

***EVALUACIÓN DEL PODER ANTAGONISTA DE
Trichoderma sp. FRENTE A DOS FORMAS
ESPECIALIZADAS DE Fusarium oxysporum Y DOS
ESPECIES DE Phytophthora.***

Septiembre
2013

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

AUTOR: Beatriz Lupión Rodríguez

TUTORES : Julio C. Tello Marquina
Diego López Alonso
Ignacio Flores Sánchez.

EVALUACIÓN DEL PODER ANTAGONISTA DE *Trichoderma* sp. FRENTE A DOS FORMAS ESPECIALIZADAS DE *Fusarium oxysporum* Y DOS ESPECIES DE *Phytophthora*.

RESUMEN.

El estudio se llevó a cabo para comprobar la capacidad antagonista “*in vitro*” e “*in vivo*” en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) de dos aislados de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos: *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora capsici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* agentes causales de enfermedades en plantas. El trabajo se desarrolló usando la técnica “*in vitro*” de cultivos pareados en PDA, evaluando el crecimiento radial, micoparasitismo y el efecto de vapores de *Trichoderma*. Para analizar los datos obtenidos del crecimiento, se llevó a cabo una comparación de medias de crecimiento radial detectando diferencias significativas entre ensayos de los distintos fitopatógenos evaluados, y una disminución en el crecimiento de los hongos patógenos con respecto a los testigos, que no fue en todos los ensayos equiparable. Los dos aislados de *Trichoderma*, presentaron alto grado de micoparasitismo en las especies de *Phytophthora*, pero no se apreció en las formas especializadas de *Fusarium oxysporum*. La evaluación “*in vivo*” se realizó en plántulas de tomate del c.v Río Grande donde se inocularon tanto las cepas antagonistas como los de los hongos fitopatógenos anteriormente especificados. En este ensayo no se pudo detectar actividad alguna por parte de *Trichoderma* frente a los fitopatógenos en plántulas de tomate de la variedad Río Grande y la posterior inoculación infectadas con Fol, Forl, K06 y Phy 78. Los aislados de *Trichoderma* no mostraron actividad para las cepas fitopatógenas capaces de causar enfermedad.

Palabras clave: Tomate, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.

ABSTRACT.

This study was carried out to confirm the antagonist capacity “*in vitro*” and “*in vivo*” on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill) of *Trichoderma* sp. on the phytopathogenic fungus: *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (K06), *Phytophthora capsici* (Phy78) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl) which are causal agents of diseases. The study was developed using the technique of “*in vitro*” couplet cultivation in Petri dishes with PDA, was used for evaluating the radial growth, mycoparasitism. also the effect of vapor the *Trichoderma* sp. using inverted dishes. To analyze the data obtained radial growth, was subjected comparison of means the radial growth of various phytopathogenic fungi, to detect statistically significant differences among assays and lower growth respect to control. Both isolates of *Trichoderma* sp. showed a high grade of mycoparasitism with *Phytophthora* species was not appreciated with *Fusarium oxysporum* specialized forms. The “*in vivo*” evaluation was carried out seedlings by applying isolates of *Trichoderma* sp. on tomato seedlings of Río Grande and after inoculation variety infected with Fol, Forl, K06 y Phy 78. The isolates of *Trichoderma* did not show activity of all phytopathogenic strains are able to produce disease.

Key words: Tomato, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (K06), *Phytophthora capsici* (Phy78) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl).

INTRODUCCIÓN

Los efectos de los pesticidas puestos de manifiesto en los últimos años han evidenciado perjuicios para el medio ambiente y para la salud humana y animal. Desde hace años se han buscado microorganismos antagonistas para utilizarlos en el control de la enfermedad de plantas. Numerosos han sido los hongos y bacterias antagonistas que aislados del suelo han manifestado un poder limitante para el crecimiento de patógenos de plantas, incluyendo como tales a los insectos y ácaros (Rincón 2004). Por ello, se han desarrollado investigaciones basados en el uso de microorganismos como agentes de control biológico frente a fitopatógenos

El género *Trichoderma* acoge a hongos saprofitos del suelo que poseen buenas cualidades antagonistas frente a estos patógenos fúngicos del suelo, principalmente los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros (Harnan 2006).

La capacidad antagonista de *Trichoderma* se debe a varios fenómenos: hiperparasitismo, emisión de enzimas extracelulares hidrolíticas como celulasas, quitinasas, proteasas y β -1,3 glucanasas (Stefanova 1997, Yedidia *et al.* 1999, Ezziyyani *et al.* 2003, Harman 2006). Otro fenómeno observado ha sido la antibiosis, mediante la secreción de metabolitos activos secundarios con actividad antimicrobiana, agentes líticos y proteínas (Stefanova *et al.* 1997, Chet *et al.* 1997, Sid Ahmed *et al.* 2000, Dennis y Webster 2004), así como la competencia por el espacio y nutrientes (Elad y Baker 1985, Belanger *et al.* 1995, Fernández-Larrea 2001, Benítez *et al.* 2004).

La metodología más habitual realizada para evaluar el poder antagonista de

Trichoderma en cuanto a su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos, se basa en el enfrentamiento pareado de ambos microorganismos “*in vitro*” en placa PDA.

Mediante esta técnica los diferentes autores han evaluado parámetros como el Radio de Crecimiento del Antagonista (RCA), Radio de crecimiento del Patógeno (RCP) y Micoparasitismo.

Salazar *et al.* (2011), evaluaron mediante algunos de estos procedimientos el antagonismo de *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* que produce la marchitez vascular del tomate; Sid Ahmed *et al.* (2003), así como Ezziyyani *et al.* (2004) trabajaron con *Phytophthora capsici*, causante de la “tristeza” en pimiento, Suárez Mesa *et al.* (2009) evaluaron el efecto sobre *Fusarium solani*; Barbosa *et al.* (2009) en *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*; Hoyos Carvajal *et al.* (2008) lo ensayaron frente a *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* sp. Estos autores entre otros, encontraron resultados positivos en lo que se refiere al efecto antagonista empírico de *Trichoderma* “*in vitro*”.

Por otra parte, las diferentes investigaciones en torno a este antagonista han abarcado ensayos “*in vivo*”, Salazar *et al.* (2011), también evaluaron mediante este procedimiento el antagonismo de *Trichoderma*, frente a *Fusarium* f.sp. *lycopersici* Datfnoff *et al.* (1995) hicieron lo propio con *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, responsable de la podredumbre de raíces y cuello del tomate; Sid Ahmed *et al.* (2000), así como Ezziyyani *et al.*

(2004) trabajaron con *Phytophthora capsici*; Alonso Reyes *et al.* (2002) evaluaron *Sclerototium rolfsii*; Rehman *et al.* (2012) la evaluaron frente a *Rhizoctonia solani*. Todos ellos obtuvieron resultados positivos, aunque en ocasiones con menor eficacia que en el caso de los ensayos “*in vitro*”.

Finalmente existe una metodología de evaluación de antagonismo en la bibliografía consultada, basada en los efectos de vapores emitidos por *Trichoderma* Dal Bello *et al.* (1997), así como Granados (2012) evaluaron su efecto en *Phytophthora nicotinae* var. *parasitica*, y otros hongos patógenos con diversos resultados.

Lo anteriormente mencionado, así como el uso que en campo se está haciendo de *Trichoderma* como antagonista de patógenos en los cultivos, justifica la realización de este estudio.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de 2 aislados de *Trichoderma* como agente antagonista, frente a cuatro especies de fitopatógenos del suelo, realizando para ello diferentes procedimientos:

- 1) Ensayo “*in vitro*”. Confrontación de cuatro hongos fitopatógenos y dos aislados de *Trichoderma* sp.
- 2) Evaluación de los efectos de vapores de desprendidos por dos aislados de *Trichoderma* sp. sobre los cuatro hongos fitopatógenos.
- 3) Evaluación del efecto de *Trichoderma* sp.”*in vivo*” sobre plantas inoculadas con cuatro hongos patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material Fúngico

Como fitopatógenos se emplearon dos especies de *Phytophthora*, *P.capsici* (código de aislado Phy 78), y *P. parasitica* (código de aislado K06), y dos formas especializadas de *Fusarium oxysporum*: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl) (código de aislado Fomex 5) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) (código de aislado Fomex 17), todos ellos procedentes de la micoteca del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad de Almería.

Como antagonistas se evaluaron dos aislados de *Trichoderma* codificadas como 12/31 A T1 y 12/31 A T2, obtenidos de compost agotado de champiñón y depositados para su estudio en el laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad de Almería por el Dr. Francisco José Gea Alegría del Centro de Investigación, Experimentación, y Servicio del Champiñón. Quintanar de Rey (Cuenca).

Los análisis realizados se organizan por grupos de ensayos para facilitar la posterior discusión de los resultados.

Evaluación del poder antagonista “*in vitro*” de *Trichoderma* sp. por confrontación

Para evaluar la capacidad antagonista de los aislados de *Trichoderma* sp. “*in vitro*” con respecto a hongos patógenos de suelo se realizó la técnica de crecimiento pareado (Howell, 2003) en placas Petri de 90 milímetros de diámetro con medio Patata Dextrosa Agar (PDA) (Tello *et al.* 1991). Se situó en un extremo de la placa un disco de 5 mm de diámetro colonizado con el hongo patógeno, extraído con un sacabocados de 5mm del margen de la colonia crecida en PDA.

Poder antagonista de *Trichoderma* sp

Pasadas 48 horas, se colocó en el otro extremo de la placa un disco de 5 mm con micelio crecido de *Trichoderma*. Como testigos se hicieron siembras en placas separadas de inóculos de cada patógeno y de cada hongo antagonista; posteriormente los cultivos se incubaron bajo temperatura de laboratorio de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este procedimiento se repitió tres veces a lo largo del tiempo. Realizando cinco repeticiones por cada cultivo pareado de los cuatro hongos fitopatógenos evaluados, aislados antagonistas y de sus respectivos testigos.

La capacidad antagonista de los aislados de *Trichoderma* se evaluó en varios sentidos:

A) Retraso del crecimiento del hongo fitopatógeno. Para ello, se realizaron medidas del crecimiento radial de cada patógeno (RCP), del crecimiento radial de los antagonistas (RCA), y de sus respectivos testigos comenzando a las 72 horas de la siembra de *Trichoderma*. Con ayuda de una regla se tomó nota en milímetros de la velocidad de crecimiento cada 24 horas durante 10 días consecutivos.

B) Crecimiento de *Trichoderma* sobre el micelio del hongo fitopatógeno. En este caso, se observó si hubo parasitismo (hifas de *Trichoderma* enrolladas sobre las hifas del hongo fitopatógeno). Se realizaron observaciones macroscópicas de los cultivos pareados tomando como índice de micoparasitismo la invasión del antagonista sobre la superficie de micelio del patógeno, la colonización y la esporulación; siguiendo la escala creada por Elías y Arcos (1984), citada por Ezziyyani *et al.* (2004) (tabla 1). Fue necesaria una evaluación microscópica con

400 aumentos, donde se cuantificaron interacciones de enrollamiento de las hifas del antagonista con las del patógeno, tomando 10 localizaciones de la placa Petri donde coexistían ambos micelios.

C) Como método para asegurar lo observado y poder valorar el efecto antagonista se midió si el hongo una vez parasitado moría o quedaba activo. Para ello se hicieron siembras en medios selectivos colocando los trozos de forma lineal. En el caso de *Fusarium*, se hicieron siembras en medios de cultivo Komada modificado (Tello *et al.* 1991) de 8 trozos del frente de unión entre el hongo fitopatógeno y *Trichoderma*.

Para *Phytophthora* se seleccionaron 8 trozos del hongo fitopatógeno colonizado por *Trichoderma* en medio PARPH modificado (Erwin y Ribeiro, 1996).

Ensayo para determinar el efecto antagonista de los vapores de *Trichoderma* sp.

Se probó el efecto antagonista de los vapores de *Trichoderma* sobre los mismos hongos fitopatógenos, confrontando dos placas Petri medio PDA. El procedimiento fue el siguiente: se sembró en mitad de una placa el antagonista mediante un disco de 5 mm donde crecía el micelio y, una vez colonizada toda la placa, en aproximadamente tras 48 horas, ésta se colocó de manera invertida a la del hongo fitopatógeno, tras 24 horas desde su siembra. Para evitar que los conidios de *Trichoderma* pudieran desprenderse al manipular las placas interfirieran con el efecto de los vapores, se colocó un cuadrado de parafilm separando ambas placas antes de confrontarlas. Este procedimiento se repitió tres veces a lo largo del tiempo. Realizando cinco repeticiones por

cada cultivo de placas invertidas de los cuatro fitopatógenos evaluados, aislados antagonistas y sus respectivos testigos.

La capacidad antagonista de los vapores de *Trichoderma* se evaluó en varios sentidos:

A) Detención o no del crecimiento del hongo fitopatógeno: Para ello, se hicieron medidas del crecimiento radial de cada patógeno (RCP) y de sus respectivos testigos a las 72 horas. Con ayuda de una regla se tomó nota en milímetros de la velocidad de crecimiento cada 24 horas durante 10 días consecutivos.

B) Efecto de los metabolitos de *Trichoderma* sobre el micelio del hongo fitopatógeno. En éste caso, se observó si hubo parasitismo, para comprobar que la barrera de parafilm hubiera impedido la colonización por parte de los conidios de *Trichoderma* del medio donde crecía el hongo fitopatógeno.

Evaluación del poder antagonista sobre plantas de tomate inoculadas con hongos fitopatógenos

Se evaluó “*in vivo*” la capacidad antagonista de *Trichoderma*, sobre plantas de tomate, variedad Río Grande sensible a los fitopatógenos estudiados.

Preparación de las plantas: La siembra de semillas se realizó previamente desinfectándolas en una disolución de hipoclorito sódico, 35 gL⁻¹ durante 15 min en agitación magnética. Se aclaró varias veces con agua y se llevó a germinar a cámara húmeda, donde se colocó en la base de la cámara un papel de filtro estéril humedecido con agua destilada, para que las semillas tuvieran suficiente humedad para germinar, se cubrió con otra capa de papel de filtro humedecido. Se cerró la cámara durante

cuatro días; tiempo necesario para que la semilla emita la radícula. Una vez germinada, se colocó al lado de cada radícula una pastillas de 5 mm de micelio de los aislados de *Trichoderma*., y permanecieron en estas condiciones durante tres días, tiempo que se estimó como necesario para que la *Trichoderma* colonizara la radícula.

Pasados estos días, se trasplantaron a macetas de 250 cl con vermiculita y se instalaron en cámara de ambiente controlado (temperatura 24 °C ± 2 °C, 12.000 lux, fotoperiodo 14 h de luz y 10 h de oscuridad) y se mantuvieron en estas condiciones hasta que aparecieron los primeros cotiledones y estuvieran desplegados, preparadas ya para inocular por riego con zoosporas y conidios de los distintos hongos patógenos.

Preparación del inóculo e inoculación:

Los aislados de *Phytophthora* se inocularon mediante zoosporas. Tras haber crecido en placas con medio agar guisante (Tello *et al.* 1991) se entresacaron cortes del hongo con una lanceta esterilizada, y se depositaron en placas estériles siguiendo el orden de extracción.

Posteriormente se vertió en cada placa 20 ml de solución nitrato potásico (KNO₃) al 1^o/₁₀₀; de esta manera se consigue la producción de gran cantidad de esporangios. Las condiciones de incubación fueron de una semana bajo luz fluorescente continua a temperatura de laboratorio.

Tras ese tiempo se eliminó el KNO₃, se aplicaron 20 ml de agua destilada estéril y se incubaron a 9,3 °C durante 1 hora. Pasada la hora se llevó de nuevo a temperatura ambiente de laboratorio durante unos minutos con el fin de conseguir un choque térmico; tiempo suficiente para que los esporangios rompan y liberen las zoosporas

Poder antagonista de *Trichoderma* sp.

simultáneamente. Seguidamente, se filtró el inóculo en un vaso de precipitado de 500 ml con ayuda de un filtro Whatman n° 1.

El filtrado se llevó a un agitador orbital a 100 rpm durante 1 min para conseguir la pérdida de los flagelos y la consiguiente germinación de propágulos. El conteo de propágulos por mililitros se hizo usando una cámara de Neubauer. La concentración del inóculo fue de $1,9 \times 10^6$ zoosporas/mL en *P. parasitica* y $1,7 \times 10^6$ zoosporas/mL en *P. capsici*. Se añadieron 20 mL de la suspensión de inóculo a cada maceta.

En el caso de *Fusarium* se usaron placas con medio PDA de hongos crecidos de For1 y Fol para la preparación de la suspensión de esporas. Para ello, se vertió en cada placa 20 mL de agua destilada estéril y con el uso de una lanceta esterilizada se hizo un raspado suave para separar los conidios del micelio del hongo.

En una cámara de Neubauer se procedió al conteo de conidios cuya concentración de propágulos fue $7,2 \times 10^6$ conidios/mL en For1 y $5,9 \times 10^6$ conidios/mL en Fol. Se añadieron 20 ml de la suspensión de inóculo.

Toma de datos: Una vez inoculadas las plantas con los respectivos patógeno, el ensayo se prolongó durante 30 días, periodo durante el cuál semanalmente se anotaron las plantas muertas o con síntomas. Una vez finalizado el ensayo se procedió a evaluar los síntomas de la enfermedad para todos los patógenos aislados siguiendo la escala de Parke y Grau (1993), donde 0= plantas sanas, 1= podredumbre en raíz secundaria, 2= podredumbre en raíz principal y 3=

podredumbre del cuello y 4= planta muerta. Se calculó el ISE mediante la fórmula,

$$ISE = \frac{\sum(\text{Clase de la escala} \times n^{\circ} \text{ de plantas}) \times 100}{n^{\circ} \text{ total de plantas} \times 4}$$

Para cada uno de los aislados de hongos y *Trichoderma* sp. se realizó el siguiente diseño experimental.

(a) 5 plantas para testigo positivo inoculadas con cada uno de los patógenos, (b) 5 plantas de testigo negativo; inoculadas con cada uno de los dos aislado de antagonistas, (c) 5 plantas testigo blanco; inoculadas con agua, (d) 5 plantas de tratamiento inoculadas con los antagonistas y cada uno de los patógeno.

El ensayo se repitió dos veces en el tiempo, utilizando un total de 150 semillas (75 por ensayo), con cuatro tratamientos para cada una de los aislados de *Trichoderma*.

Métodos estadísticos usados para la comparación de datos.

Los análisis realizados para las comparaciones del radio de crecimiento para los distintos hongos fitopatógenos y los diferentes aislados antagonistas, consistieron en análisis de la varianza (ANOVA) factorial. Empleando para ello el Statgraphics 5.1. Previamente, al tratarse de ANOVA paramétrico se comprobaron las asunciones de normalidad y homocedasticidad.

El método empleado para la comparación de medias fue el procedimiento de mínimas diferencias significativas (LSD) al 95%. Cuando los datos no cumplieron con el criterio de homocedasticidad se sometieron al test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabla 1. Escala para evaluación de la capacidad antagonista (micoparasitismo).

Grado	Capacidad	antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.	
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.	
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.	
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.	
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados se presentan en el orden establecido en los materiales y métodos para facilitar la lectura.

Evaluación del poder antagonista “*in vitro*” de *Trichoderma* sp. por confrontación

Se analizaron los datos obtenidos del comportamiento antagonista de *Trichoderma*. por confrontación en placa.

A) Respecto a *Trichoderma*. ambos aislados evaluados desarrollaron un crecimiento superior a los hongos fitopatógenos. Entre el 5° y 6° día se produce la unión de ambos micelios. Además se observó una inhibición del crecimiento del hongo patógeno en todos los tratamientos con respecto a su testigo sin confrontar e (Gráf 1). Estos resultados coinciden con lo observado por (Sid Ahmed et al. 1999 y 2003, Ezziyyani et al 2004 y 2007, Hoyos- Carvajal et al. 2008, Suárez- Meza et al. 2009, Barbosa et al. 2009, Salazar et al. 2011, Hoyos- Carvajal et al. 2008).

La disminución en el crecimiento de los hongos confrontados con respecto a los testigos puede ser debido al “hiperparasitismo” enzimático que caracteriza a *Trichoderma*, por la producción de compuestos inhibitorios al medio;

metabolitos volátiles y no volátiles capaces de afectar a los hongos aún estando a distancia (Howell 2003 Dennis y Wester 1971), además de utilizar mecanismos para aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno del uso de los recursos (Michel 2001).

En el caso de *Phytophthora*, *Trichoderma* crece por encima del hongo patógeno y esporula sobre ella.

En Pc la disminución del hongo patógeno confrontado oscila en 1,5cm. En el caso de Pp la diferencia es de 1cm.

Otra situación encontrada, en el caso de *Fusarium*, *Trichoderma* no crece por encima del hongo patógeno ni esporula sobre ella.

Fol crece 1cm menos que su testigo sin confrontar. En Forl la disminución de crecimiento oscila en 2cm.

Sin embargo, en la tabla 2 se puede observar que tanto RCA, como RCP no son uniformes en los distintos ensayos, aún tratándose del mismo hongo.

Con esto se quiere indicar que aunque los ensayos se hayan realizado “*in vitro*” y en condiciones de laboratorio se encuentran diferencias significativas (Tabla 2) entre las repeticiones realizadas en el tiempo.

La confiabilidad existente cuando se realizan 2 o 3 ensayos puede evitarnos errores de interpretación que podrían suceder cuando

trabajamos con una repetición en el tiempo o con la media de repeticiones no uniformes. En la bibliografía consultada los ensayos se han realizado con varias repeticiones en el mismo tratamiento, pero no se han encontrado trabajos que reflejen ensayos en el tiempo, por lo que cabe poner en duda si hubieran obtenido resultados uniformes en caso de haberlos realizado.

Una vez dicho esto, merece la pena destacar que estas diferencias se presentan desde un punto de vista estricto y atendiendo a lo que nos indica la estadística, que aunque observando los datos obtenidos, las diferencias de pocos centímetros (0,5cm a 1cm) en el crecimiento radial no son tan significativas como la estadística nos da a entender pudiendo ser debidas a variaciones intrínsecas de la propia cepa o a parámetros externos no controlados (tabla 2).

B) Los resultados obtenidos de la observación y microscópica fueron en el caso de *Fusarium*, un micoparasitismo de grado 0, siguiendo la escala Elías y Arcos (1984, citada por Ezziyyani *et al.* 2004) (tabla 1). Fue evidente la no invasión en cuanto al crecimiento del antagonista sobre la superficie del micelio de *Fusarium* (Fig. 1A, B) donde, al observar al microscopio *Trichoderma* no mostró la capacidad de conducir sus hifas hacia el hongo, ni de enrollarse, ni de penetrar sobre las hifas de *Fusarium* (Fig.3 A, B). Este comportamiento posiblemente se debió a la cubierta de quitina que presenta este tipo de hongo que lo hace ser menos susceptible a la degradación de los metabolitos que produce *Trichoderma* (β -1-3 glucanasas y quitinasas) coincidiendo con lo encontrado por Inbar y Chet (1997). Aunque existen estudios que demuestran que este hongo ha sido atacado por *Trichoderma* (Zago 2006).

En cambio, se ha podido comprobar como *Trichoderma* siguió creciendo quimiotrópicamente hacia *P. capsici* y *P. parasitica* hasta invadir completamente la placa, incluso esporulando sobre ambos oomicetos, iniciando la secreción de antibióticos y de enzimas degradadoras (β -1,3glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) de la pared celular que juegan un papel importante en el micoparasitismo (Fig.2 A, B), siendo de grado 4 según la escala de Elías y Arcos (tabla 1). Al observar a microscopio se pudo comprobar como las hifas de *Trichoderma* se enrollan a las del patógeno (Fig.4 A, B); esta adherencia es producida por la unión de un azúcar de la pared de *Trichoderma* con una lectina presente en la pared del patógeno, (Chet y Elad (1983), citado por Martínez *et al.* 1994).

C) Sin embargo, en el caso de las especies de *Phytophthora*, cuyo micelio fue parasitado, no ocurre una inactivación completa del mismo. Pasados 10 días, se comprobó la actividad de los hongos haciendo siembras en medios selectivos. Para *P. capsici* cuyo resultado fue la presencia de clamidosporas y esporangios germinados en *P. parasitica* y para *Fusarium* se observaron conidios y clamidosporas en formación.

Los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad antagonista de *Trichoderma* no nos permite indicar cual es la propiedad que requiere tener *Trichoderma*. para ser un eficiente biocontrolador. Hay quienes sugieren que el micoparasitismo es el principal mecanismo de acción (Harman *et al.* 1981), a diferencia de Henis *et al.* (1983) que resaltan la importancia de la capacidad de penetración, pero no la única al observar algunos esclerocios de *Sclerotium rolfsii* que fueron penetrados y permanecieron sin degradar en su interior. Por otra parte, García

y Zambrano (1991) sugirieron que la antibiosis parece ser el mecanismo de acción principal para ser un buen biocontrolador.

Por tanto, la capacidad antagonista “*in vitro*” de *Trichoderma*. con respecto a un hongo patógeno en condiciones controladas, permite seleccionar aislamientos con rápido crecimiento, es decir, permite medir competencia y micoparasitismo, pero no representan las condiciones naturales en cuanto al grado de antagonismo y de control biológico. Para ello requiere ser corroborado en condiciones de campo ya que no siempre los hongos que se comportan como antagonistas mantienen esta capacidad potencial bajo las características del suelo y las poblaciones microbianas en sistemas “*in vivo*” (Garveba *et al.* 2004).

Ensayo para determinar el efecto de los vapores de *Trichoderma sp*.

Se observó que los resultados obtenidos en los distintos ensayos no fueron uniformes. Los resultados se resumen en la tabla 3.

En el caso de las formas especializadas de *Fusarium* y *Phytophthora* se puede apreciar diferencias en los distintos ensayos realizados. En estas diferencias se puede ver en el ensayo 1 para ambas formas especializadas de *Fusarium* y ambas especies de *Phytophthora* una inhibición del crecimiento del hongo testigo en comparación

con el hongo evaluado con el antagonista. Centrándonos en el caso de Fol para los dos ensayos siguientes, los datos obtenidos no fueron uniformes.

De igual manera se observa en el caso de Forl que no se encuentran diferencias significativas en el ensayo 3 y experimentando un aumento del crecimiento en el hongo testigo en comparación con los confrontados con el antagonista.

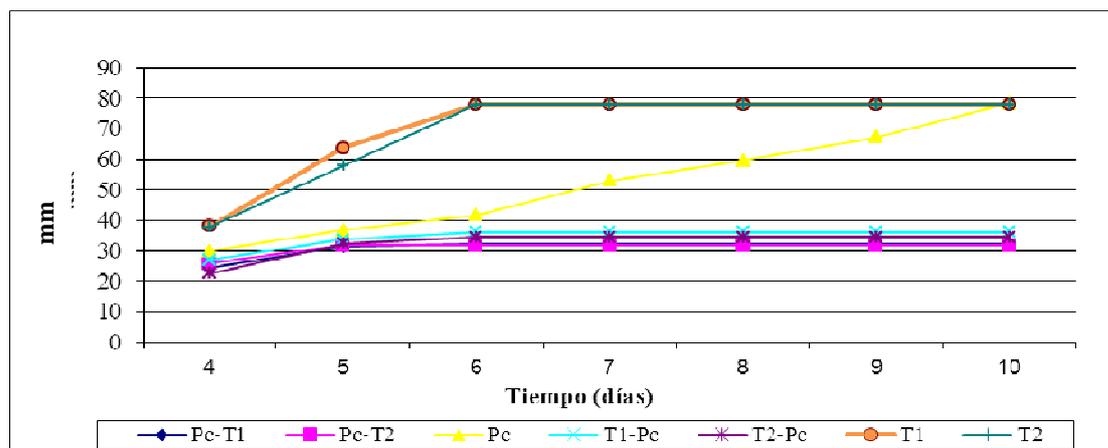
En el caso de *Phytophthora* para el ensayo 3 no se observaron diferencias significativas. (Tabla 3).

Para poder decir un resultado acertado del efecto antagonista que puede tener los vapores de *Trichoderma*. frente a hongos fitopatógenos sería necesario la extracción de estos metabolitos mediante la metodología seguida por Vinale *et al.* (2008), además de un análisis de la producción de componentes gaseosos tales como dióxido de carbono, etanol, propanol, etc. los cuales hacen referencia diferentes autores (Buston *et al.* 1996, Dos Santos y Dhingra 1980) como sustancias que intervienen en la regulación de mecanismos tal como la fungistasis producida por *Trichoderma*. Estudios realizados por Dal Bello *et al.*, siguiendo este procedimiento han demostrado en numerosas especies de hongos fitopatógenos el efecto inhibitorio.

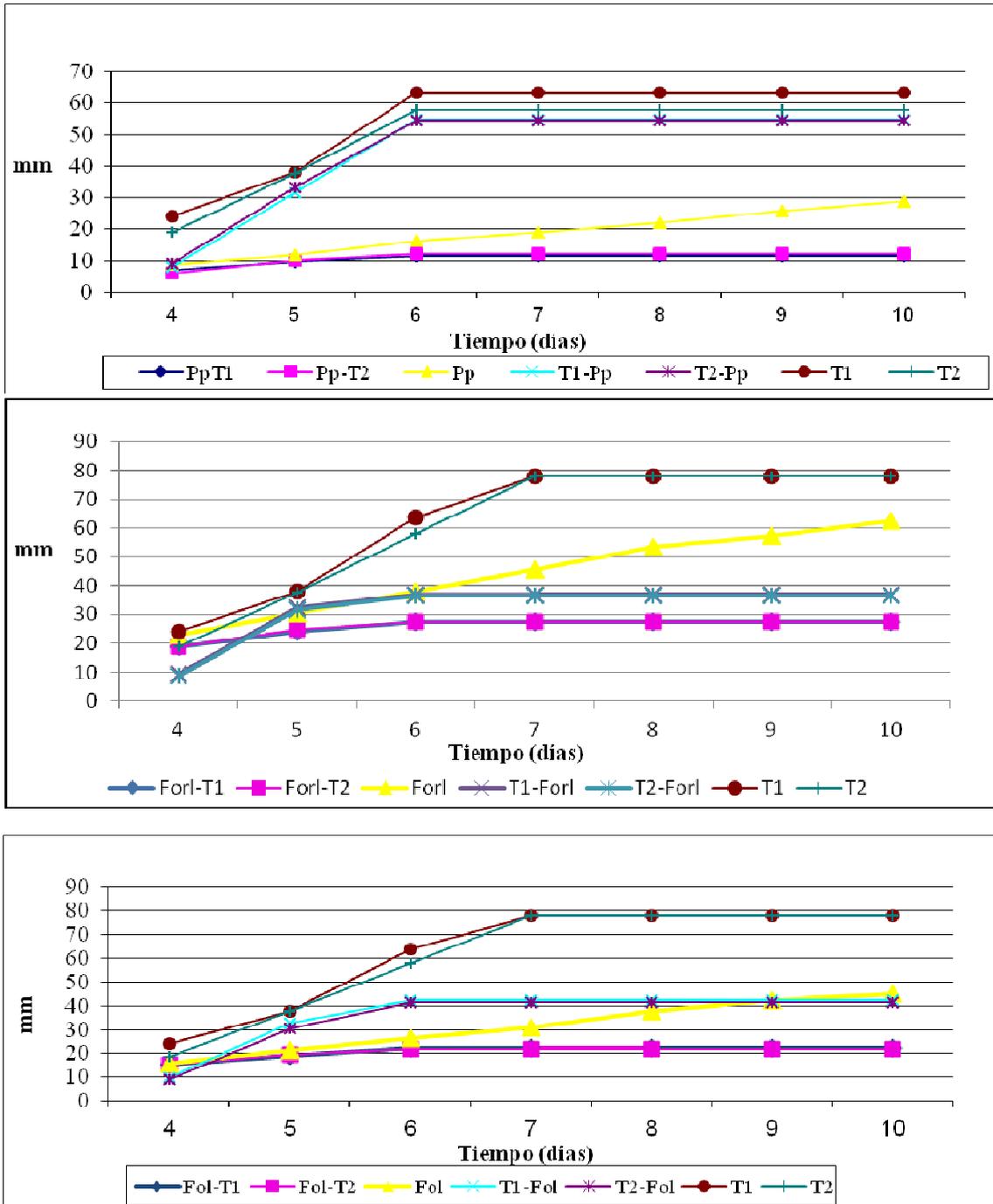
Poder antagonista de *Trichoderma* sp

ENSAYO	Pc-Trich1 (RCP)		Pc-Trich2 (RCP)		Test - Pc		P<0,05	Trich1-Pc (RCA)	Trich2-Pc (RCA)	Test Trich1	Test Trich2
E1	3,0±0,05 b	b	2,9±0,08 b	b	4,0±0,32 a	a	0,000	3,6±0,10 a	3,6±0,04 a	6,2±0,08 a	6,0±0,64 ab
E2	3,5±0,05 a	b	3,3±0,16 a	b	4,2±0,11 a	a	0,000	3,6±0,24 a	3,6±0,09 a	6,5±0,50 a	5,6±0,27 b
E3	3,4±0,10 a	a	3,4±0,08 a	a	3,6±0,27 b	a	0,1365	3,8±0,21 a	4,0±0,04 b	6,5±0,32 a	6,7±0,08 a
p<0,05	0,0011		0,0004		0,0017			0,2480	0,0000	0,0809	0,0143
	Pp-Trich1 (RCP)		Pp-Trich2 (RCP)		Test - Pp			Trich1-Pp (RCA)	Trich2-Pp (RCA)	Test Trich1	Test Trich2
E1	0,9±0,08 a	b	1,0±0,30 a	b	1,6±0,08 a	-	0,000	5,7±0,10 a	5,7±0,19 a	6,2±0,08 a	6,0±0,64 ab
E2	1,3±0,11 b	b	1,4±0,13 b	b	2,0±0,04 b	a	0,000	5,3±0,27 b	5,2±0,44 b	6,5±0,50 a	5,6±0,27 b
E3	2,0±0,12 a	a	2,1±0,04 a	a	2,2±0,08 a	a	0,1009	4,7±0,04 c	4,4±0,02 c	6,5±0,32 a	6,7±0,08 a
p<0,05	0,0000		0,0001		0,0000			0,0001	0,0004	0,0809	0,0143
	Fol-Trich1 (RCP)		Fol-Trich2 (RCP)		Test - Fol			Trich1-Fol (RCA)	Trich2-Fol (RCA)	Test Trich1	Test Trich2
E1	2,1±0,10 b	b	2,2±0,04 b	b	2,7±0,05 a	a	0,000	3,9±0,23 b	4,0±0,19 a	6,2±0,08 a	6,0±0,64 ab
E2	2,3±0,05 a	b	2,2±0,10 b	c	2,5±0,09 b	a	0,000	4,5±0,13 a	4,2±0,23 a	6,5±0,5 a	5,6±0,27 b
E3	2,4±0,16 a	a	2,5±0,00 a	a	2,5±0,05 b	a	0,2818	4,4±0,26 a	4,2±0,13 a	6,5±0,32 a	6,7±0,08 a
p<0,05	0,0213		0,0001		0,0010			0,0156	0,2945	0,0809	0,0143
	Forl-Trich1 (RCP)		Forl-Trich2 (RCP)		Test - Forl			Trich1-Forl (RCA)	Trich2-Forl (RCA)	Test Trich1	Test Trich2
E1	2,6±0,11 b	b	2,6±0,08 c	b	4,6±0,09 a	a	0,000	3,6±0,27 a	3,6±0,20 b	6,2±0,08 a	6,0±0,64 ab
E2	2,8±0,0 b	b	2,8±0,08 b	b	3,8±0,08 b	a	0,000	3,8±0,13 a	3,6±0,13 b	6,5±0,50 a	5,6±0,27 b
E3	3,4±0,22 a	a	3,5±0,44 a	a	3,3±0,16 c	a	0,054	3,8±0,19 a	4,2±0,13 a	6,5±0,32 a	6,7±0,08 a
p<0,05	0,0062		0,0001		0,0000			0,3345	0,0004	0,0809	0,0143

Tabla 2: Media de cinco repeticiones ±SE en centímetros de RCP: Radio de crecimiento del patógeno. RCA: Radio del crecimiento del antagonista. TEST: Medida de hongos testigos. Resultados obtenidos de la confrontación *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* con dos cepas de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (Forl), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol)) y dos cepas de *Phytophthora* (*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Pp) B) *Phytophthora capsici* (Pc)).



Poder antagonista de *Trichoderma* sp



Gráfica 1: Representación de la media de los ensayos 1 y 2. A) *Phytophthora capsici* (Pc) B) *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Pp) C) *Fusarium oxysporum* f.sp. *radialis lycopersici* (Forl), D) *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol). (FolT1, ForlT1, PcT1 y PpT1= crecimiento del hongo fitopatógeno frente a *Trichoderma* 1; y frente a *Trichoderma* 2); (T1Fol, T1Forl, T1Pc, T1Pp = crecimiento de *Trichoderma* 1 y *Trichoderma* 2 frente al hongo fitopatógeno), desde el día 4 al día 10, siendo cada medida la media de cinco placas.

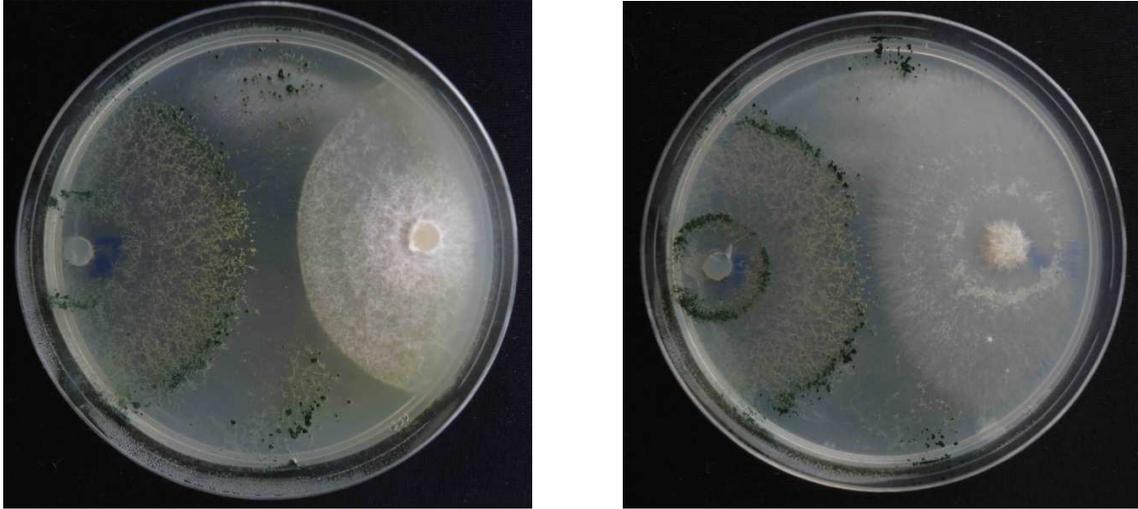


Figura 1: (A) Confrontación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl) en PDA (B) *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) en PDA.



Fig 2: (A) *Phytophthora parasitica* (Pp) y (B) *Phytophthora capsici* (Pc) con *Trichoderma* sp. Colonización de *Trichoderma* sp. en medio PDA.

Fig 4: Micoparasitismo ejercido por el antagonista. Enrollamiento masivo de las hifas de *Trichoderma* sp. alrededor de las hifas de *P.capsici* (A) y *P.parasitica* (B).

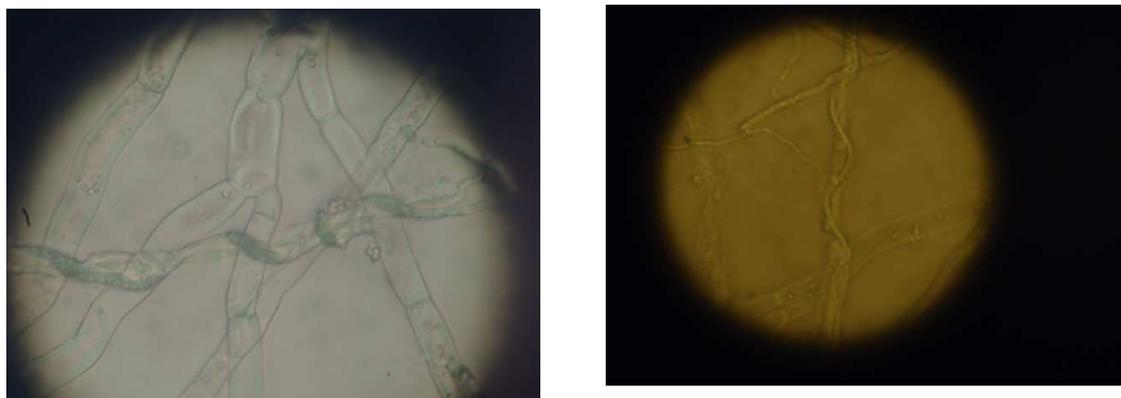


Tabla 3: Crecimiento radial (mm).Resultados obtenidos del efecto de vapores de *Trichoderma* sp. crecidas en placas con medio PDA invertidas con Fol y Forl.

	Ensayo 1	Ensayo2	Ensayo3
T1 FOL	25,8 ± 0,54 a	21,4± 1,34 a	36 ± 1,22 a
FOL	22,4±0,54 b	18,6 ± 1,14 a	31 ± 0,70 b
T2 FOL	26,0 ±1,87 a	20,6 ± 1,81 a	31 ± 2,23 b
P-valor	0,0021	0,0584	0,0013
T1 FORL	34,2 ± 1,30 a	27,6 ± 0,54 b	31,6 ± 1,22 a
FORL	30,6 ± 0,54 b	30,0 ± 0,70 a	31,4 ± 1,14 a
T2 FORL	33,2 ± 1,30 a	27,4 ± 2,07 b	32,4 ± 1,15 a
p-valor	0,0046	0,0121	0,5801
T1 Pc	33,4 ± 1,14 a	27,6±1,14 b	34,0 ± 0,7 a
Pc	28,8 ± 3,11 b	32,8 ± 0,839 a	32,8 ± 1,64 a
T2 Pc	32,2±0,83 a	27,6±1,67 b	34,2±0,83 a
p-valor	0,0157	0,0001	0,1695
T1 Pp	14,6±2,07 a	16,0 ± 0,70 a	25, 0 ± 0,70 a
Pp	6,6 ± 0,89 b	14,0 ± 1,22 b	24,4 ± 2,5 a
T2 Pp	15,2 ± 1,48 a	15,8 ± 0,85 a	24,4 ± 0,54 a
Pp-valor	0,0001	0,0192	0,7739

Estudio del poder antagonista de *Trichoderma* sp. en plantas inoculadas

En el caso de *Fusarium oxysporun f.sp. lycopersici*, ninguna planta con y sin *Trichoderma*. expresó síntomas, aunque si pudo ser reaislado el hongo del xilema. Esto

indica que la causa de la no expresión de síntomas (Tabla 4) no es debida a la acción de *Trichoderma*. sino que las condiciones de la cámara de clima controlado no eran las adecuadas para esta expresión, tal y como señalan (Jarvis y Shoemaker, 1987).

Poder antagonista de *Trichoderma* sp.

En ensayos posteriores, el mismo aislado de Fol sometido a temperaturas elevadas fue capaz de expresar síntomas en tomate. Tampoco se observó el efecto de *Trichoderma* en plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici*. Se observó una podredumbre de las raíces alcanzando el máximo grado en la escala que evalúa el índice de gravedad de la enfermedad (ISE) (Parker. Grau (1993) (tabla 4), demostrando un índice de enfermedad peligrosa para el cultivo.

En el caso de *Phytophthora capsici*, el efecto biocontrolador de *Trichoderma* fue ineficaz, resultando todas las plantas

inoculadas muertas, al igual que las plantas control de *P.capsici*

En el caso de *P. parasitica*, ninguna planta presentó síntomas, pero este efecto no puede ser atribuido a *Trichoderma*. ya que el aislado inoculado no fue capaz de afectar a las plantas con *Trichoderma* ni a las plantas control inoculadas únicamente con el hongo fitopatógeno. Esto puede ser explicado en base a los resultados obtenidos sobre la especificidad parasitaria de algunos aislados de *P. parasitica*. (Pérez Vargas, 2011).

Para ambas especies de *Phytophthora* el reaislamiento del sustrato de las macetas inoculadas fue positivo

	T1-Fol / ISE	T2-Fol / ISE	Testigo Fol / ISE
E1	0% / 0%	0% / 0%	0% / 0%
E2	0% / 0%	0% / 0%	0% / 0%
	T1-Forl / ISE	T2-Forl / ISE	Testigo Forl / ISE
E1	80% / 95%	100% / 100%	100% / 90%
E2	80% / 95%	40% / 70%	100% / 90%
	T1-Pc / ISE	T2-Pc / ISE	Testigo Pc / ISE
E1	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%
E2	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%
	T1-Pp / ISE	T2-Pp / ISE	Testigo Pp / ISE
E1	0% / 0%	0% / 0%	0% / 0%
E2	0% / 0%	0% / 0%	0% / 0%

Tabla 4: T1= *Trichoderma*1 y T2= *Trichoderma*2. Porcentaje de plantas muertas inoculadas con T1 y T2; y porcentaje del índice de severidad de la enfermedad (ISE).

Los resultados muestran, a modo de conclusión, Un efecto antagonista de las dos cepas de *Trichoderma* frente a los patógenos de las plantas ensayadas. Este efecto antagonista se expresó de una manera diferente, mientras que el hongo se desarrollaba sobre el micelio de *Phytophthora* sin llegar a matar al hongo. En el caso de *Fusarium* esa colonización del micelio no se producía.

La dimensión del antagonista fue diferente según el tiempo de ensayo.

El efecto antagonista de los dos aislados de *Trichoderma* se apreció también cuando evaluarón los vapores de estas en el

caso de las formas especializadas de *Fusarium*. En el caso de las especies de *Phytophthora* se apreció una estimulación del crecimiento en vez de una reducción, sin embargo los valores obtenidos disienten de un experimento a otro.

En las condiciones de ensayo, si se exceptúa la inoculación realizada con *Phytophthora parasitica* que no fue patógena sobre tomate, no se apreció ningún efecto protector por parte de *Trichoderma* frente a los dos formas especializadas de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*.

- Alonso Reyes, R., Barranco Martinez, B., Graci Rivero, G., Jimenez Montejó, G. 2002. Actividad in vivo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 66pp. 45-48.
- Barbosa, F., Reinel, J., Meza, S., Libeth, C. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Revista facultad Nacional de Agronomía-Medellín, Universidad Nacional de Colombia vol. 62, núm. 1. 4743-4748 pp
- Belanger, R., Dufuor, N., Caron, J., Benhamou, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Biocontrol Science Technology 5: 41-54.
- Benítez, T., Rincón, A.M.; Limón, M.C., Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Intl. Microbiol. 7(4), 249-260 pp.
- Buston, HW., Moss, MO., Tyrell, D. 1966. The influence of carbon dioxide on growth and sporulation of *Chaetomium globosum*. Trans Br Mycol Soc. 49:387-396
- Chet, I., Benhamou, SH. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium*: Enzymes, biological control and comercial applications.
- Chet I., Ibar, J., Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
- Dal Bello, G., Mónaco, C., Cháves, A. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. ev Iberoam Micol, 14, 131 -13
- Datnoff, L. E., Nemeček, S., Pernezny, K. 1995. Biological control of *Fusarium* Crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intaradices*. Biol. Control 5, 427-431 .
- Dennis, C., Wester, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57, 25-39.
- Dos Santos, AF., Dhingra, OD. 1980. Pathogenicity of *Trichoderma* spp on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* Can J Bot. 60:472-475.
- Elad, Y., Chet, I., Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*- scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73, 85-88.
- Elad, Y., Baker, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 75: 1053.
- Erwin, DC., Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS press. St. Paul, Minnesota. USA. 562 pp.

- Ezziyyani, M., Requena, ME., Pérez Sánchez, C., Egea Gilabert, C., Candela, ME. 2003. Mecanismos de biocontrol de la «tristeza» del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal.
- Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Requena, M.E., Rubio, L., Candela, M.E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.
- Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas 62: 96-100.
- García, R., Zambrano, C. 1991. Evaluación del tipo de antagonismo de *Trichoderma harzianum* ante *Macrophomina phaseolina* in vitro. Harman EG. 1981 *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system) 2001. (Consultado: 12 feb 2007). Disponible en: <http://www.birdhybrids.com/t-22.htm>
- Garveba, P.; van Veen, J.A., van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: Selección of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annu. Rev. Phytopathol. 42 (2), 243-270.
- Harman, EG. 1981 *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, moniliales (asexual classification system) 2001. (Consultado: 12 feb 2007). Disponible en: <http://www.birdhybrids.com/t-22.htm>
- Harman, GE., Kubice, CP. 1998 (Eds.). Volumen 2. p.153-152. Taylor & Francis Ltd., London, UK.
- Henis, Y., Adams, P., Lewis, J., Papavizas, G. 1983. Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. Phytopathology 73(12): 1043-1046.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87:4-10.
- Hoyos, L., Duque, G., Orduz, S. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia*. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 2:1. Pp 76 -86
- Martínez, B., Fernández, L., Solano, T. 1994. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. Cultivos Tropicales 15(3):54
- Michel, A., 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp (*Euascomycetes Hypocreales*), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F.oxysporum* (*Hyphomycetes: Hyphales*). México: Universidad de Colima.
- Parke J.L., C.R, Grau. 1993. *Aphanomyces*. In: Methods for Research on soilborne Phytopathogenic Fungi. Edited by L.L. Singleton, J.D.Mihail and C.M. Rush. APS Press.ST.Paul.Minnesota, 27-30pp.
- Pérez Vargas, M. 2011. Epidemiología y control de *P parasitica* en cultivos de tomate y pimiento bajo abrigo en el sureste
-

peninsular de España. Tesis doctoral de la Universidad de Almería. 211 pp.

Rehman ,U., Lawrence, R., Kumar, J.E., Badri Afroz, Zaffar. 2012. Comparative efficacy of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* and *carbendazim* against damping-off disease of cauliflower caused by *Rhizoctonia solani* Kuehn. JBiopest. 5 (1): 23-27 pp.

Rincón, A. 2004. Mejora de la capacidad antagonista de *T. harzianum* y de las resistencia a patógenos de *Nicotiana tabacum* mediante sobreexpresión de la β -1,3-glucanasa I. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 21pp.

Salazar, L., Sanabria, N., Aponte, G., Alcano, M., Herrera, R., Colmenares, D., Espinoza, M., Alemán, L., Magaña, S. 2011. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp en el control de *Fusariosis* del tomate en condiciones in vitro e in vivo. Bioagro 23 (3): 185-190pp.

Sandoval, I., López, M., García, D. 1995. *Trichoderma harzianum* (CEPA A-34): Un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y el pimiento. Bol. Técnico CID-INISAV (La Habana) N°3.36 pp.

Sid Ahmed, A., Pérez Sánchez, C., Candela, ME. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology 106: 817-824.

Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Candela, ME. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology 109: 418-426.

Stefanova, N.M., 1997. Control de enfermedades fúngicas del suelo con biopreparados de *Trichoderma harzianum*, Curso Internacional de Sanidad Vegetal, PP. 1-8 MINAG.

Suarez Meza, C.L., Barbosa Fernandez, J., Valero, N., Gámez Carrillo, RM., Páez Redondo, A. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mat.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Colombia Biotecnol. Vol. X No.2. 35-43 pp.

Tello, J., Varés, F., Lacasa, A. 1991. Pruebas de patogenicidad. In: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 485 pp.

Vinale F., Marra, R., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, EL., Marra, R., Woo, S., Lorito, M. 2008. *Trichoderma* - plant - pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry 40: 1 - 10.

Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65: 1061-1070.