo en condiciones In vitro puede reducir hasta el 69.6% el crecimiento de *R. solani* y hasta un 31.7% del crecimiento de *Fusarium oxysporum* después de 2 días. A dosis de 0.45 mg/ml puede inhibir completamente la germinación de esporas; sin embargo, cuando se lavan las esporas éstas pueden recuperar el porcentaje de germinación hasta un 100%, por lo que se pierde el efecto inhibitorio, esto indica que tiene actividad fungistática y no fungicida (Scarselletti y Faull, 1994), en este sentido, los trabajos realizados por Dumas et al.(1996) revelan que a concentraciones de 500 ppm el metabolito 6PAP tiene acción fungistática, mientras que a con contracciones de 1000 ppm, su actividad es fungicida.

Tanto la cantidad como la concentración de metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. son determinantes ya que existe una correlación positiva entre la cantidad de enzimas, el porcentaje de micoparasitismo y la actividad antibiótica; por consiguiente la reducción de la enfermedad (Madi et al.1997), así también los trabajos relacionados con el modo de acción de *Trichoderma* spp. en el CB de fitopatógenos, Cooney et al. (1997) indican que es necesario cuantificar la producción local y la concentración de los metabolitos del antagonico en la interface *Trichoderma*-Patógeno.

Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático que debilita al patógeno que lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un “hiperparasitismo” de origen enzimático, además se ha observado que los aislamientos de compuestos volátiles más activos poseen un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista (Martínez et al. 1994).

Cuadro 1. Antibióticos producidos por especies de *Trichoderma* spp. (Mohiddin et al. 2010)

Antibiótico	Referencia
Tricodermina	Gotfredson y Vangedal (1965)
Tricoviridina	Yamano et al. (1970)
Tricosetina	Marfori et al. (2002)
Gliotoxina, Tricodermina. Viridina	Haggag y Mohamed (2002)
Quitinasa	Elad et al. (1982)
Proteasa	Elad et al. (2000)
Quitobiasa	Ulhao y Peberdy (1993)
Ácido sesquiterpeno heptálico	Ithon et al. (1980)
Proteína a-glucosidasa	Shanmugam et al. (2001)
Dermadina	Pyke y Dietz (1966)
b-1-3- glucanasa	Perez et al. (2001)
Alameticina, Paracelsina, Tricotoxina	Lumdsen et al. (1991)
Ácido Heptelídico	Howell et al. (1993)
Quitina 1-4-b-quitobiosidasa n-acetil-1, b-D glucosaminasa, Endoquitinasa	Harman et al. (1993)
6-n-pentil-2H-pirona	Claydon et al. (1987)
Harzinolidida, Furanona	Claydon et al. (1991)
Tricorzianinas, Tricoviridina, Ácido Propionico, Ácido Acrílico	Baldwin et al. (1981)

2.12.2 Parasitismo

El proceso de micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado y es un proceso complejo. Se conocen cuatro etapas que están involucradas en el mismo (Carsiolo, 1999), el desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, así como de la acción necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales.

Crecimiento quimiotrófico: El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico. En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* spp. puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico (Chet e Ibar, 1994).

Reconocimiento: Las cepas de *Trichoderma* spp. son efectivas contra patógenos específicos, esta especificidad indica que el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* spp. y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagonista. El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos, éste paso provee las bases para la interacción específica y es el detonante de una cascada de eventos que eventualmente se dirigen hacia la destrucción del hospedero (Inbar y Chet, 1997).

Las lectinas participan en el reconocimiento y especificidad del ataque al hospedero por parte del agente antagónico y en la interacción hospedero-micoparásito (Goldman et al. 1994), su producción se ha investigado en *R. solani* y *S. rolfisii*, al respecto se han encontrado evidencias directas, de que éstos compuestos están involucrados en el micoparasitismo (Pérez, 2004; Chet, 1994).

Adhesión y enrollamiento: Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* spp. se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios (Chet e Ibar, 1994), éstas penetran tanto en las estructuras de supervivencia como esclerocios o hifas en estado de crecimiento, se enrollan alrededor del hospedador y en determinados puntos penetran en él atravesando la pared y membrana celulares, en otros casos el micoparásito se enrolla alrededor del hospedador y produce su muerte sin haber evidencia de que agujereé la pared celular (Rubio, 1995). Éste mecanismo está mediado por procesos enzimáticos, una vez que reconoce al organismo patógeno y se adhiere a éste, cuya pared celular se encuentra abierta, *Trichoderma* spp. inicia la producción y transferencia de enzimas (Chet e Ibar, 1994). La adherencia de las hifas de *Trichoderma* spp. ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno (Elad y Chet, 1983).

Actividad lítica: La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Carsolio, 1999). En esta etapa ocurre

la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram et al.1996).

Gracias a su particular actividad metabólica, *Trichoderma* spp. puede parasitar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos (Sandoval y López, 2002), excretando muchos metabolitos o enzimas que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma* spp., que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatígeno (Eveleigh et al. 1986), el micoparasitismo finalmente termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante y el citoplasma restante está principalmente rodeando principalmente a las hifas invasoras, mostrando síntomas de disgregación, lo que disminuye la actividad patogénica (Adams, 1990).

En ésta etapa es necesario que los micoparásitos estén en contacto o muy próximos al huésped (*Trichoderma* spp.) para la inducir la producción de enzimas líticas y destruir la pared celular, pero se piensa que no sean útiles para patógenos de crecimiento rápido o para los que pueden evadir el parasitismo creciendo para otra parte o hacia espacios donde el hongo no puede llegar. Sin embargo se pueden usar contra esporas, esclerocios o hifas creciendo sobre tejidos muertos del huésped donde están en grandes cantidades por algún tiempo (Rubio, 1995).

2.12.3 Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características de *Trichoderma* spp. como plasticidad ecológica y la velocidad de crecimiento y desarrollo, además de factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad, entre otros (Ahmad y Baker, 1987).

Trichoderma spp. está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los

que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que puede producir, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Pérez, 2004). La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales, azúcares, polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas (Stefanova, 1999) y algunos microelementos, entre otros.

La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de microorganismos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso, la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Infante, 2009).

2.12.4 Resistencia Sistémica Inducida

Consiste en la inducción del sistema de defensa que da resistencia al hospedador frente a patógenos por la interacción con un microorganismo no patógeno, el agente de biocontrol, el cual estimula previamente a la planta (Estrada, 2003; Xue et al. 1998). Una vez puesto en marcha, el mecanismo de resistencia es operativo ante el ataque de un patógeno, ya que cuando se induce la resistencia, la planta expresa una serie de genes que confieren resistencia como 1,3- β -glucanasas, fitoalexinas, genes relacionados con el refuerzo de la pared celular como peroxidasas, la deposición de lignina, callosa, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas relacionadas con patogénesis (Xue et al. 1998) y enzimas como fenil-alanina monio-liasas y Chalcone-sintetasas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas, quitinasas y glucanasas (Benítez et al. 2004). En el sistema de defensa que posee la planta, también está involucrado el ácido jasmónico, el cual produce una cascada de proteínas antifúngicas como quitinasas, glucanasas y thaumatinas, enzimas oxidantes tales como peroxidasas, polifenol oxidasas y lipoxigenasas (Harman et al. 2004), y hormonas como el etileno relacionadas con la defensa por parte de las plantas (Infante, 2009). Este concepto es similar al concepto de vacuna en animales, aunque los mecanismos de defensa sean completamente diferentes. El agente de biocontrol debe ser filogenéticamente próximo al patógeno para confundir a los sistemas de defensa, aunque no necesariamente (Xue et al. 1998).

Al inducir la formación de enzimas por parte de la planta, *Trichoderma* spp. induce la lignificación de las paredes celulares próximas al lugar desinfección del patógeno, limitando, de esta manera, su dispersión a lo que se le llama resistencia localizada. Este aumento de actividad de enzimas como quitinasas y peroxidasas se da en zonas distantes de la raíz y es lo que denota una resistencia inducida.

La reacción biológica por parte de la planta a la presencia de *Trichoderma* spp., promueve el crecimiento de la planta, el sistema radicular y disponibilidad de nutrientes; creando una zona favorable para el biocontrol de patógenos e incrementando el antagonismo (Yadidia et al. 2003; Harman et al. 2004).

2.13 Morfología y caracteres culturales de *Trichoderma harzianum*

El género *Trichoderma* spp. comprende un conjunto de especies sin fase sexual evidente, presentan micelio septado, con conidias generalmente ovaladas menores de 5 μ m de largo y ancho, de tipo unicelular, de color verde oscuro profundo cercano al color gris pasando por verde y verde amarillo, de rápido desarrollo en medios sintéticos y con tendencia a acumularse dentro de masas pulvinadas, presenta conidióforo hialino no verticilado y muy ramificado, fiálides singulares o en grupos. Las clamidosporas tienden a ser desde globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15 μ m de diámetro.

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* spp. en su inicio presentan un color blanco, que se toman a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa, en algunos cultivos se presenta un olor parecido al coco (Samuels, 1996). El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados que se parecen a un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregulares de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies.

Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del periodo vegetativo de las plantas. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, los conidios se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio.

La mayoría de las especies de *Trichoderma* spp. presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo. Las clamidosporas recién formadas presentan una germinación de más del 75%, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30°C). Las especies de *Trichoderma* spp. producen tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Infante, 2009).

El pH es importante para manipular tanto el crecimiento, como la esporulación y la mayor longevidad que se obtiene en un medio con pH de 6.0 y las esporas permanecen viables las esporas por un período de 45 días en condiciones de almacén. Bajo condiciones de campo para sobrevivir más tiempo requieren de humedad relativa alta para sobrevivir más tiempo (Agosin et al. 1997).

Trichoderma harzianum se encuentra en diferentes hábitats y suelos, la presencia de varias especies difiere entre hábitats y las condiciones ambientales. Se pueden encontrar en el aire, partes aéreas de plantas, pero especialmente en suelos, incluyendo humus forestales (Samuels, 1996) y de madera en descomposición, se reportan densidades menores a 1×10^2 conidios/g de suelo; sin embargo se pueden encontrar hasta 8×10^5 en suelos orgánicos (Jensen y Wolffhechel, 1995).

Su elevada versatilidad metabólica lo capacita para colonizar el medio en que se encuentra, y puede transformar una amplia variedad de materia orgánica mediante la producción de una gran diversidad de enzimas líticas, que le permiten hidrolizar y asimilar distintos tipos de polímeros, entre los que se encuentran: celulosa, hemicelulosa, glucanos, quitina, laminarina, pectina y el almidón (Morera, 2010).

La producción de los metabolitos y biomasa que caracterizan a *T. harzianum* depende de la composición del medio donde se desarrolla, es decir de los nutrientes que encuentre y no tanto de la concentración del inóculo (Tronsmo y Harman, 1992). La presencia de algunos productos químicos pueden influir sobre la población del antagonista, el herbicida metabenzotiazuron afecta el crecimiento de *T. harzianum*, así como en su actividad celolocítica sin embargo es capaz de tolerar fungicidas como bromuro de metilo, captan y maneb (Suárez y Momo, 1995).

2.14 Taxonomía y genética de *Trichoderma harzianum*

Actualmente se tienen alrededor de 75 especies descritas del género *Trichoderma* spp. (Casimiro, 2001). Según Mohiddin et al. (2010), éste género se ubica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino:	Mycetae
División:	Ascomycota
Subdivisión:	Peziziomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>
Especie:	<i>Trichoderma harzianum</i>

La mayoría de las especies de *Trichoderma* spp. producen únicamente esporas asexuales, sin embargo se conoce la etapa sexual de unas pocas cepas perteneciente a los hongos Ascomycetes del género *Hypocrea* spp. y no son considerados para propósitos de biocontrol. Su taxonomía tradicional está basada en las diferencias morfológicas, principalmente en el aparato de esporulación asexual; en la actualidad se están empleando técnicas moleculares para su identificación.

Diferentes cepas poseen distintos números y tamaños de cromosomas y se sabe que en ausencia de meiosis, la plasticidad cromosómica es una norma. La mayoría de las células poseen numerosos núcleos, algunas células vegetativas pueden llegar a tener más de 100. Varios factores genéticos asexuales, como la parasexualidad, mutación y otros procesos contribuyen a la variación de los núcleos en un solo organismo (talo). Se puede encontrar una gran diversidad de genotipos y fenotipos en las cepas silvestres.

Mientras que las cepas silvestres se adaptan con facilidad y pueden ser heterocarióticas (núcleos de distintos genotipos dentro de un mismo organismo), las cepas comerciales usadas para el CB pueden ser o son homocarióticas (núcleos idénticos). Este aspecto en conjunto con el control estricto de la variación a través de la deriva génica, permite que las cepas comerciales no presenten mayor variabilidad (Herrera y Ulloa, 1990).

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a las consecuencias negativas sobre la salud humana y el ambiente ocasionadas por las aplicaciones excesivas de agroquímicos, así como su residualidad y el desarrollo de resistencia a plaguicidas por microorganismos fitopatógenos, se han buscado alternativas, como el uso de agentes biológicos, que puedan ser utilizados en el control de enfermedades. Al evaluar la actividad antibiótica de las especies del género *Trichoderma* spp., se abre la posibilidad de realizar estudios posteriores, con el fin de determinar cuáles cepas o que compuestos activos generados por éstas favorecen el control de enfermedades, que generan pérdidas económicas, no sólo al país, sino a nivel mundial. Algunos estudios, indican que el factor inhibidor en *Trichoderma* spp. depende sobre todo del aislamiento más que de la propia especie, lo que reafirma la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista, además, no todas las cepas son eficientes en todas las condiciones ambientales, y no pueden controlar de igual manera a todas las variantes de los fitopatógenos, o no tienen la misma capacidad como biofertilizantes de contribuir en el desarrollo de las plantas, es por esto que resulta imprescindible el conocimiento de las actividades biocontroladoras de *T. harzianum* en condiciones in vitro e in vivo, en especial cada una de las cepas aisladas de *T. harzianum*, especie que será utilizada en éste trabajo.

4 HIPÓTESIS

Trichoderma harzianum y sus metabolitos secundarios son capaces de inhibir el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, así como contribuir a un mejor desarrollo en plántulas de cucurbitáceas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la capacidad inhibitoria de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en condiciones in vitro e in vivo, así como su actividad promotora en la germinación y desarrollo en cucurbitáceas.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la actividad micoparasítica e inhibitoria in vitro de *T. harzianum* (C1, C3 y CActino) sobre *R. solani* y *S. rolfsii*.
- Determinar el efecto del extracto crudo de *T. harzianum* en el desarrollo de plántulas de la familia cucurbitáceas.
- Evaluar el efecto de la aplicación de porcentajes distintos de fertilizante y composta, y la inoculación de esporas de *T. harzianum* sobre el desarrollo de plantas de pepino.
- Comparar dos métodos de inoculación de *T. harzianum* para el control de la enfermedad causada por *R. solani* en papa en condiciones de invernadero.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Preparación de medios de cultivo

Medio papa dextrosa agar (PDA): para 1 L de medio; se utilizaron 250g de papa en trozos, que se hirvieron en 1 L de H₂O destilada durante 20 min en una olla. El líquido se filtró a través de un embudo usando algodón y se colectó en un matraz, posteriormente el volumen total se llevó a 1 L y se agregaron 20 g de agar y 10 g de dextrosa. Este medio se esterilizó durante 20 min en autoclave a 121°C y 15 libras de presión. Se vació en cajas de petri a una temperatura aproximada de 60°C.

Medio papa dextrosa agar acidificado (PDAA): se preparó de la misma manera que el medio PDA, pero después del esterilizado a una temperatura aproximada de 60°C se acidificó con ácido láctico al 88% (50 gotas/L).

Medio líquido caldo de papa dextrosa (CPD): se preparó de la misma manera que el medio PDA excluyendo el agar. Para obtener el caldo de papa adicionado con quitosán, éste último se agregó después de la esterilización del medio a una temperatura aproximada de 60°C.

Medio envenenado PDA: se obtuvo adicionando extractos de *T. harzianum* al medio PDA a una temperatura aproximada de 60°C en concentraciones 50/50, 10/90 y 1/99 (Extracto/PDA). El agar al medio (20 g) se agregó antes de los extractos.

6.2 EXPERIMENTOS in vitro

6.2.1 Obtención y aislamiento de hongos

Las cepas TC1, TC3, TCT, TCF y TCActino de *T. harzianum* . y *S. rolfsii* utilizadas en este trabajo fueron proporcionados por el laboratorio de fitopatología de la UDG. En el caso de la cepa de *R. Solani* se aisló a partir de plantas de papa con síntomas de la enfermedad,

para ello, se seleccionaron y cortaron trozos de tallo de aproximadamente 5mm² de tejido dañado, cada segmento se lavó con agua corriente y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 45 segundos para su desinfección y posteriormente se enjuagaron en agua destilada estéril tres veces consecutivamente, el exceso de agua se absorbió con toallas de papel estéril. Se sembraron 5 trozos de tejido afectado por cada caja petri en medio PDA acidificado con ácido láctico al 88% (50 gotas/L) (PDAA). Las muestras se incubaron a una temperatura de 24°C. El patógeno fue purificado mediante una resiembra.

6.2.2 Evaluación micoparasítica de *Trichoderma harzianum*

Para las evaluaciones de micoparasitismo sobre los hongos fitopatógenos *S. rolfssii* y *R. solani* se utilizó medio de cultivo PDA con 60 mg de Agry Gent plus 800 (sulfato de gentamicina 20g ingrediente activo/Kg a 60 ppm, Clorhidrato de Oxitetraciclina 60g ingrediente activo/Kg a 180 ppm) y se acidificó con ácido láctico al 88% (50 gotas/L). Ambos fueron agregados a una temperatura aproximada de 60°C después de que el medio fuera esterilizado.

Los experimentos se llevaron a cabo colocando discos de 8mm de diámetro de micelio del patógeno en un extremo de una caja petri y en el otro extremo se colocaron discos de micelio de *T. harzianum*, para cada cepa (TC3, TC1 y TCActino) se realizaron 4 repeticiones y se llevó a cabo el mismo procedimiento para evaluar *S. rolfssii* y *R. solani*, sin embargo ésta última fue sembrada un día antes que *T. harzianum* debido a que su crecimiento es más lento. Las cajas inoculadas se incubaron a 24°C durante 4 días o hasta que se observó una zona de traslape entre el micelio de los hongos.

Posteriormente para determinar el porcentaje de micoparasitismo se tomaron 10 discos de micelio de 8mm de la zona de traslape y se sembraron en medio de cultivo PDAA, considerando el 100% de micoparasitismo si únicamente crecía *T. harzianum*. Se realizaron dos experimentos, uno para *R. solani* y otro para *S. rolfssii*, ambos con los mismos tratamientos (TC1, TC3 y TCActino) con 10 repeticiones que consistieron en colocar 10 discos de micelio (tomados de la zona de traslape) en una placa de petri de 8 cm de diámetro con medio PDAA. Los dos experimentos se condujeron bajo un diseño completamente al azar y los datos obtenidos se analizaron con una prueba de comparación de medias Tukey.

Para corroborar el parasitismo, se colocaron portaobjetos dentro de cajas petri (uno por caja), los cuales se cubrieron con medio PDAA, logrando tener una capa de alrededor de 1 mm de grosor, en un extremo de los portaobjetos se colocó un disco de micelio del patógeno de 5mm de diámetro y en el otro extremo se colocaron las cepas de *T. harzianum*. La zona de trasiape sobre el portaobjetos se tiñó directamente con azul de tripano y se realizaron observaciones al microscopio después de tres días de la siembra para los confrontamientos con *S. rolfsii* y después de cuatro días para *R. solani*.

6.2.3 Obtención de extractos de *Trichoderma harzianum*

Para la obtención de extractos se inocularon 5 discos de micelio de cada cepa de *T. harzianum* (TC1, TC3 y TCActivo) de 8 mm de diámetro en 100 mL de caldo de papa estéril adicionado con sacarosa (10 g/L) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL cubiertos con papel aluminio para evitar degradación de compuestos, posteriormente se colocaron en un agitador horizontal por 4 días a 100 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se filtró cada cultivo líquido con papel filtro Whatman No. 22 (filtrado lento; MILIPORE), éste se colocó sobre un embudo de porcelana unido a un matraz quitasato en donde se colectó el extracto con ayuda de una bomba de vacío para facilitar la filtración. Por matraz se obtuvo aproximadamente 60 mL.

Adicionalmente se obtuvieron extractos agregando quitosán (Biorrend) a tres distintas concentraciones: 1g/100mL, 0.5g/100mL y 0.1g/100mL, mismas que se agregaron junto con los discos de micelio de *T. harzianum* en caldo de papa, utilizando el mismo procedimiento antes señalado.

Todos los materiales utilizados fueron previamente esterilizados y el proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar. Los extractos obtenidos fueron sometidos a pasteurización con el fin de eliminar posibles esporas presentes en el extracto, ésta consistió en un calentamiento a baño maría de 70°C durante 30 min, con el posterior descenso a 4-9 °C.

Con el fin de comprobar la ausencia de esporas de *T. harzianum* en los extractos, se sembraron 10 µL de cada extracto en medio PDAA y se homogeneizaron con una varilla de vidrio estéril. Se realizaron observaciones durante 5 días después de la siembra (incubadas a 24°C) esperando la

ausencia de esporas de *T. harzianum*, así como observaciones directas al microscopio de los extractos obtenidos.

6.2.4 Pruebas de actividad biológica de extractos de *Trichoderma harzianum*

Se realizó un experimento factorial en donde se evaluaron los extractos obtenidos de las tres cepas de *T. harzianum*, cada uno a 3 diferentes concentraciones en medio PDA con extracto (medio envenenado): 1/99, 10/90 y 50/50 en relación extracto/ PDA. Para cada una de las cepas se realizaron 4 repeticiones más un testigo que consiste en PDA sin ningún tipo de extracto adicional.

En los medios de cultivo envenenados se sembraron las cepas de *R. solani* y *S. rolfsi* en cajas de petri de 6 cm de diámetro con discos de micelio de 5mm, después de 48 horas se tomaron las medidas en diámetro (2 medidas promediadas perpendiculares) de las hifas de los patógenos y cada 24 h a partir de la primera medición, hasta que el micelio limitara con las paredes de la caja petri.

Posteriormente se realizaron las pruebas de los extractos adicionados con quitosán a tres distintas concentraciones: 1g/100mL, 0.5g/100mL y 0.1g/100mL, obteniendo 9 extractos distintos, el quitosán se agregó al mismo tiempo que los discos de micelio, y se realizó el mismo procedimiento antes mencionado.

6.3 EXPERIMENTOS in vivo

6.3.1 Metodología para la aplicación de extracto crudo de *T. harzianum* en plántulas de cucurbitáceas

Para la evaluación de la germinación las semillas de sandía, calabaza y melón se sumergieron en extractos crudos de las cepas TC1, TC3, TCF y TCT, cada una de estas fueron crecidas utilizando dos variantes, una corresponde a las crecidas previamente en medio líquido CP en ausencia y otra adicionado con quitosán respectivamente. Las semillas se sumergieron en tubos de ensaye conteniendo 1 mL de cada extracto durante 15 min, posteriormente se sembraron en charolas y se determino el día a emergencia de cada plántula, se

realizaron 4 repeticiones por cada tratamiento, y se incluyo un testigo el cual consistió en sumergir las semillas en agua estéril.

Para la evaluación del desarrollo de las plántulas se sembraron en macetas de 300 g de capacidad con sustrato 40% composta /60% peatmost tanto semillas de melón tipo cantaloupe var. ovation, de sandía var. peacock improved dark green y de calabaza tipo suchinni. Los tratamientos consistieron en la aplicación de extractos crudos de las cepas TC1, TC3, TCT, TCF de *T. harzianum* crecidas previamente con quitosán a razón de 1g/ 100 mL y en ausencia de éste, en donde las cepas se crecieron utilizando discos de micelio (10 discos/ 100mL) dando como resultado 8 tratamientos mas un testigo, al cual no se le aplicó ningún tipo de extracto. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento.

La aplicación de los extractos se llevó a cabo de manera directa en las macetas, agregando cada semana a manera de riego 50 mL de los extractos a cada plántula durante 30 días por separado. Las variables evaluadas fueron: longitud y diámetro de tallos, número de flores, número de hojas y días a floración. Las mediciones se realizaron a los 30 días después del trasplante en el caso de la longitud, diámetro de tallos, número de flores y número de hojas verdaderas. Las mediciones de longitud se hicieron desde la base del tallo hasta la parte inicial del ápice. La medición del diámetro se realizó con un vernier ajustándolo a la base del tallo. Los días a floración fueron tomados cuando se observó la primera flor de cada tratamiento. El experimento se llevó a cabo dentro de un invernadero con una distribución completamente al azar. Se realizó una ANOVA y una prueba de separación de medias DMS para conocer el mejor tratamiento.

6.3.2 Métodos de inoculación de *T. harzianum* en papa para la evaluación del control de la enfermedad causada por *R. solani* en papa

Para evaluar los dos momentos de inoculación de *T. harzianum* en papa se llevaron a cabo dos variantes experimentales, la primera consistió en inocular *T. harzianum* antes de la inoculación de *R. solani*, en la segunda *T. harzianum* se inoculó después de *R. solani* (Figura 1).

Se sembraron previamente cepas de *T. harzianum* (TC1, TC3, TCT y TCF), así como el fitopatógeno *R. solani* en medio PDAA, 5 días después de la siembra, éstos fueron inoculados aplicando discos de micelio de 8mm de

diámetro directamente en suelo al momento de la siembra de las semillas de papa. Para evaluar los dos métodos de inoculación de *T. harzianum* se llevaron a cabo dos variantes experimentales: la primera consistió en inocular *T. harzianum* antes de la inoculación de *R. solani* y en la segunda *T. harzianum* se inoculó después de *R. solani*, tal como se muestra en la figura 1. En cada una de las variantes se evaluaron 5 tratamientos descritos en el cuadro 2, cada uno con 6 repeticiones cada una, los cuales consistieron en la inoculación de 4 cepas de *Trichoderma*: TCT, TCF, TC1 y TC3 y el último tratamiento fue una combinación de todos ellos. En cada maceta se aplicaron 20 discos de micelio de cepas de *T. harzianum* y 20 discos de *R. solani*, en la primera variante, primero se inoculó *T. harzianum* y se cubrió con suelo (2 cm), posteriormente se inoculó *R. solani* y por último se sembró la semilla de papa variedad Friana; en la segunda variante se inoculó *R. solani*, posteriormente se sembraron los tubérculo-semillas de papa y por último se inocularon los discos de micelio de *T. harzianum*. Se incluyeron dos testigos; uno sin la inoculación de *T. harzianum* y otro sin la inoculación de *R. solani*. Después de 20 días de la siembra, todas las plantas se lavaron en agua corriente para poder observar los daños en raíz y tallo. Los resultados cualitativos se obtuvieron en función del daño físico (porcentaje de superficie) observado en la raíz y tallo de la planta considerando la siguiente escala: Planta sana= 0, 1 a 25% de daño=1, 26 a 50% de daño= 2, 51 a 75% de daño=3 y 75 a 100% daño o muerte de la planta=4.

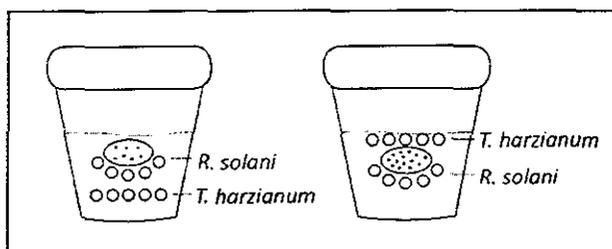


Figura 1. Métodos de aplicación de *T. harzianum* en suelo para la evaluación de la severidad de la enfermedad causada por *R. solani* en papa.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados en suelo para evaluar severidad de la enfermedad causada por *R. solani* (R.s.) en papa.

Momento de aplicación de <i>T. harzianum</i>	Número de Tratamiento	Descripción (TC= <i>T. harzianum</i> cepa) (R.s= <i>Rhizoctonia solani</i>)
Antes de la inoculación de <i>R. solani</i>	1	TC 1 + R.s
	2	TC 3 + R.s
	3	TCT + R.s
	4	TC F + R.s
	5	TC1 + TC3 + TCT + TCF + R.s
Después de la inoculación de <i>R. solani</i>	6	TC 1 + R.s
	7	TC 3 + R.s
	8	TCT + R.s
	9	TC F + R.s
	10	TC 1 + TC3 + TCT + TCF + R.s
Testigo 1	11	<i>R. solani</i>
Testigo 2	12	TC1 + TC3 + TCT + TCF

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y para conocer los mejores tratamientos, se llevó a cabo una prueba de separación de medias mediante la prueba de Tukey y DMS ($P = 0.05$). Todos los experimentos se condujeron bajo un diseño completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento y un individuo por repetición.

Se calculó la eficacia de control con la fórmula Abbott tomada de Estrada (2004), que se presenta a continuación:

$$\frac{Ca-Ta (100)}{Ca}$$

Donde:

Ca: Porcentaje de daño en el testigo después de la aplicación

Ta: Porcentaje de daño en el tratamiento después de la aplicación

6.3.3 Aplicaciones de composta y fertilización e inoculación de *T. harzianum* en plantas de pepino

El experimento se llevó a cabo en condiciones de invernadero. Primero se determinó el mejor porcentaje de composta/peatmost indicado para obtener plántulas más vigorosas, en este paso se utilizaron charolas de unicel en donde se sembraron 100 semillas para cada tratamiento (Cuadro 4). Después de un mes de la siembra, se tomaron 15 plántulas al azar por cada tratamiento y se les registró la altura (cm), después del análisis de datos se determinó el tratamiento con los mejores resultados, que se utilizó para sembrar las semillas de pepino var. Slice Max para el experimento que consistió en evaluar el efecto de diferentes porcentajes de fertilizante y composta y la inoculación de *T. harzianum* sobre el desarrollo de plantas.

Para el experimento en invernadero inicialmente se realizó la siembra en macetas con capacidad de 300 g en sustrato composta (40%) /peatmost (60%) y después de un mes se trasladaron a macetas de 20 kg, las cuales tuvieron como sustrato suelo proveniente del campo experimental del CUCBA, mismo que presentó las siguientes características físico químicas: pH 4.15, arenolimoso y materia orgánica 1.72%, al cual le fue adicionado composta de jardinería y esporas de *T. harzianum*.

Se evaluaron 16 tratamientos (Cuadro 5), con cuatro repeticiones. Las macetas fueron distribuidas mediante un diseño completamente al azar. El muestreo se realizó a los 60 días después del trasplante para obtener datos de altura, diámetro del tallo, días a floración, número de flores y número de hojas. La fertilización se realizó en 5 etapas con diferentes porcentajes de N-P-K en relación (N 180kg- P 350kg- K 280kg/ha) dependiendo del tratamiento (cuadro 6).

Para la inoculación de esporas de *Trichoderma* spp. se utilizaron 3 cepas (TC1, TC3, TCActino). Cada cepa se sembró en 5 cajas de petri en medio PDAA y se dejaron crecer 5 días a 23°C. Posteriormente se agregaron 3 mL de agua estéril a cada caja y se mezclaron con el cultivo para recolectar las esporas con una pipeta, las cuales se cuantificaron en una cámara Neubauer bajo microscopio, para obtener únicamente una solución con la misma cantidad de esporas de cada cepa (C1, C3 y CActino). De cada solución de esporas se hicieron diluciones hasta obtener la cantidad de esporas que se aplicaron en las macetas a razón de 20×10^6 esporas/m². Con los datos obtenidos se realizó una ANOVA, y para conocer los mejores tratamientos, se llevó a cabo una prueba de separación de medias mediante la prueba de Tukey y DMS ($P= 0.05$).

En el ensayo se utilizó composta de jardinería y residuos domiciliarios, cuyas características se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Propiedades de la composta utilizada (Iñiguez – Covarrubias et al. 2011).

Caracterización	
pH	8.26
conductividad eléctrica	5.55 dS m ⁻¹
N total	1.50 %
C/N	14.64
P total	0.24 %
K total	1.20 %
Ca total	5.44 %
COT	22.00 %
Mg total	0.32 %
Na total	370.54 mg kg ⁻¹
Cu	35.38 mg kg ⁻¹

Cuadro 4. Tratamientos a evaluar en plántulas de pepino sembradas en charolas.

TRATAMIENTOS	COMPONENTES	
	Composta	Peatmost
1	100%	0%
2	80%	20%
3	20%	80%
4	60%	40%
5	40%	60%
6	0%	100%

Cuadro 5. Tratamientos a evaluar en plantas de pepino con distintas proporciones composta/ *T. harzianum*/ fertilización. (x= no inoculadas con *T. harzianum*).

Número de Tratamiento	COMPONENTES PARA CADA MACETA		
	Composta (ton/ha)	<i>T. harzianum</i> (20×10^6 esporas/m ²)	Fertilización (%)
1	0	X	0
2	20	X	0
3	40	X	0
4	60	X	0
5	0	X	100
6	0	*	0
7	20	*	0
8	40	*	0
9	60	*	0
10	0	*	100
11	20	X	75
12	40	X	50
13	60	X	25
14	20	*	75
15	40	*	50
16	60	*	25

Cuadro 6. Plan de fertilización de plantas de pepino en sus diferentes etapas.

ETAPA	COMPONENTES		
	180 kg/ha	350 kg/ha	280 kg/ha
	N (%)	P (%)	K (%)
Trasplante	10	30	10
Desarrollo	20	30	10
Floración	30	20	35
Maduración	15	10	25
Cosecha	15	10	20

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Micoparasitismo In vitro de *T. harzianum* sobre *S. rolfsii* y *R. solani* e inhibición del crecimiento micelial

Todas las cepas de *T. harzianum* evaluadas contra *S. rolfsii* y *R. solani* mostraron parasitismo. Las cepas 1 y 3 tuvieron un porcentaje del 100% de micoparasitismo sobre ambos patógenos y la cepa Actino presentó un 60 y 70 % sobre el micelio de *S. rolfsii* y *R. solani* respectivamente (Cuadro 7). En los confrontamientos de *T. harzianum* frente a los patógenos, inicialmente se observó un crecimiento considerable de *T. harzianum* sobre el micelio de *S. rolfsii* y *R. solani* y posteriormente se detuvo completamente el desarrollo de éstos, lo cual se determinó por el posterior crecimiento total de *T. harzianum* en la caja de petri. Se observó un enrollamiento constante de las hifas de las tres cepas antagonistas sobre ambos patógenos, disolución del contenido de las hifas y la penetración de haustorios por parte de las cepas TC1 y TC3 (Figura 2 y 3). Estos resultados son similares a los reportados por Ochoa (2002) quien presentó evidencias de enrollamiento, desde el primer día de contacto de *T. harzianum* con *Micosparella fijensis* y la penetración de hifas al tercer día de contacto, con la posterior esporulación de ambos hongos. Por su parte, Thiruvudainambiet al. (2010) evaluaron micoparasitismo in vitro contra *S. rolfsii* y encontraron que *Trichoderma* spp. tiene una fuerte actividad antagónica causando enrollamiento y lisis sobre éste fitopatógeno. Al respecto, Benhamau y Chet (1993) reportan en la zona de interacción entre *T. harzianum* y *R. solani* daños en las hifas de *R. solani* justo después de iniciado el enrollamiento de *T. harzianum* sobre el hospedero. Elad et al. (1996) reportan el enrollamiento denso de las hifas de *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum* y la disolución de la pared celular como un proceso continuo.

En las pruebas de actividad biológica de los extractos en medio envenenado, la cepa TCActino resultó ser el mejor tratamiento en concentración 50/ 50 (extracto / PDA) ya que inhibió el crecimiento radial del micelio de *R. solani* (Figura 5b), seguida de las cepas TC3 y TC1, con una media de 2.3, 2.6 y 2.75 cm respectivamente a los 8 días de la siembra, en contraste con el testigo que fue de 6.0 cm a los 3 días de la siembra (Cuadro 9).

Los resultados demuestran que la cantidad de extracto adicionado al medio es importante debido a que el crecimiento del micelio fue menor en concentraciones 50/50 comparado con los de 10/90 y 1/99 (Extracto/PDA), no habiendo diferencia entre éstas dos últimas. *S. rolfsii* mostró mayor susceptibilidad a *T. harzianum* en comparación con *R. solani*, así como un crecimiento más lento. A concentraciones de 50/ 50 la cepa TC1 alcanzó solo 0.7 cm y 3.2 cm y 1.65 cm de las cepas TCActino y TC3 respectivamente a los 8 días a partir de la siembra, éste patógeno mostro diferencias entre las concentraciones 10/90 y 1/99, siendo mejor la concentración 10/90 (Cuadro 8). La cepa TCActino fue la que tuvo el menor porcentaje de inhibición en la concentración 1/99 mostrando un crecimiento de 3.7 cm de diámetro en la caja de petri, aún así, la inhibición fue significativa comparada con el testigo, que creció en toda la caja de petri (6 cm).

La diferencia de inhibición del crecimiento del micelio entre las cepas evaluadas de *T. harzianum* (TC1, TC3 y TCActino) sobre los patógenos, demuestra que éstas tienen una actividad específica de inhibición por lo que las interacciones bioquímicas entre hongos son distintas en cada relación antagonista-patógeno. Los resultados de inhibición coinciden con los obtenidos por Stefanova et al. (1999), quienes demostraron que la presencia de algunos metabolitos con actividad antifúngica, reducen el crecimiento micelial de algunos fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae* y *R. solani* en medios de cultivo envenenado, además de causar a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. Thiruvudainambi et al. (2010) encontraron que *T. harzianum* tiene una fuerte actividad antagonica in vitro, inhibiendo el crecimiento micelial de *S. rolfsii* hasta en un 88%.

La inhibición del crecimiento micelial y la actividad micoparasítica de *T. harzianum* concuerdan con resultados obtenidos por Hoyos-Carvajal et al. (2008) quienes reportaron un 100% de actividad micoparasítica en aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados contra *S. rolfsii* y *R. solani* en ensayos In vitro con la variante de que en los ensayos de micoparasitismo *Trichoderma* spp. se estableció a las 24 h antes, ya que consideraron menor el crecimiento del antagonista en comparación con el del fitopatógeno durante los 3 a 5 días iniciales.

Es importante mencionar que el crecimiento completo del micelio de los testigos dentro de las cajas de petri (hasta el borde) requirió de 3 días en el caso de *R. solani* y 5 días en el caso de *S. rolfsii*, por lo que el crecimiento del micelio de los patógenos pudo ser mayor que el observado a los 8 días.

Cuadro 7. Porcentaje de crecimiento de *T. harzianum* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en base al número de discos germinados tomados de la zona de traslape entre *T. harzianum* y los fitopatógenos, en donde el 100% se considera en base al crecimiento único de *T. harzianum* lo que representa una inhibición completa del patógeno, datos tomados 5 días después de la siembra.

Tratamiento	Porcentaje de crecimiento ^a	
	<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>
TC1	100 A ^b	100 A
TC3	100 A	100 A
TCActino	60 B	70 B
Testigo	0 C	0 C

^a Promedio de 10 repeticiones

^b Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $P= 0.05$).



Figura 2. Confrontación de *T. harzianum* contra *S. rolfsii* (izquierda) y *R. solani* (derecha) donde se observa la zona de traslape entre el crecimiento de estos hongos.

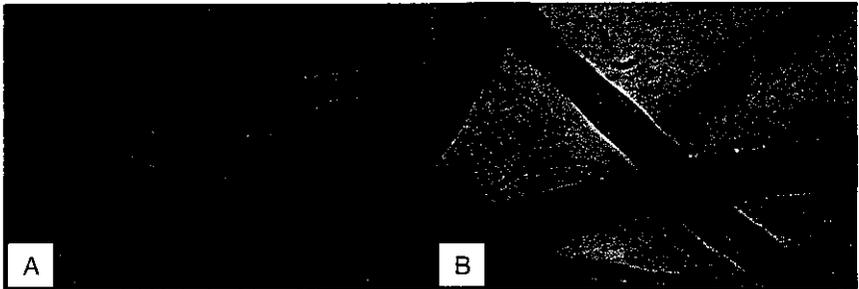


Figura 3. Micoparasitismo de *T. harzianum* TC1 sobre *R. solani*. A. Enrollamiento de *T. harzianum* sobre hifas de *R. Solani*. B. Lisis y penetración de haustorios de *T. harzianum* dentro de hifas de *R. solani*.100X.

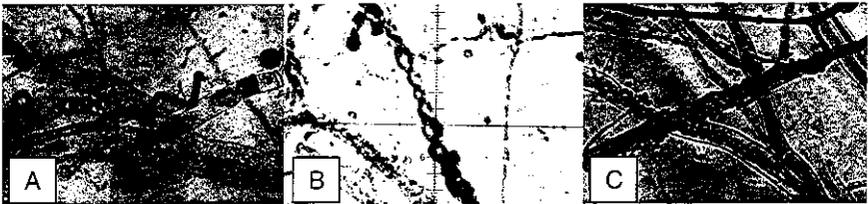


Figura 4. Micoparasitismo *T. harzianum* TC1 sobre *S. rolfsii*, donde se observa el enrollamiento de hifas del antagonista sobre su hospedero. 40X

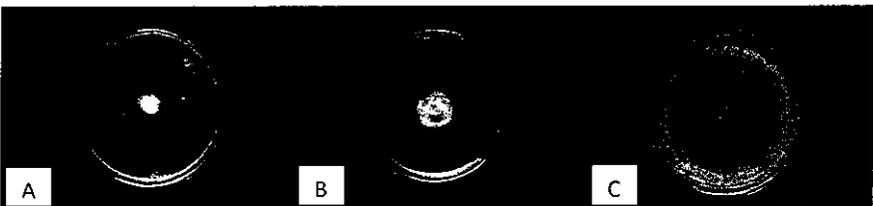


Figura 5. Observaciones del crecimiento de *T. harzianum* después de 72 hr de la siembra de *R. solani* en medio PDA envenenado con extracto de *T. harzianum*. A. Inhibición del crecimiento del micelio de *R. solani* con extractos de la cepa TC3. B. Inhibición del crecimiento del micelio de *R. solani* con extractos de la cepa TCActino, ambos a concentración de 50/50 (extracto/PDAA). C. Testigo, crecimiento de *R. solani* en PDA.

Cuadro 8. Crecimiento radial del micelio de *S. rolfsii* 3 y 8 días después de la siembra en medio envenenado con extractos de diferentes cepas de *T. harzianum* a diferentes concentraciones extracto/PDA

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)			
	Tukey ^b 3 días		Tukey ^b 8 días	
TC1 50/ 50 ^c	0.67	E	0.70	F ^o
TC1 10/ 90	0.87	DE	2.45	D
TC1 1/ 99	1.27	BC	3.52	BC
TCActino 50/ 50	0.87	DE	3.2	BC
TCActino 10/ 90	1.02	CD	3.5	BC
TCActino 1/ 99	1.05	CD	3.7	B
TC3 50/ 50	0.65	E	1.65	E
TC3 10/ 90	1	CD	3.02	C
TC3 1/ 99	1.5	B	3.5	BC
Testigo	3.67	A	6 ^d	A

^a Promedio de 4 repeticiones (cm); ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^o F considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 9. Crecimiento radial del micelio de *R. solani* 3 y 8 días después de la siembra en medio envenenado con extractos de diferentes cepas de *T. harzianum* a diferentes concentraciones extracto/PDA.

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)			
	Tukey ^b 3 días		Tukey ^b 8 días	
TC1 50/ 50 ^c	1.25	CD	2.75	C
TC1 10/ 90	1.77	B	3.4	B
TC1 1/ 99	1.50	BC	3.4	B
TCActino 50/ 50	1.12	D ^e	2.3	D
TCActino 10/ 90	1.52	BC	3.5	B
TCActino 1/ 99	1.65	B	3.22	B
TC3 50/ 50	1.10	D	2.60	CD
TC3 10/ 90	1.70	B	3.52	B
TC3 1/ 99	1.57	BC	3.37	B
Testigo	6 ^d	A	6 ^d	A

^a Promedio de 4 repeticiones (cm); ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e D considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

7.2 Pruebas de actividad biológica de extractos de *T. harzianum* crecidos previamente en presencia de quitosán sobre hongos fitopatógenos

En las evaluaciones de los extractos crecidos previamente en presencia de quitosán, el mejor tratamiento para el control de *S. rolfisii* fue la cepa TC3 en concentración 50/50 y 1g de quitosán/100 mL (TC3Q), con un crecimiento de solo 0.57cm, en comparación con el testigo a esa misma concentración y sin quitosán que fue de 1.65 cm y con el testigo absoluto con un crecimiento radial de 6 cm (Cuadro 11), el cual creció en PDA sin ningún tipo de extracto. De manera general, se observó que los tratamientos de la cepa 3 fueron los más efectivos en cuanto a la inhibición del crecimiento del micelio, seguido de la cepa TC1 y Actino.

Los resultados obtenidos por la prueba de separación de medias indicó que la presencia de quitosán en cultivo líquido de *T. harzianum* incrementó la inhibición en el crecimiento micelial, éste fenómeno se observó en las tres

cepas (Cuadro 10, 11 y 12), siendo más contrastante entre la dosis de 1 g y 0.5 g que entre las dosis 0.5 y 0.15 g/100 mL en medio líquido, existiendo mínimas diferencias entre éstas dos últimas. Los resultados indican que el quitosán disminuye la velocidad de crecimiento de los patógenos, y que ninguno de los extractos crecidos en presencia o ausencia de quitosán muestra actividad fungicida, sino fungistática retrasando hasta 18 días el crecimiento del micelio hasta el borde de la caja (6 cm) de los patógenos en relación al testigo, siendo éste de 3 días para *R. solani* y 5 días para *S. roffsii*. Es posible que la presencia del quitosán de manera aislada incidiera en la inhibición de crecimiento micelial, y no de manera sinérgica en conjunto con *T. harzianum* ya que se ha demostrado que éste biopolímero es capaz de inhibir algunas especies de hongos, además de que existe una alta correlación entre la concentración de quitosán aplicada y la inhibición fúngica (Lárez- Velázquez, 2008). Existen evidencias de que la sensibilidad de los hongos patógenos hacia el quitosán puede cambiar en los diferentes estadios de su desarrollo (Lárez- Velázquez, 2008), lo cual explicaría la diferencia entre la velocidad de crecimiento del micelio, y los con tratamientos a los cuales no se les agregó quitosán.

La inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* con extractos de *T. harzianum* fue mayor con la cepa TC3, que tuvo un crecimiento medio de 0.57, 0.67 y 0.70 cm en los tratamientos TC3/1gQ, TC3 /0.5gQ y TC3/0.15gQ respectivamente después de 8 días de la siembra, todos a una concentración 50/50 (extracto/PDA) en contraste con el testigo que fue de 6 cm a los 3 días de la siembra (Cuadro 15). Todas las cepas en presencia de quitosán dieron mejores resultados, siendo más efectivas las cepas TC1 y TC3 al inhibir el crecimiento del micelio, lo cual pone de manifiesto la especificidad que existe sobre los fitopatógenos entre aislamientos de una misma especie de *T. harzianum*.

Cuadro 10. Crecimiento radial del micelio de *S. rolfsii* 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de *T. harzianum* TC1.

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)			
	Tukey ^b 3 días		Tukey ^b 8 días	
TC1 50/50 ^c 1gQ ^e	0.7	F ^f	1.02	EF
TC1 10/90 1gQ	0.92	EF	2.82	CD
TC1 1/99 1gQ	1.6	BC	3.42	BC
TC1 50/50 0.5g Q	0.77	F	1.2	EF
TC1 10/90 0.5g Q	1.07	DEF	3	BCD
TC1 1/99 0.5g Q	1.75	B	3.72	E
TC1 50/50 0.15g Q	0.75	F	1.15	EF
TC1 10/90 0.15g Q	1.82	B	3.75	B
TC1 1/99 0.15g Q	1.42	BCD	3.57	BC
TC1 50/50 Testigo	0.67	F	0.7	F
TC1 10/90 Testigo	0.95	EF	2.5	D
TC1 1/99 Testigo	1.27	CDE	3.52	BC
TC1 Testigo Absoluto	3.55	A	6 ^d	A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e g de quitosán /100 mL (agregados al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f F considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Peor

Cuadro 11. Crecimiento radial del micelio de *S. rolfsii* 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de *T. harzianum* TC3.

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)	
	Tukey ^b 3 días	Tukey ^b 8 días
TC3 50/ 50 ^c 1gQ ^e	0.5 G ^f	0.57 G
TC3 10/ 90 1gQ	0.75 EFG	1.45 EF
TC3 1/ 99 1gQ	1 CDE	2.97 BC
TC3 50/ 50 0.5g Q	0.6 FG	0.67 FG
TC3 10/ 90 0.5g Q	0.87 DEF	1.87 DE
TC3 1/ 99 0.5g Q	1.32 BC	2.92 BC
TC3 50/ 50 0.15g Q	0.67 EFG	0.7 FG
TC3 10/ 90 0.15g Q	0.9 DEF	2.8 BC
TC3 1/ 99 0.15g Q	1.55 B	3.27 BC
TC3 50/ 50 Testigo	0.65 EFG	1.65 E
TC3 10/ 90 Testigo	1 CDE	2.55 CD
TC3 1/ 99 Testigo	1.15 CD	3.5 B
TC3 Testigo Absoluto	3.55 A	6 ^d A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e g de quitosán /100 mL (agregados al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f G considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 12. Crecimiento radial del micelio de *S. rofsii* 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de *T. harzianum* TCActino.

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)	
	Tukey ^b 3 días	Tukey ^b 8 días
TCActino 50/ 50 ^c 1gQ ^e	0.65 G ^f	0.87 D
TCActino 10/ 90 1gQ	0.82 FG	3.25 BC
TCActino 1/ 99 1gQ	1.17 CDEF	3.85 B
TCActino 50/ 50 0.5g Q	0.77 FG	1.35 D
TCActino 10/ 90 0.5g Q	1.45 BCD	2.65 C
TCActino 1/ 99 0.5g Q	1.37 BCDE	3.95 B
TCActino 50/ 50 0.15g Q	0.72 FG	1.3 D
TCActino 10/ 90 0.15g Q	1.65 BC	3.82 B
TCActino 1/ 99 0.15g Q	1.77 B	3.95 B
TCActino 50/ 50 Testigo	0.87 EFG	3.15 BC
TCActino 10/ 90 Testigo	0.95 DEFG	3.5 B
TCActino 1/ 99 Testigo	1.47 BC	3.7 B
TCActino Testigo Absoluto	3.55 A	6 ^d A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e g de quitosán /100 mL (agregados al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f G considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; tratamientos con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

TESIS/UCBA

Cuadro 13. Crecimiento radial del micelio de *R. solani* 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de *T. harzianum* TC1.

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)	
	Tukey ^b 3 días	Tukey ^b 8 días
TC1 50/ 50 ^c 1gQ ^e	0.70 B	0.87 G ^f
TC1 10/ 90 1gQ	0.92 B	1.97 F
TC1 1/ 99 1gQ	1.52 B	2.7 DE
TC1 50/ 50 0.5g Q	0.7 B	0.9 G
TC1 10/ 90 0.5g Q	1.12 B	2.25 EF
TC1 1/ 99 0.5g Q	1.57 B	3.15 BCD
TC1 50/ 50 0.15g Q	0.72 B	0.87 G
TC1 10/ 90 0.15g Q	1.4 B	1.97 F
TC1 1/ 99 0.15g Q	1.27 B	2.77 CDE
TC1 50/ 50 Testigo	1.25 B	2.72 CDE
TC1 10/ 90 Testigo	1.77 B	3.4 BC
TC1 1/ 99 Testigo	1.5 B	3.5 B
TC1 Testigo Absoluto	6 ^d A	6 ^d A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e g de quitosán /100 mL (agregados al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f G considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 14. Crecimiento radial del micelio de *R. solani* 3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de *T. harzianum* TC3.

Tratamiento		Crecimiento radial del micelio ^a (cm)	
		Tukey ^b 3 días	Tukey ^b 8 días
TC3	50/ 50 ^c 1gQ ^e	0.72 H ^f	0.87 E
TC3	10/ 90 1gQ	1.2 EF	1.75 D
TC3	1/ 99 1gQ	1.65 BCD	2.77 C
TC3	50/ 50 0.5g Q	0.77 GH	1 E
TC3	10/ 90 0.5g Q	1.35 DEF	1.9 E
TC3	1/ 99 0.5g Q	1.75 BC	2.82 C
TC3	50/ 50 0.15g Q	0.80 GH	1.05 E
TC3	10/ 90 0.15g Q	1.72 BC	2.97 C
TC3	1/ 99 0.15g Q	1.85 B	2.87 C
TC3	50/ 50 Testigo	1.1 FG	2.6 C
TC3	10/ 90 Testigo	1.7 BC	3.55 B
TC3	1/ 99 Testigo	1.5 CDE	3.55 B
TC3	Testigo Absoluto	6 ^d A	6 ^d A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e g de quitosán /100 mL (agregados al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f H considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 15. Crecimiento radial del micelio de *R. solani*3 y 8 días después de la siembra en medio PDA envenenado con extractos de *T. harzianum* TCActino.

Tratamiento	Crecimiento radial del micelio ^a (cm)	
	Tukey ^b 3 días	Tukey ^b 8 días
TCActino 50/ 50 ^c 1gQ ^e	0.72 G	0.85 E
TCActino 10/ 90 1gQ	1.02 FG	1.67 DE
TCActino 1/ 99 1gQ	1.7 BC	2.75 BC
TCActino 50/ 50 0.5g Q	0.75 G	0.97 E
TCActino 10/ 90 0.5g Q	1.10 EFG	2.67 BC
TCActino 1/ 99 0.5g Q	1.82 B	3.27 BC
TCActino 50/ 50 0.15g Q	0.75 G	1.15 E
TCActino 10/ 90 0.15g Q	1.25 DEF	3.17 BC
TCActino 1/ 99 0.15g Q	1.3 CDEF	3.52 B
TCActino 50/ 50 Testigo	1.12 EFG	2.3 CD
TCActino 10/ 90 Testigo	1.52 BCDE	3.5 B
TCActino 1/ 99 Testigo	1.65 BCD	3.3 B
TCActino Testigo Absoluto	6 ^d A	6 ^d A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b Tukey $P = 0.05$; ^c extracto/PDA; ^d crecimiento completo en caja; ^e g de quitosán /100 mL (agregados al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f G considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

7.3 Influencia de la aplicación de extractos de *Trichoderma harzianum* en el desarrollo de plántulas de cucurbitáceas

Las diferencias en el desarrollo de cucurbitáceas se vio reflejado principalmente en la altura de plántulas, en el caso de sandía, la prueba de separación de medias DMS detectó diferencias significativas entre los tratamientos, mostrando que las medias oscilaron entre 15.73 cm con el tratamiento TCTQ presentando una altura máxima de 8.52 cm con el tratamiento TC1Q, comparado con el testigo que presentó una media de 6,87 cm (Cuadro 16). El tratamiento más efectivo fue el TCTQ, en este caso la evaluación de los días a emergencia de las semillas, disminuyo hasta un 50% comparado con el testigo siendo de 2.25 y 4.75 días para TCTQ y el testigo, respectivamente.

A pesar de que el mejor tratamiento fue el extracto de la cepa TCT crecida con quitosán (1g/100 mL) en medio líquido (Cuadro 16), considerando el parámetro de altura, el análisis estadístico no mostro diferencia significativa que demuestre que la presencia de éste biopolímero se relacione con un mejor crecimiento de las plántulas. Sin embargo resultados como los obtenidos por Bhaskara et al. (1999) han demostrado que la aplicación de quitosán tiene efectos positivos en el crecimiento de las plantas, tanto en la estimulación de la germinación de semillas como en el crecimiento de partes de la planta, estos estudios relacionados con nuestro trabajo determinan que probablemente el hongo antagonista *T. harzianum* y el quitosán contribuyeron en un mejor desarrollo de las especies evaluadas de manera aislada sin tener un efecto sinérgico. Esto discrepa con el hecho de que existan algunos productos como el BIOREND T, que mezcla la acción benéfica de *Trichoderma* spp. con el poder inmunoestimulante del quitosán, ya que se considera que el hongo se ve favorecido por la presencia del biopolímero, ayudando a su establecimiento y favoreciendo su multiplicación en el suelo. Otra posibilidad es que en presencia del quitosán, *Trichoderma* spp. no incrementa la secreción de compuestos como podían ser algunos promotores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Cubillos- Hinojosa, 2009).

En melón todos los tratamientos mostraron diferencias tanto en la altura como en los días a emergencia de las semillas en comparación con el testigo. Al igual que en sandía, los mejores tratamientos fueron los extractos de la cepa TCT, tanto en días a emergencia como en altura de la planta siendo de 2.25 días y 15.06 cm respectivamente en los tratamientos TCT y TCTQ, en contraste

con el testigo que tuvo una media de 3.5 días a emergencia en semilla y 10.12 cm de altura (Cuadro 17). El análisis de comparación de medias muestra que las diferencias entre los tratamientos se acentúan entre las diferentes cepas y no entre los tratamientos crecidos en presencia o ausencia de quitosán, el mismo fenómeno que fue observado en plántulas de sandía.

Los resultados en calabaza fueron los menos satisfactorios en cuanto a la altura de la planta ya que no se registró una diferencia entre tratamientos ni entre éstos y el testigo, sin embargo, los días a emergencia de la semilla se redujeron hasta en un 40%, en este caso el testigo registró una media de 4.5 días y el mejor tratamiento TC1 presentó una media de 2.5 días a diferencia de los resultados obtenidos en sandía y melón, donde los mejores tratamientos fueron TCT y TCTQ para ambas especies (Cuadro 17). La ausencia de un efecto en el crecimiento, quizás pueda ser atribuido al periodo de evaluación (30 días), el cual pudo ser poco para que el antagonista pudiera manifestar su capacidad de estimular el crecimiento en esta especie, otra posibilidad es que las cepas evaluadas no presentaron el mismo efecto como el observado en sandía y melón.

En este trabajo no se evaluó la producción de promotores de crecimiento vegetal por parte de *T. harzianum*, sin embargo estudios previos realizados por Contreras et al. (2009) demuestran que *T. harzianum* puede producir compuestos de naturaleza auxínica como el ácido indol-3-acético (AIA), el indol-3-acetaldehído (IAld) y el indol-3-etanol (IEt) en medio líquido bajo condiciones axénicas, los cuales son esenciales en el proceso de desarrollo de la planta (López-Bucio, 2008), por lo que los resultados positivos observados del efecto de *T. harzianum* sobre el crecimiento de las plántulas (altura y días a emergencia), posiblemente se debe al efecto de algunos promotores del crecimiento vegetal liberados por éste antagonista en el medio líquido donde creció, previo a la obtención de los extractos, es decir que *T. harzianum* no necesitó de la interacción con la semilla, planta o componentes del sustrato para tener un efecto positivo sobre su desarrollo, debido a que los extractos utilizados no contenían ningún tipo de estructura del hongo, sino únicamente los posibles metabolitos secundarios, enzimas o promotores de crecimiento que pudiera liberar. Al respecto Vera y Valencia, (2002) han reportado la capacidad de *Trichoderma* spp. de producir ácido indolacético, sustancia que favorece el alargamiento de las raíces permitiendo una mejor captura de nutrientes en el suelo por parte de la planta, lo que contribuye en una mejor nutrición vegetal y por consiguiente en un mejor desarrollo. Sin embargo, cabe mencionar que existe poca información acerca de la biosíntesis del AIA en hongos.

Cuadro 16. Días a emergencia y altura de la plántula de sandía después de 30 días de la siembra y tratadas con diferentes extractos de *T. harzianum*.

Tratamiento	Número de días a emergencia ^{a,b,f}		Altura ^{a,b,g} (cm)	
TC1	4.75	A	9.07	CD
TC1Q ^c	3.00	BC	8.52	D
TC3	3.50	B	11.90	B
TC3Q	4.00	AB	9.25	CD
TCT	4.00	AB	11.30	BC
TCTQ	2.25	C	15.73	A
TCF	4.00	AB	9.57	CD
TCFQ	3.50	B	9.57	CD
Testigo	4.75	A	6.87	E

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b DMS $P = 0.05$; ^c Q= 1 g quitosán /100 mL (agregado al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f C considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; ^g A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta E el menos adecuado. Medias con la misma letra/s no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 17. Días a emergencia y altura de la plántula de melón después de 30 días de la siembra y tratadas con diferentes extractos de *T. harzianum*.

Tratamiento	Número de días a emergencia ^{a,b,f}	Altura ^{a,b,g} (cm)
TC1	3.00 ABC	14.66 AB
TC1Q ^c	2.50 CD	14.47 AB
TC3	2.75 BCD	14.60 AB
TC3Q	3.25 AB	12.57 B
TCT	2.25 D	15.06 A
TCTQ	2.25 D	15.06 A
TCF	2.75 BCD	15.02 A
TCFQ	2.50 CD	15.02 A
Testigo	3.50 A	10.12 C

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b DMS $P = 0.05$; ^c Q= 1 g quitosán /100 mL (agregado al CPD antes de la obtención de los extractos); ^f D considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; ^g A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta C el menos adecuado. Medias con la misma letra/s no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 18. Días a emergencia y altura de la plántula en calabaza después de 30 días de la siembra y tratadas con diferentes extractos de *T. harzianum*.

Tratamiento	Número de días a emergencia ^{a,b,f}	Altura ^{a,b,g} (cm)*
TC1	3.75 ABC	14.57 A
TC1Q ^c	2.25 D	14.17 A
TC3	4 AB	13.97 A
TC3Q	3.25 BC	14.92 A
TCT	3.25 BC	15.7 A
TCTQ	3 CD	14.65 A
TCF	4 AB	15.02 A
TCFQ	3 CD	14.27 A
Testigo	4.50 A	13.1 A

^a Promedio de 4 repeticiones; ^b DMS $P = 0.05$; ^c Q= 1 g quitosán /100 mL (agregado al CPD antes de la obtención de los extractos); ^d D considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado; ^e Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

7.4 Evaluación de la sseveridad de la enfermedad causada por *R. solani* en papa con la inoculación de *T. harzianum*

En todos los tratamientos donde se utilizaron las cepas de *T. harzianum* para el control de la enfermedad causada por *R. solani* se encontró un efecto positivo. La prueba de Tukey no mostro diferencias entre los tratamientos (Cuadro 19) pero sí con el testigo, por lo que se realizó una prueba de separación de medias menos estricta con el fin de observar las diferencias entre tratamientos y se eligió la prueba DMS. Los mejores tratamientos fueron TC1 y TC3 antes de la inoculación de *R. solani* y TC 1 + TC3 + TCT +TCF después de la inoculación de *R. solani* que presentaron valores iguales de severidad de 0.33 y eficacia Abbott de 90.09%. Los tratamientos menos efectivos fueron TCF y TC1 después de la inoculación de *R. solani*, que presentaron valores de severidad de 1 y 60.96% de eficacia Abbott, en comparación con el testigo,

cuyos valores fueron de 3.33 (severidad) y 16.75% de eficacia (Cuadro 19). Los valores de severidad son manifestados en base a una escala determinada donde el valor máximo de severidad es de 4.

Estos resultados demuestran que el porcentaje de área dañada en tallo y raíz fue de un 10% con los mejores tratamientos y de un 83% en el testigo, lo que indica que las cepas influyeron sobre el fitopatógeno *R. solani*, reduciendo los niveles de infección y por consiguiente reduciendo la severidad de la enfermedad, lo que se puede atribuir al parasitismo, capacidad antibiótica, competencia o incluso a una resistencia sistémica inducida desencadenada por la presencia de *Trichoderma* spp. en la rizósfera de la planta. Lo anterior se determinó en base a la coincidencia de nuestros resultados con los obtenidos por Beltrán y Garcés (2005), quienes observaron que aunque no lograron disminuir la incidencia de *R. solani* en el cultivo de papa, los aislamientos seleccionados con *Trichoderma* spp. permitieron reducir el daño en las plantas, observando incluso mayor vigor como son tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical. Al respecto, Cherif y Benhamou (1990) señalan que las especies de *Trichoderma* spp. poseen gran posibilidad en el uso como hiperparásito competitivo, debido a la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas para el control de patógenos del suelo, principalmente *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. y *Sclerotium* spp.

A pesar que el análisis de comparación de medias de Tukey no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, la prueba de separación de medias DMS y la prueba de eficacia Abbott mostraron de manera general que el nivel de daño en raíz y tallo, fue menor cuando los tratamientos de *T. harzianum* se aplicaron antes de la inoculación del patógeno, lo que puede deberse a que éste, al hacer contacto más tempranamente con el patógeno, tuvo mayores oportunidades de competencia, además de que al estar más cerca de las raíces, *T. harzianum* logró colonizarlas y protegerlas contra infecciones más rápidamente, en este sentido, Postmaster et al. (1997) señala que la infección por patógenos en las plantas se reduce cuando se aplica primero al antagonista y después al patógeno, además, por su parte, Hadar et al. (1979) reportan que a mayor cantidad de *T. harzianum* adicionado al suelo se manifiesta una reducción de *R. solani* y la enfermedad en condiciones de invernadero.

Haciendo una comparación entre las pruebas in vitro de inhibición del crecimiento micelial y las pruebas in vivo para la reducción de la enfermedad causada por *R. solani*, se encontró en ambos experimentos y en todos los tratamientos se presentaron diferencias significativas en comparación con el

testigo. En los ensayos in vivo, no se logró disminuir la incidencia de la enfermedad, sino únicamente la severidad, sin presentar un efecto sinérgico de las cepas utilizadas.

El hecho de quedos de las cepas evaluadas de *T. harzianum* hayan tenido un porcentaje de micoparasitismo del 100 % sobre los patógenos (Cuadro 7) en pruebas in vitro y que en el ensayo in vivo no se redujo la incidencia de la enfermedad causada por *R. solani* (Cuadro 19) en papa al inocular *T. harzianum*, es decir, que no hubo un parasitismo completo hacia el patógeno, puede ser debido a la influencia de las distintas condiciones ambientales y nutricionales presentes en los ensayos in vitro y en los ensayos in vivo, en los cuales se utiliza suelo como sustrato o se exponen a los hongos a condiciones naturales de crecimiento, en tales casos pueden variar algunos elementos como son el aire, la disponibilidad de nutrientes y minerales, el pH, la distribución del agua, la temperatura y la luz (Hoyos-Carvajal, 2008), además de que en las pruebas in vitro no se tiene en cuenta la interacción con la planta, la cual es determinante para el buen funcionamiento del antagonista como tal.

Es posible que en este ensayo hayan influido varios de los mecanismos de acción del antagonista *T. harzianum* para reducir la enfermedad causada por *R. solani*, como los señalados por Howell (2003), entre los que se encuentran el micoparasitismo, la antibiosis, la competición por nutrientes y espacio, la desactivación de las enzimas de los patógenos, la tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radical, la solubilización y absorción de nutrientes orgánico y la resistencia inducida. De estos, los primeros cuatro mecanismos tienen acción hongo-fitopatógeno, mientras que los otros se encargan de elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta.

Cuadro 19. Resultados de la severidad de la enfermedad causada por *R. solani* con inoculación de *T. harzianum*. Los resultados fueron obtenidos en función del daño físico (porcentaje de superficie) observado en la raíz y tallo de la planta, considerando la siguiente escala: Planta sana= 0, 1 a 25% de daño= 1, 26 a 50% de daño= 2, 51 a 75% de daño=3 y 75 a 100% daño o muerte de la planta=4.

Tratamiento	Severidad de enfermedad ^a (% de área dañada)		
	Tukey ^b	DMS ^b	% Eficacia Abbott
TC 1 + R.s ^c (d i) ^d	1 B	B	69.96
TC 3 + R.s (d i)	0.83 B	B	75.07
TCT + R.s (d i)	0.50 B	BC ^f	84.98
TCF + R.s (d i)	1 B	B	69.96
TC 1+ TC3 +TCT+TCF+ R.s (d i)	0.33 B	BC	90.09
TC 1 + R.s(a i) ^e	0.33 B	BC	90.09
TC 3 + R.s (a i)	0.33 B	BC	90.09
TCT + R.s (a i)	0.66 B	BC	80.18
TCF + R.s (a i)	0.83 B	B	75.07
TC 1 +TC3 +TCT+TCF + R.s (a i)	0.83 B	B	75.07
Testigo <i>R. solani</i> (R.s.)	3.33 A	A	-----

^a Promedio de 6 repeticiones; ^b Tukey y DMS $P = 0.05$; ^c R.s = *Rhizoctonia solani*; ^d (d i) = *T. harzianum* después de inoculación de *R. solani*; ^e (a i) = *T. harzianum* antes de inoculación de *R. solani*; ^f BC considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta A el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

7.5 Desarrollo de plantas de pepino después de la inoculación de *T. harzianum*, y la aplicación de composta y fertilización a diferentes porcentajes.

En relación a los resultados en la medición de altura en plántulas de pepino en diferentes proporciones de sustrato composta/peatmost, mediante el análisis estadístico se demostró que los mejores tratamientos fueron los que tuvieron un menor porcentaje de composta que de peatmost, variando de 20 a 40% de composta, sin embargo estadísticamente no hay diferencias significativas entre los tratamientos 20/80, 60/40 y 40/60 (composta/Peatmost) (Cuadro 20).

Los tratamientos 40-T.h- 50, 0-T.h-100 y 60 -T.h- 25, en su orden, presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, presentando los mejores resultados en la longitud de las guías de pepino con un promedio de 70.75, 69.5 y 67.62 cm respectivamente, en contraste con el testigo que presentó una longitud media de 48.75 cm (Cuadro 22). Ningún tratamiento presentó un efecto significativamente positivo sobre el grosor del tallo, ni sobre el número de flores mediante la prueba de separación de medias de Tukey. Mediante el análisis estadístico de la prueba menos estricta DMS los resultados presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, dos de ellos presentaron un mejor efecto, el 60-T.h-25 y el 40-T.h-50 con una media de 20 y 21 flores respectivamente, comparados con el testigo que sólo presentó 11 flores (Cuadro 21). En cuanto a los días a floración, los mejores tratamientos fueron el 60-T.h-25 y el 20-T.h-0 en los cuales se registro la floración a los 8 y 9 días respectivamente a partir del trasplante en comparación con el testigo que fue a los 15.5 días (Cuadro 21). A los tratamientos a los cuales se les inoculó *T. harzianum*, los días a floración variaron de 8 a 12 y mientras que en los tratamientos sin el antagonista fue de 10 a 15.5.

Todos los tratamientos causaron un efecto significativamente superior sobre el número de hojas con respecto al testigo, siendo 60-T.h-25 el tratamiento con mayor efecto, con una media de 27.5 hojas en comparación con el testigo que fue de 14 hojas (Cuadro 23). Los resultados son similares a los obtenidos por Donoso et al. 2008 quienes reportaron que se presenta un incremento en el área radicular, altura y biomasa total del Maracuyá después de la aplicación de *T. harzianum* y composta (Donoso et al. 2008), además se mencionan que la aplicación de *T. harzianum* en el trasplante, puede causar un incremento en el crecimiento de la planta, debido a la producción de factores que pueden estimular el crecimiento y aumentarla capacidad de las raíces para aprovecharlos nutrientes. Adicionalmente, el mejoramiento del desarrollo de la

planta y las raíces puede favorecer el control del desarrollo de hongos que pueden causar enfermedades (Benítez et al. 2004).

El presente ensayo evidenció un mejor resultado cuando se utilizó la combinación de factores (*T. harzianum*, composta, fertilización), que de forma individual, presentándose una diferencia marcada entre los tratamientos a los cuales únicamente se les aplicó composta, que cuando se aplicó *T. harzianum* en conjunto con composta que presentó mejores resultados. Se sabe que la composta contiene nutrientes importantes, pero no de una forma disponible para su absorción, siendo el hongo el que mediante diferentes mecanismos permita su absorción, resultando en un mejor crecimiento para la planta. Esta hipótesis se respalda por la capacidad de *Trichoderma* spp. de liberar ácidos orgánicos que secuestran cationes y acidifican el microambiente alrededor de las raíces, como la presencia de un mecanismo de solubilización de fósforo, manganeso, hierro y zinc, realizado por plantas y hongos micorrícicos.

Se ha reportado que *T. harzianum* es capaz de producir sideróforos que quelatan Fe , Fe_3^+ y Cu_2^+ (Altomare et al. 1999), lo que genera un incremento en la altura y biomasa de las plantas, también existe la posibilidad de que la presencia de composta produce un incremento poblacional de *T. harzianum*, alcanzando una población que desencadena la estimulación en el crecimiento de plantas de pepino. Esto coincide con autores que han reportado que poblaciones de *T. harzianum* están asociadas a la abundancia de carbono orgánico, el cual está presente en compostas (Eastburn y Butler, 1988). Otros estudios indican que las poblaciones de *T. harzianum* y su tasa de crecimiento poblacional se incrementa en forma significativa por la presencia de composta en el sustrato (Donoso, et al. 2008).

Cuadro 20. Comparación del desarrollo de plántulas de pepino utilizando diferentes porcentajes de sustrato composta/peatmost.

Tratamiento Composta / Peatmost	Altura de plántulas ^a (cm)	
	Tukey ^b	DMS ^b
100 / 0	11.50 B	C
0 / 100	12.55 B	BC
80 / 20	13.32 B	B
20 / 80	17.58 A ^c	A
60 / 40	16.43 A	A
40 / 60	17.27 A	A

^a Promedio de 15 repeticiones; ^b Tukey y DMS $P=0.5$; ^c A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta C el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 21. Efecto del sustrato con diferentes porcentajes de composta y fertilización y la inoculación de *T. harzianum* sobre las variables evaluadas días a floración y número de flores.

Tratamiento (Composta- <i>T. harzianum</i> - Fertilización)	Días a floración ^e			Número de flores ^e (cm)		
	Tukey ^{f,g}	DMS ^{f,g}		Tukey ^{f,h}	DMS ^{f,h}	
0 ^a - X ^b - 0 Testigo	15.5	A	A	11	A	E
20 - x - 0	15	A	AB	14.5	A	BCDE
40 - x - 0	13	AB	ABC	15.5	A	BCDE
60 - x - 0	10.25	BC	EF	18	A	ABCD
0 - x - 100 ^d	11.25	ABC	CDE	15.25	A	ABCDE
0 - T.h ^c - 0	10	BC	DEF	18.5	A	ABC
20 - T.h - 0	9	C	EF	13.75	A	CDE
40 - T.h - 0	10	BC	DEF	15.25	A	BCDE
60 - T.h - 0	10.25	ABC	CDEF	17.25	A	ABCD
0 - T.h- 100	12.25	ABC	BCD	18.25	A	ABC
20 - x - 75	10.5	ABC	CDEF	18	A	ABCD
40 - x - 50	12.75	AB	ABCD	12.75	A	DE
60 - x - 25	11.5	ABC	CDE	14	A	CDE
20 - T.h- 75	10	BC	DEF	18	A	ABCD
40 - T.h- 50	9.25	C	EF	21.25	A	A
60 - T.h- 25	8	C	F	20.75	A	A

^a Composta (Ton/ha); ^b X= sin esporas de *T. harzianum*; ^c Esporas de *T. harzianum* (20x10⁹ esporas/m³); ^d Porcentaje de fertilización; ^e Promedio de 4 repeticiones; ^f Tukey y DMS P=0.5; ^g C (Tukey) y F (DMS) considerados los mejores tratamientos, descendiendo hasta A para los menos adecuados; ^h A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta E para el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 22. Efecto del sustrato con diferentes porcentajes de composta y fertilización y la inoculación de *T. harzianum* sobre la variable evaluada longitud de las guías.

Tratamiento		Longitud de las guías ^e			
(Composta- <i>T.harzianum</i> - Fertilización)		Tukey ^{f,g}		DMS ^{f,g}	
0 ^a - x ^b - 0	Testigo	48.75	D	GH	
20 - x - 0		53	BCD	EFGH	
40 - x - 0		49.87	D	FGH	
60 - x - 0		52.75	CD	FGH	
0 - x - 100 ^d		54.62	BCD	EFG	
0 - T.h ^c - 0		46.37	D	H	
20 - T.h - 0		57.75	ABCD	DEF	
40 - T.h - 0		58	ABCD	CDEF	
60 - T.h - 0		66.12	ABC	ABC	
0 - T.h- 100		69.5	AB	A	
20 - x - 75		56.25	ABCD	EFG	
40 - x - 50		61.12	ABCD	BCDE	
60 - x - 25		65.25	ABC	ABCD	
20 - T.h- 75		66.87	ABC	AB	
40 - T.h- 50		70.75	AB	A	
60 - T.h- 25		67.62	ABC	AB	

^a Composta (Ton/ha); ^b X= sin esporas de *T. harzianum*; ^c Esporas de *T. harzianum* (20x10⁶ esporas/m²); ^d Porcentaje de fertilización; ^e Promedio de 4 repeticiones; ^f Tukey y DMS P=0.5; ^g A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta H para el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Cuadro 23. Efecto del sustrato con diferentes porcentajes de composta y fertilización y la inoculación de *T. harzianum* sobre las variables evaluadas número de hojas y diámetro del tallo de pepino.

Tratamiento (Composta- <i>T. harzianum</i> - Fertilización)			Número de hojas ^e			Diámetro del tallo ^e (cm)		
			Tukey ^{f,g}	DMS ^{f,g}		Tukey ^{f,h}	DMS ^{f,h}	
0 ^a - x ^b - 0 ^d	Testigo	14	DE	HI	0.8	A	CD	
20 - x - 0		20.5	BCD	FG	0.95	A	ABC	
40 - x - 0		21	ABC	EFG	0.95	A	ABC	
60 - x - 0		22	ABC	DEF	1	A	AB	
0 - x - 100		20.75	ABCD	FG	0.9	A	ABCD	
0 - T.h ^c - 0		12.75	E	I	0.77	A	D	
20 - T.h - 0		21.5	ABC	DEFG	0.9	A	ABCD	
40 - T.h - 0		23	ABC	BCDEF	0.95	A	ABC	
60 - T.h - 0		25	A	ABCD	0.85	A	BCD	
0 - T.h - 100		23	ABC	BCDEF	0.85	A	BCD	
20 - x - 75		17.75	CDE	GH	0.95	A	ABC	
40 - x - 50		26	A	ABC	0.97	A	AB	
60 - x - 25		26.5	A	AB	0.9	A	ABCD	
20 - T.h - 75		22.25	ABC	CDEF	1.02	A	A	
40 - T.h - 50		24.75	AB	ABCDE	1.02	A	A	
60 - T.h - 25		27.5	A	A	1	A	AB	

^a Composta (Ton/ha); ^b X= sin esporas de *T. harzianum*; ^c Esporas de *T. harzianum* (20x10⁹ esporas/m²); ^d Porcentaje de fertilización; ^e Promedio de 4 repeticiones; ^f Tukey y DMS P=0.5; ^g A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta I para el menos adecuado; ^h A considerado el mejor tratamiento, descendiendo hasta D para el menos adecuado, medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente.

8 CONCLUSIONES

Todas las cepas evaluadas de *T. harzianum* presentaron una fuerte actividad micoparasítica sobre *R. solani* y *S. rolfsii*.

Los extractos de *T. harzianum* inhibieron el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii*.

El extracto de *T. harzianum* crecido en medio líquido con quitosán incrementó el efecto inhibitorio del crecimiento radial del micelio de los patógenos.

Trichoderma harzianum redujo la severidad de la enfermedad causada por *R. solani* en papa hasta en un 73%.

La aplicación de *T. harzianum* previo a la inoculación de *R. solani* en papa mostró mejores resultados de control de la enfermedad en comparación con la inoculación de *T. harzianum* posterior al patógeno.

Los extractos de *T. harzianum* redujeron los días a emergencia de las semillas e incrementaron la altura de las plántulas de melón y sandía.

En el desarrollo de plantas de pepino se tuvieron mejores resultados cuando se combinaron los factores, *T. harzianum*, fertilización y composta.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasities for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 72: 58-63.
- Agosin, E., D. Volpe, G. Muñoz, R. San Martín y A. Crawford. 1997. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 225-232.
- Agrios, G.N. 1998. Fitopatología. 2ª ed. Noriega Eds. México. 838p.
- Ahmad, J. y R. Baker. 1987. Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77: 182-189
- Albert, L. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. 7º Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Revista de toxicología en línea (Retel), No. 8. Consultado el 19/06/2010. Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf>
- Alonso, F. 2002. El cultivo de la patata. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 490 pp.
- Altomare, C., W. Norvell, T. Bjorkman y G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai strain 1295-22. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2926-2933.
- Azcón, R. 2000. Papel de la simbiosis micorrízica y su interacción con otros microorganismos rizosféricos en el crecimiento vegetal y sostenibilidad agrícola. En: Alarcon A. y R. Ferrera (Eds). Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Mundi-Prensa, México.
- Barka, E. A., P. Eullaffroy, C. Climent y G. Vernet. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22: 608-614.

- Benhamou, N. y I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*, 83: 1062-1071.
- Benitez, T., A. Rincón, M. C. Limón y A. C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4): 249-260.
- Bettli, W. 1996. Biological control of plant pathogens in Brazil: Applications and current research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 505-510.
- Bhaskara, M. V., J. Arui, P. Angers y L. Couture. 1999. Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 208-1216.
- Brotman, Y., E. Briff., A. Viterbo y I. Chet. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology*, 147: 779-789.
- Camprubí, A., C. Calvet y V. Estaún. 1995. Growth enhancement of *Citrus reshni* after inoculation with *Glomus intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated effects on microbial populations and enzyme activity in potting mixes. *Plant and Soil*, 173: 233-238.
- Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortés, A. Gutierrez, I. Chet y E. Herrera. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 929-935.
- Castro, U. I. y M. A. Contreras. 2011. Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. Imprenta Austral, Valdivia-Chile. 72p.
- Cherif, M. y N. Benhamou. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. radicles lycopersici. *Phytopathology*, 80: 1406-1414.
- Chet, I. y J. Ibar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48: 37-43.
- Chet, I. y R. Baker. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 70: 94-98.

- Chet, I., G. H. Harma y R. Baker. 1981. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbiol Ecology*, 7: 9-38.
- Cook, R. J. y K. F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathology Soc., St. Paul, Minnesota. 539 pp.
- Cooney, J. M. y D. R. Lauren. 1999. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *Journal of Natural Products*, 62: 681-683.
- Cooney, J.M., D. R. Lauren y L. J. Perry-Meyer. 1997. A novel tubular bioassa for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal / pathogen interface. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 460-462.
- Correa, A., S. Rebuffat, B. Bodo, M. Roquebert, J. Dupont y L. Bettucci. 1995. In vitro inhibitory activity of trichorzianinas on *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Cryptogamie Mycology*, 16: 185-190.
- Cubillos-Hinojosa, J., N. Valero y L. Mejía. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1): 81-86.
- Cutler, H.G., y R. A. Hill. 1994. Natural fungicides and their delivery systems as alternative to synthetics. pp. 135-152. En: C. L. Wilson y M. E. Wisniewski (Eds.) *Biological control of postharvest diseases. Theory and practice*. Department of Agriculture. Washington, D. C. 845 p.
- Deacon, J. W. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne plant pathogens. *Biocontrol Scientific Techniques*, 1: 5-20.
- Davet, P. 1979. Technique pour l'analyse de populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Annales de Phytopathology*, 11: 529-534.
- Donoso, E., G. Lobos y N. Rojas. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque (Valdivia)* [online], 29 (1): 52-57. Consultado el 18/08/2011. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071792002008000100006&script=sci_ar_text.

- Dumas, M. T., G. M. Strunz, N. W. Boyonoski y H. J. Finlay. 1996. In vitro interactions between *Cylindrocladium floridanum* and species of *Trichoderma*. Canadian Journal of Plant Pathology, 18: 325-329.
- Eastburn, D. M. y E. E. Butler. 1988. Microhabitat characterization of *Trichoderma harzianum* in natural soil: Evaluation of factors affecting distribution. Soil Biology and Biochemistry 20: 547-553.
- Elad, Y., I. Chet, y J. Katan. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. J. Phytopathology, 70: 119-121.
- Elad, Y y I. Chet .1983. Improved selective medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica, 11: 55-58.
- Elad, Y. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. Biocontrol Science and Technology, 10: 499-507.
- Elad, Y., Malathrakis, N. E., and Dik, A. J. 1996. Biological control of *Botrytis*-induced diseases and powdery mildews in greenhouse crops. Crop Protection 15: 229-240
- Elad, Y., A. Kalfon e I. Chet. 1982. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton by seed-coating with *Trichoderma* spp. spores. Plant Soil, 66: 279-281.
- Estrada, A. C. 2004. Efectividad biológica de *Trichoderma (Gliocladium) virens* GL 21 sobre hongos fitopatógenos en condiciones In vitro e In vivo. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
- Eveleigh, D. E., A. L. Demain, N. Solomon. 1986. *Trichoderma*: Biology of industrial microorganisms. Biotechnology Research, 16: 489-500.
- Ezziyyani , M. , M. Requena, y M. Candela. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. Anales de biología, 27: 143-153.
- FAO. 2006. Tesoro enterrado: La papa. Revista enfoques de la FAO. Consultado el 16/04/2011. Revista en línea.
- Flores-Moctezuma, H. E., R. Montes-Belmont y R. Nava-Juárez. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from México and its potential

- control through solarization and organic amendaments. *Crop protection*, 25:195-201.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 75-91.
- García P. E. y G. E. Lozoya. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 22 (3): 414-422.
- García, R., A. García y C. Garnica. 2002. Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 13: 24-40.
- Goldman, G. H., C. Hayes y G. E. Harman. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Biotechnology Tibtech*, 12: 478-482.
- González, G. M. 2008. Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad*, 12(3): 147-159.
- Guédez, C., C. Castillo y L. Cañizales. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Control bilógico*, 7 (13): 50 - 74
- Hadar, Y., I. Chet e Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology*, 69: 64-68.
- Haram, S, H. L. Schickler e I. Chet. 1996. Molecular mechanisms of lictin enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Haram, S., H. Schickler, A. Oppenheim y I. Chet. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, 99: 441- 446.
- Harman, G. E., L. R. Mattick, G. Nash y B. L. Nedrow. 1980. Stimulation of fungal spore germination and inhibition of sporulation in fungal vegetation thalli by fatty acids and their volatile peroxidation products. *Canadian Journal Botany*, 58: 1541-1547.
- Harman, G.E., T. Björkman, K. Ondik y M. Soresh. 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Pesticide Management*, 19: 24-29.

- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, y M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2: 43-56.
- Herrera, T. & M. Uiloa. 1990. El reino de los hongos; micología básica y aplicada. Ed. FCE. Universidad Nacional Autónoma de México. 253-425p.
- Howel, C. R. 2003. Mechanims employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1): 1- 8.
- Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet y S. Orduz. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. Contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones In vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3): 451-458.
- Humeres, C. 2004. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre aislados de hongos Basidiomicetes asociados a muerte de brazos en kiwi. Tesis de licenciatura. Universidad de Talca, Chile.
- Inbar, J., M. Abramsky, D. Cohen e I. Chet. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 337-346.
- Inbar, J. e I. Chet. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 141: 2823-2829.
- Inbar, J. e I. Chet. 1997. Lectins and biocontrol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17: 1-20.
- Infante, D., B. Martínez, N. González e Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1): 14-21.
- Iñiguez-Covarrubias, G, M. Iñiguez-Franco, G. Martínez-Gutiérrez y J. Ryckeboer. 2011. Separación de residuos domiciliarios para la preparación de compost y su análisis en la producción de pepinos. *Agrociencia*, 45: 639-651.
- Jensen, D. F. y H. Wolffhechel. 1995. Tue use of fungi, particulary *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. to control root rot and damping-off diseases. In:

- M.T. Heikki y J.M. Lynch (Eds.). Biological Control: Benefits and Risks. Plant and microbial biotechnology research. Cambridge University press. 328p.
- Kataria, H. R., P. R. Verman y V. Gisi. 1991. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. Journal of Phytopathology, 133: 121-133.
- Knudsen, I., J. Hockenhull, D. Jensen, B. Gerhardson, M. Hökeberg, R. Tahvonen, E. Teperi, L. Sundheim y B. Henriksen. 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. European Journal of Plant Pathology, 103: 775-784.
- Lárez- Velázquez, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. Revista UDO Agrícola, 8 (1): 1-22.
- Lewis, J. A. y G. C. Papavizas. 1980. Integrated control of *Rhizoctonia* fruit rot of *Cucumber*. Phytopathology, 70: 85-89.
- Lewis, J.A. & G. C. Papavizas, G.C. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on populations of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. Phytopathology, 75: 812-817.
- Liu, J., S. Tian, X. Menga e Y. Xua. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, 44: 300-306.
- López, B., R. Macías y C. Contreras. 2008. El hongo micoparasítico *Trichoderma virens* promueve el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana* mediante un mecanismo de señalización dependiente de auxinas. Memoria de XVII Congreso Nacional de Bioquímica. Mérida, Yucatán, México. 16-21pp.
- Lorito, M, G. Harman, A. Prieto y C. Hayes. 1990. Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. Phytopathology, 82(10): 10- 77.
- Lorito, M., G. Harman, C. Hayes, R. Broadway, A. Troncoso, S. Woo y A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinase. Phytopathology, 83: 302-307.
- Lorito, M., C. Hayes, A. Di Pietro, S. Woo y G. Harman. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1, 3-glucosidase and

- N-acetyl-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84: 398-405.
- Lorito, M., S. Woo, I. García, G. Colucci, G. Harman, J. Pintor-Toro, E. Filippone, S. Muccifora, C. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun y F. Scala. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Agricultural Sciences*, 95:7860-7865.
- Madi, L., T. Katan, J. Katan e Y. Henis. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology*, 87: 1054-1060.
- Margolles-Clark, E., C. Hayes, G. Harman y M. Penttila. 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2145-2151.
- Martínez, B., L. Fernández y T. Solano. 1994. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. *Cultivos Tropicales*, 15(3): 54.
- Michel-Aceves, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp euascomycetes: hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* Y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: hyphales). Tesis doctoral. Universidad de Colima, Colima, México.
- Monte, E. y A. Llobell. 2003. *Trichoderma* in organic agriculture. Actas V Congreso Mundial del Aguacate, pp. 725-733. Consultado el 20/07/2011. Disponible en: http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p725.pdf.
- Montes-Belmont, R., R. Nava-Juárez, H. Flores-Moctezuma y M. Mundo-Ocampo. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21:300-303.
- Morera, S. L. 2010. TricoFung: Producto biológico a base de *Trichoderma* spp. www.fitoca.com/doc/es-tricofung_dossier-1.pdf. Consultado el 26/06/2010.
- Nge, K. L., N. Nwe, S. Chandkrachang y W. F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Journal of Plant Science*, 170: 1185-1190.

- Núñez, M. y C. Robaina. 2000. Brasinoesteroides. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas para la agricultura. Instituto agronómico (IAC), 23p.
- Ochoa, M. M. 2002. Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Hyphomycetes: hyphales), sobre *Mycosphaarella fijensis*. Tesis de maestría. Universidad de Colima, México.
- Oh, H.S. e Y. H. Lee. 2000. A target-site-specific screening system for antifungal compounds on appressorium formation in *Magnaphorthe grisea*. *Phytopathology*, 90: 1162-1168.
- O'Neill, T. M., Y. Elad, D. Shtienberg y A. Cohen. 1996. Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T39. *Biocontrol Sciences and Technology*, 6: 139-146.
- Ordentlich, A., Z. Weisman, H. Gottlieb, M. Cojocarú e I. Chet. 1992. Inhibitory furanone produced by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*, 31: 485-486.
- Palma- Guerrero, J., H. B. Jansson, J. Salinas, y L. V. Lopez Llorca. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 541-553.
- Paoletti, M.G. y D. Pimentel. 2000. Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *Journal of Agricultural & Environmental Ethics*, 12: 279-303.
- Papavizas, G., J. Lewis y T. Abd-El Moity. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology*, 72:126-32.
- Pavlovicova, R. 1998. Secondary metabolites of the fungus *Trichoderma viride* and its brown mutant M-108. *Biología*, 53(3): 267-275.
- Pérez, C. N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR. Universidad Agraria de la Habana San José de las Lajas, Cuba. 296 p.
- Pérez-Moreno, L., J. Villalpando-Mendiola, C. Castañeda-Cabrera y R. Ramírez-Malagón. 2009. Sensibilidad In vitro de *Sclerotium rolfsii* Saccardo a los fungicidas comúnmente usados para su combate. *Revista mexicana de fitopatología*, 27: 11-17.

- Postmaster, A., J. Kuo, K. Sivasithamparam y D. Turner. 1997. Interaction between *Colletotrichum musae* and antagonistic microorganisms on the surface of banana leaf disc. *Scientia Horticulturae*, 71: 113-125.
- Ramirez -Arredondo, J. A. 1986. Cuantificación de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* Sacc. En suelos con plantaciones de manzano (*Mallus pumila*) en la costa de Hemosillo. Tesis. Universidad Autónoma de Chapingo, Edo. De México. 92p.
- Reyes, R., B. Barranco, G. Gracia y G. Jiménez. 2002. Actividad *In vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, 66: 45 - 48.
- Roach, J. 2002. Save the potato in its andean birthplace. National Geographic news. Jun 2010, 32p.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., M. A. Ramírez-Arrebató, D. Rivero-González, E. Bosquez-Molina, L. L. Barrera-Necha y S. Bautista-Baños. 2009. Propiedades Químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. Revista Chapingo, Serie horticultura, 15 (3): 307-317.
- Rodríguez, V. J. 2002. Efecto antagónico y controlador de algunos microorganismos saprofitos contra *Rhizoctonia solani*, un fitopatógeno causante del (damping-off) en plántulas de tomate. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional mayor de San Marcos, Perú.
- Roller, S. y N. Covill, 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal Food Microbiology*, 47: 67-77.
- Rubio, V. y A. Ferreres. 1995. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. (Cap. 13). En: Biotecnología y medioambiente (I. Marín, J. L. Sanz, R. Amils, editores). Editorial Ephemera. Madrid, España. 312p.
- Ruppel, E., R. Baker, G. Harman, J. Hubbard, R. Hecker e I. Chet. 1983. Field tests of *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. as a biocontrol agent of seedling disease in several crops and *Rhizoctonia* root rot of sugar beet. *Crop Protection*, 2: 399-408.
- Samaniego, G. J. e I. E. Gámez. 2000. Evaluación de residuos para mantener la sanidad de semillas inoculadas con *Trichoderma* spp. En suelo infestado con *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, 18(2): 71-78.

- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100(8): 923- 935.
- Samuels, G, J. y S. A. Rehner. 1993. Toward a concept of genus and species of *Trichoderma*. En: *Pest Management: Biologically Based Technologies*. Lumsden, R. D. and Vaughn, J, L. (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC.186-188pp.
- Sánchez, K. y P. Betanzos. 2006. Aspectos socioeconómicos y culturales en el uso de agroquímicos y plaguicidas en los Altos de Morelos. *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*, 3: 33-47.
- Sandoval, L. y M. Lopéz. 2002. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macrophomina phaseoli* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad*, 4(3): 69- 72.
- Scarselletti, R. y J. Fauli. 1994. In vitro activity of 6-pentyl-?-pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Mycological Research*, 98: 1207-1209.
- Schickler, H. y I. Chet. 1997. Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19: 196-201.
- Siller-Cepeda, J. 1999. Situación actual de la industria hortofruticula en México. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Consultado el 4/07/2011. Disponible en: http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort_03/ Ponencia_04.pdf.
- Stefanova N., A. Leiv, L. Larriganaga y M. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*, 16: 509-516.
- Stefanova, N. M. 1997. Control de enfermedades fúngicas del suelo con biopreparados de *Trichoderma harzianum*. Curso Internacional de Sanidad Vegetal. MINAG. 1-8 pp.
- Stefanova, N.M., y R. I. Sandoval. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de fitopatógenos de suelo. *Boletín Técnico*, 2: 10-22.
- Suárez, M., y F. Momo. 1995. Efectos del herbicida Tribunil (I.A.: Methabenzothiazuron) sobre el hongo celulolítico del suelo

- Trichoderma harzianum*. First International Meeting on Microbial Ecology. México. 70p.
- Terry, E., A. Leyva, y M. Díaz. 2005. Uso combinado de microorganismos benéficos y productos bioactivos como alternativa para la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Cultivos Tropicales*, 26 (3): 77-81.
- Terry, E. A. 2005. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* en almacigueras de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica* plenck). Tesis doctoral. Universidad de Talca, Chile.
- Thiruvudainambi, S, G. Chandrasekar y G. Baradhan. 2010. Potential Antagonism of *Trichoderma* sp. Against *Sclerotium Rolfsii* Sacc. *Plant Archives*, 10(2): 617-620.
- Torres, D. y T. Capote. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 13 (3): 2-6. Consultado el 22/06/2010. Disponible en: [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8016/1/ECO_13\(3\)_02.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8016/1/ECO_13(3)_02.pdf).
- Tronsmo, A., y G. Harman. 1992. Coproduction of chitinolytic enzymes and biomass for biological control by *Trichoderma harzianum* on media containing chitin. *Biological Control*, 2: 272-277.
- Vera, D., H. y H. Valencia. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera del arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 7: 33-40.
- Vero, S. y P. Mondino. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*, 7: 1-10.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. Ghisalberti, R. Marra, S. Woo & M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1-10.
- Virgen, C. G. 2000. Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR): importancia en el crecimiento y fitosanidad. En: Castellanos Z.J. y Guerra O. F. (Eds.). *Memoria de simposio internacional de la fresa*, Zamora, México. 51-63pp.

- Virgen, C. G. y C. A. Estrada. 2004. Importancia de los microorganismos en el manejo integrado de enfermedades en la agricultura sustentable. *Sustentabilidad*, 2 (1): 43-60.
- Wells, H. D., D. K. Bell y C. A. Jaworski. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 62: 442-447.
- Wilhite, S. E., y D. C. Straney. 1996. Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*). *Applied Microbiology & Biotechnology*, 45: 513-518.
- Windels, C. E. y S. E. Lindow. 1985. Biological control on the Phylloplane. (1a Ed.). St. Paul Minnesota. American Phytopathological Society. 169p.
- Woo, S. L., B. Donzelli, F. Scala, R. Mach, G. Harman, C. Kubicek, G. Del Sorbo y M. Lorito. 1999. Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 419-429.
- Xue, L., P. M. Charest y S. H. Jabaji-Hare. 1998. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, 88: 359-365.
- Yadidia, I; N. Benhamoun e I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 1061-1070.
- Yu, T., H. Y. Li y X. D. Zheng. 2007. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 261-266.
- Zuno, F. G. 2008. Efecto de las bacterias endófitas sobre el metalaxil en plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis doctoral. Instituto tecnológico de Durango. Durango, México.