

20700158

UDCTEPEC

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL GRADO DE MASTER EN CIENCIAS  
ESPECIALIDAD AGRICULTURA SUSTENTABLE**

**TEMA:**

**“EVALUACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO, CUATRO SUSTRATOS,  
DOS METODOS DE ESPORULACION, TRES PORTADORES INERTES  
PARA *Trichoderma* spp., Y SU COMPORTAMIENTO FRENTE A OCHO  
FUNGICIDAS Y CUATRO HONGOS FITOPATOGENOS EN  
LABORATORIO”**

**AUTOR:**

**NORMA ERAZO SANDOVAL**

**TUTOR:**

**Ing. M. Sc. ABRAHAM OLEAS A.**

**Riobamba – 2001**

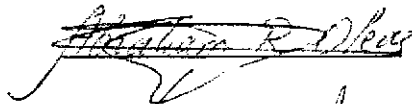
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

MAESTRIA EN AGRICULTURA SUSTENTABLE

El tribunal de tesis certifica que: El trabajo de investigación titulado “EVALUACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO, CUATRO SUSTRATOS, DOS METODOS DE ESPORULACION, TRES PORTADORES INERTES PARA *Trichoderma* spp., Y SU COMPORTAMIENTO FRENTE A OCHO FUNGICIDAS Y CUATRO HONGOS FITOPATOGENOS EN LABORATORIO”. De responsabilidad de la Ing. Norma Erazo Sandoval, ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

Ing. Abraham Oleas A. M. Sc.

**TUTOR**



Ing. Raúl Camacho L. M. Sc.

**PRESIDENTE**



Ing. Amalia Cabezas H. M. Sc.

**MIEMBRO**



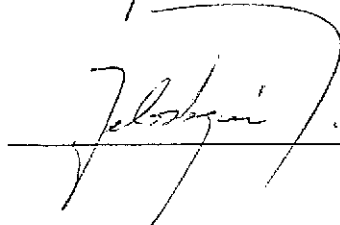
Ing. Fernando Romero C. M. Sc.

**MIEMBRO**



Dr. Ramiro Velasteguí S. Ph. D

**OPONENTE**



Riobamba, abril del 2001.

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento especial y sincero para el Ing. M. Sc. Abraham Oleas A. Tutor de tesis, cuya guía valiosa sirvió para la culminación de este trabajo. De la misma manera, para el Ing. Carlos Ruales E., cuya calidad humana, valiosos conocimientos y experiencia, ayudaron a obtener resultados altamente satisfactorios.

A los Ingenieros Raúl Camacho L., Ramiro Velasteguí y Fernando Romero por las sugerencias realizadas, las mismas que contribuyeron en el mejoramiento de esta investigación.

A mis amigos sinceros, por su ayuda desinteresada.

**INDICE****CONTENIDO****PAGINA**

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ANEXOS

**CAPITULO**

I.	<u>INTRODUCCION</u>	1
II.	<u>REVISION DE LITERATURA</u>	4
III.	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	24
IV.	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	38
V.	<u>CONCLUSIONES</u>	66
VI.	<u>RECOMENDACIONES</u>	67
VII.	<u>RESUMEN</u>	69
VIII.	<u>SUMMARY</u>	71
IX.	<u>BIOBLOGRAFIA</u>	73
X.	<u>ANEXOS</u>	80

## LISTA DE CUADROS

Nº	DESCRIPCION	PAGINA
1	Resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas. Esquema del análisis de varianza.	32
2	Producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de dos cultivos líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas. Esquema del análisis de varianza.	33
3	Producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. en 4 sustratos sólidos a partir de melaza incubada por 48 horas. Esquema del análisis de varianza.	33
4	Viabilidad de las esporas de <i>Trichoderma</i> spp. en 3 portadores inertes. Esquema del análisis de varianza.	34
5	Análisis de varianza para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 3 días.	41
6	Análisis de varianza para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 6 días.	41
7	Análisis de varianza para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 9 días.	42
8	Prueba de Tukey al 5% para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 9 días. Factor A.	42
9	Prueba de Tukey al 5% para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 9 días. Factor B.	43
10	Prueba de Tukey al 5% para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 9 días. Factores AB.	43
11	Prueba de Tukey al 5% para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 9 días. Factor C.	44
12	Prueba de Tukey al 5% para resistencia de <i>Trichoderma</i> spp. a 8 fungicidas, a los 9 días. Factores ABC.	44
13	Análisis de varianza para diámetro (cm) del halo transparente	48

14	Prueba de Tukey al 5% para diámetro (cm) del halo transparente. Factores ABC.	49
15	Análisis de varianza para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de dos medios líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas.	58
16	Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de dos medios líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas. Factor A.	59
17	Análisis de varianza para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos.	60
18	Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos. Factor A.	61
19	Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos. Factor B.	61
20	Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos. Factor C.	61
21	Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos. Factores AC.	62
22	Análisis de varianza para viabilidad de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres portadores inertes.	64
23	Prueba de Tukey al 5% para viabilidad de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres portadores inertes. Factor C.	64
24	Prueba de Tukey al 5% para viabilidad de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres portadores inertes. Factores ABC.	65

## LISTA DE FIGURAS

Nº	DESCRIPCION	PAGINA
1	Producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en granos de trigo durante 15 días, expresado en logaritmo.	38
2	Resistencia de <i>Trichoderma</i> spp a 8 fungicidas. Crecimiento radial en cm de las colonias a los 9 días	46
3	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp con <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Monilia roreri</i> mediante el método de bloques.	47
4	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp con <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp, mediante el método de filtrados.	50
5	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp con <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Monilia roreri</i> mediante placas precolonizadas.	51
6	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp con <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Monilia roreri</i> mediante compuestos volátiles.	53
7	Crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de melaza (M1) a las 24 horas.	55
8	Crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de melaza (M1) a las 48 horas.	55
9	Crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de melaza (M1) a las 72 horas.	56
10	Crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de malta (M2) a las 24 horas.	56
11	Crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de malta (M2) a las 48 horas.	57
12	Crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de malta (M2) a las 72 horas.	57
13	Producción de conidias de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos, utilizando dos métodos de esporulación.	62

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Nº</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
1	Curva de crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp durante 15 días, expresado en logaritmo.	80
2	Producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en amaranto a partir de dos medios líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas.	81
3	Resistencia de <i>Trichoderma</i> spp a ocho fungicidas. Radio de crecimiento en cm de las colonias	82
4	Producción de esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres sustratos sólidos.	85
5	Viabilidad de las esporas de <i>Trichoderma</i> spp en tres portadores inertes.	86



**EVALUACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO, CUATRO  
SUBSTRATOS, DOS METODOS DE ESPORULACION, TRES  
PORTADORES INERTES PARA *Trichoderma* spp., Y SU  
COMPORTAMIENTO FRENTE A OCHO FUNGICIDAS Y  
CUATRO HONGOS FITOPATOGENOS EN LABORATORIO.**

**I. INTRODUCCION**

La práctica intensiva de la agricultura moderna, ha creado la necesidad de realizar controles de plagas y enfermedades mediante el uso excesivo de agroquímicos muy peligrosos, lo que ha traído como consecuencia la eliminación de organismos útiles, contaminación de alimentos y suelo, pérdida de la productividad, contaminación ambiental y crecientes casos de envenenamiento. Además, es evidente, en muchos casos la agresiva dependencia en estos productos, a pesar de que sus costos son cada vez mayores.

En la actualidad agricultores y consumidores aspiran reducir el uso de pesticidas peligrosos, y reemplazarlos por métodos alternativos eficaces de control de enfermedades, afines con el medio ambiente y capaces de contrarrestar la resistencia desarrollada por algunos fitopatógenos importantes a los pesticidas químicos.

Uno de los métodos con gran futuro es el control biológico, el mismo que se ha constituido en el componente fundamental de todo control integrado y ha recibido una gran acogida durante los últimos años, habiéndose obtenido grandes éxitos y resultados prácticos en muchos países. Métodos biológicos orientados al control de plagas, pueden proveer formas sustanciales de protección de cultivos sin pesticidas químicos. Entre los organismos que manifiestan esta cualidad, se encuentran los hongos antagonistas de otros organismos problema para la agricultura, ellos son extremadamente comunes en el medio ambiente y son importantes reguladores biológicos.

Algunos hongos han sido reconocidos, como *Trichoderma* spp., que tiene singular importancia, como antagonista de patógenos del suelo y de la filósfera, por su elevado grado de adaptabilidad ecológica que lo hace común en suelos de todo el mundo. Bajo

diferentes condiciones medio ambientales y sustratos, este hongo es un atractivo candidato para una variedad de aplicaciones de control biológico, que eventualmente, puede reducir el uso, o reemplazar a muchos pesticidas tóxicos. Es entonces, perfectamente factible aplicarlo en modelos de manejo ecológico de importantes enfermedades que afectan a muchos cultivos.

En la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, hasta el momento se han realizado 14 trabajos de investigación sobre aislamiento e identificación de especies de *Trichoderma* a partir de muestras de suelo de las principales zonas agrícolas de la provincia de Chimborazo y pruebas de antagonismo contra fitopatógenos importantes del suelo, como *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia* y *Sclerotium* sp. con resultados altamente satisfactorios.

Ensayos preliminares en Perú y Brasil demuestran que *Trichoderma* spp es un agente potencial en el biocontrol de enfermedades de la filosfera como la moniliasis y escoba de brujas, siendo altamente promisorio su uso bajo un amplio rango de condiciones, por lo que se aspira implantarlo en el manejo integrado del cultivo de cacao en nuestro país. Sin embargo, para convertirse en un agente exitoso de biocontrol, éste debe demostrar un antagonismo deseable, un buen comportamiento ecológico y soportar manipulaciones en formulaciones relevantes y sistemas de liberación. Los propágulos deben conservar su viabilidad y eficacia, lo cual es influenciado por métodos de incubación y vehículos de transporte de esporas adecuados, requerimientos básicos para la comercialización.

## Hipótesis

1. *Trichoderma* spp manifiesta resistencia a los funguicidas más utilizados en la Agricultura.
2. *Trichoderma* spp exhibe una alta capacidad antagónica contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia royeri*.
3. Utilizando sustratos, métodos de producción y portadores de esporas adecuados, se logrará un producto con una alta concentración de conidias, eficaz y de fácil distribución y aplicación.

## Objetivos

1. Determinar la curva de crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp.
2. Evaluar la resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas.
3. Establecer el antagonismo de *Trichoderma* spp con *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia rozeri*.
4. Analizar dos medios líquidos para el crecimiento de *Trichoderma* spp.
5. Evaluar cuatro sustratos para el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp.
6. Evaluar dos métodos de esporulación de *Trichoderma* spp.
7. Evaluar tres sustratos inertes como portadores de esporas de *Trichoderma* spp.

## II. REVISION DE LITERATURA

### A. ANTECEDENTES

Uno de los campos relevantes de la investigación en la Microbiología del suelo, es el relacionado con el uso de pesticidas y los microorganismos. Los diversos pesticidas que se aplican alcanzan el suelo por una o varias vías. Muchos son aplicados directamente en éste, otros son esparcidos en el follaje y parte de ellos cae al suelo. El agua frecuentemente se contamina con pesticidas de una u otra manera, y su uso para irrigación, similarmente añade más químicos a la tierra agrícola. Las tasas de aplicación al suelo de ciertos pesticidas, tales como algunos fungicidas son muy altas y la microflora es expuesta a niveles que podrían afectar seriamente a individuos de poblaciones individuales. El efecto varía con el tipo de químico, algunos pueden ser tan tóxicos a bajas concentraciones, como otros a dosis más altas. Por otra parte, la duración de la efectividad de un pesticida y su persistencia están gobernados por la estructura química, condiciones ambientales y presencia de ciertas poblaciones microbianas (Alexander, 1980).

La supresión de grupos de microbios ha sido probada con muchos herbicidas, insecticidas y fungicidas. Entre éstos, los fungicidas y fumigantes especialmente usados para el control de patógenos del suelo, que son añadidos en altas concentraciones, provocan dramáticas modificaciones en las poblaciones de microorganismos, al punto que, algunos fungicidas, a veces incrementan en vez de disminuir la incidencia de enfermedades (Latimer, 1996).

Sin embargo, es también importante remarcar la versatilidad fisiológica de muchas comunidades microbianas, las que son capaces de mineralizar una gran cantidad de sustancias, incluyendo algunos pesticidas sintéticos; de modo que la presencia de estas comunidades de microbios es fundamental para las posibles transformaciones. Uno de estos organismos potenciales en la descomposición de pesticidas es *Trichoderma* spp., por lo que su incorporación a suelos agrícolas, favorece no solamente al control de importantes patógenos del suelo, sino también a la descontaminación de los mismos (Alexander, 1980). La versatilidad bioquímica de este hongo está demostrada por la habilidad de transformar una gran variedad de sustancias, no solamente de origen

vegetal como, alcaloides, canililina y aflatoxinas, sino también pesticidas como: Alaclor, DDT, Aldrin, Dieldrin, Malathion y Dalapon, compuestos que claramente afectan otros organismos en el nicho ecológico de *Trichoderma* spp. Es manifiesto entonces, que *Trichoderma* puede atacar diversos sustratos incluyendo otros hongos y moléculas bioxénicas, lo que lo habilita para desarrollarse en hábitats particulares (Harman 1998).

## **B. CONTROL BIOLÓGICO EN LA AGRICULTURA SUSTENTABLE**

El control biológico es una herramienta indispensable para el desarrollo de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, el mismo que debe tener como finalidad establecer un equilibrio biológico entre las plagas y sus enemigos naturales, con el fin de restaurar los agro ecosistemas alterados por el uso indiscriminado de pesticidas, que han eliminado muchas poblaciones de organismos benéficos (Beingolea, citado por Gomero, 1995).

El control biológico actualmente es usado en un amplio rango de cultivos y los agricultores empiezan a apreciar las ventajas que presenta, sobre todo por su afinidad con el medio ambiente (Gomero, 1995). Sin embargo, los factores que afectan su uso, como la efectividad de los propágulos y las condiciones externas favorables para la infección, comúnmente limitan el éxito de su aplicación (Dasilva, 1987).

Las enfermedades que se presentan a nivel radicular son las primeras en ser tomadas en cuenta en un programa de control biológico, puesto que tan solo pocos químicos son efectivos contra organismos del suelo y además porque éste es un ambiente bastante favorable para los agentes de biocontrol que la parte aérea de las plantas hospederas (Dasilva, 1987).

## **C. NECESIDAD DE DESARROLLAR FUNGICIDAS BIOLÓGICOS**

La agricultura moderna, basada en el establecimiento de grandes áreas de cultivos, ha originado sistemas ecológicamente no equilibrados, los cuales son presa de enfermedades epidémicas. La prevención de tales epidemias ha sido tradicionalmente atribuida al uso de fungicidas químicos, por lo que los agricultores se enfrentan a patógenos cada vez más resistentes a los pesticidas químicos disponibles; por tanto, hay

la necesidad de tomar nuevas alternativas para combatir enfermedades e impedir que el inóculo se incremente (Kubicek, 1998). Además, los agricultores han reconocido la polución creciente del medio ambiente y el peligro de los residuos de pesticidas en los alimentos.

El reemplazo o reducción en la aplicación de químicos se logra mediante el uso de pesticidas con bases biológicas. Un control biológico incluye el uso de variantes menos virulentas de los patógenos, cultivares más resistentes, o antagonistas microbianos que interfieran con la sobrevivencia del patógeno causante de la enfermedad. Uno de estos antagonistas es *Trichoderma* spp, usado como agente de control biológico de hongos patógenos de plantas, el mismo que puede reducir la habilidad de algunos patógenos para producir o mantener altos niveles de inóculo, como *Botrytis* y *Sclerotinia*, al disminuir la esporulación en el ciclo de infección primaria, así como la acumulación de esclerocios, mediante una combinación de competencia por nutrientes y micoparasitismo directo (Harman, 1998).

Muchos mecanismos de antagonismo han sido demostrados en varios estudios, donde todos ellos parecen ser dependientes de la raza del agente antagónico, del organismo objeto de control y de las condiciones ambientales, por lo que el desarrollo de fungicidas biológicos debe tomar en consideración la selección del agente de biocontrol, el patógeno y las condiciones de su aplicación (Harman, 1998).

#### **D. USO DE *Trichoderma* spp, COMO AGENTE DE BIOCONTROL**

##### **1. Características del género *Trichoderma* spp.**

Aunque el género *Trichoderma* y su asociación con teleomorfos de *Hipocrea* Fr., ha sido conocido desde principios del siglo XIX, fue solo reconocido por los hermanos Tulasne en 1865 y su taxonomía permaneció obscura hasta décadas recientes. Es cosmopolita en suelos y sobre madera y vegetación en degradación. Sus especies son frecuentemente componentes dominantes de la microflora del suelo en una amplia variedad de hábitats, atribuida a la diversa capacidad metabólica y su natural agresividad competitiva (Kubicek, 1998). Es uno de los hongos no patógenico habitante del suelo más estudiado, por su antagonismo con otros hongos incluyendo

patógenos propios del suelo, como *Rhizoctonia solani*, mediante la producción de enzimas quitinolíticas y glucanasas que le permite degradar paredes celulares de otros hongos (Soglio, 1998).

*Trichoderma* spp, utiliza diversos sustratos, incluyendo algunos pesticidas, es de crecimiento rápido y resistente a químicos nocivos. Es un miembro dominante entre la comunidad fúngica del suelo, considerado como un agente secundario de descomposición de la biomasa, e incluso necrofítico y parásito de otros hongos, pudiendo producir además, efectos repelentes mediante la acción de sus metabolitos secundarios. Rara vez ataca a las plantas y más bien promueve el crecimiento vegetal. Por su papel principal como agente de descomposición en el suelo, tiene acción benéfica en todos los ecosistemas, ya que ayuda a mejorar la fertilidad del suelo (Kubicek, 1998).

*Trichoderma* muestra una gran variabilidad genética, muchas razas son efectivas en una gran variedad de hábitats contra diversas clases de patógenos. Se lo ha usado para combatir enfermedades en diversos cultivos como: algodón, uvas, camote, lechuga, cebolla, arvejas, ciruelos, manzanas y zanahorias, causadas por patógenos como: *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* y *Fusarium*. Varios aislamientos han demostrado ser exitosos en invernaderos y campo abierto, en el suelo y la filósfera, y en almacenamientos fríos. *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. virens* han sido reconocidos como efectivos en el control del nematodo *Meloidogyne javanica* en tomate y oca (Kubicek, 1998).

## **2. Mecanismos antagónicos utilizados por *Trichoderma***

Las relaciones de antagonismo entre *Trichoderma* y otros hongos han sido tradicionalmente clasificadas como antibiosis, micoparasitismo y competencia por nutrientes. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por ejemplo el control de *Botrytis* en uvas por *Trichoderma* involucra tanto competencia de nutrientes como parasitismo de esclerocios, lo que provoca la supresión de la habilidad del patógeno para perpetuar la enfermedad (Dubos, 1987). Tanto el parasitismo como la antibiosis pueden estar involucrados en la competencia por nutrientes, pero la producción de metabolitos tóxicos es afectada por el nivel de nutrientes del medio de crecimiento

(Ghisalberti, 1991). Evidencias recientes afirman que los antibióticos y las enzimas hidrolíticas actúan sinérgicamente en el antagonismo micoparasítico (Di Pietro et al., 1993).

Entre los principales mecanismos antagónicos utilizados por *Trichoderma* spp, se puede mencionar los siguientes:

#### a. Antibiosis

*Trichoderma* produce una variedad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben a otros organismos con los cuales no establece contacto físico. Entre las sustancias inhibitoras se encuentran gliotoxina, viridina y gliovirina (Howell y Stipanovic, 1993).

A pesar de que es conocido que este género produce prolíficamente metabolitos secundarios, muy poco se conoce acerca de los factores que determinan su producción, sin embargo, se asume que las diversas razas de *Trichoderma* producen diferentes metabolitos secundarios (Kubicek y Harman 1998). Es conocido que, las especies de *Trichoderma* difieren en sus habilidades para producir varios antibióticos y su producción es afectada por el medio ambiente, tanto en su forma cualitativa como cuantitativa, por lo que antibióticos específicos también afectan a varios patógenos de diferente manera (Claydon et al., 1987).

Kubicek y Harman (1998), mencionan que este género produce varios compuestos químicos, entre otros, se encuentran, a: viridifungina, producido por *Trichoderma viride*; harzianopiridona, harzianolida, dihidro harzianolida, 6 pentil  $\alpha$  pirona (6 PP), 6 penta - 1 - enil  $\alpha$  pirona producidos por *Trichoderma harzianum*; massoilactona y ergokonina A y B producidos por *Trichoderma koningii*; koningina e hidroxikoningina, producidos por *Trichoderma harzianum* y *T. koningii*; 3, 4 dihidroxicarotano extraído de *T. virens*; trichodermina producidos en *T. reesei*, *T. polyspoum*, *T. viride* y *T. virens*; micotoxina T2 es típico de *T. lignorum*.

Los diversos metabolitos secundarios se producen por diferentes vías metabólicas, como: derivados del ácido tricarbóxico; ácidos grasos; aminoácidos; terpenoides,



considerados como los más abundantes y más ampliamente distribuidos en la naturaleza, con varios compuestos volátiles; poliketidos, en este último grupo, el más simple es el 2,8 bis etileno; pyronas, al cual pertenece uno de los primeros compuestos volátiles antifungales aislados de *Trichoderma*, el 6 pentil  $\alpha$  pirona, responsable del aroma a coco, emitido por algunas especies de *Trichoderma* y en especial de aquellos que muestran apreciable inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* (Webster, 1971 citado por Kubicek 1998).

El suelo es un ambiente extremadamente competitivo, donde la producción de enzimas que digieren las paredes celulares, sustancias antifungales y antibacteriales significa la sobrevivencia y la colonización de organismos que ejercen antibiosis y micoparasitismo.

#### **b. Micoparasitismo**

En la interacción entre *Trichoderma* y otros hongos se distingue cuatro estados: a) crecimiento quimiotrófico, en el cual, el estímulo químico proviene del hongo objeto de control; b) reconocimiento específico, probablemente mediado por lectinas sobre la superficie celular tanto del hongo antagonico como del patógeno; c) unión y crecimiento de las hifas alrededor del hospedero y d) secreción de enzimas líticas que degradan las paredes celulares del hospedero (Harman, 1998).

#### **c. Competencia**

La competencia ocurre cuando dos o más microorganismos demandan un mismo recurso disponible. La competencia entre un agente de biocontrol y un patógeno puede resultar en control de la enfermedad, si el crecimiento del antagonista provoca la reducción de la población del patógeno (Harman, 1998). La competencia por nutrientes es el mecanismo más efectivo mediante el cual la microflora previene la infección de las superficies foliares (Blakeman, 1975).

*Trichoderma* está adaptado biológicamente para una colonización agresiva de nutrientes disponibles y persistencia quiescente con clamidosporas y conidias cuando los nutrientes son escasos. Las características saprofiticas de este género está reflejado en

su uso como agente de biocontrol, cuando es inducido a comenzar su crecimiento por la presencia de nutrientes, éste coloniza el sustrato rápidamente, algunas veces empleando antibiosis o micoparasitismo directo contra sus competidores. Su tasa de crecimiento rápida, su prolífica conidiación y utilización de un rango variado de sustratos hacen de *Trichoderma* spp., muy eficiente y de exitosa aplicación como agente de biocontrol, el que usualmente involucra competencia por alguna forma de nutriente, por lo que este mecanismo probablemente es la estrategia más exitosa en el control biológico contra patógenos, basada sobre una rápida y fuerte colonización del sitio o base nutricional, antes de que otros microbios lo hagan (Fokkema, 1993).

#### 1) Competencia en tejido necrótico

Una estrategia de *Trichoderma*, basada en la competencia de nutrientes, es el control de una enfermedad a través de la supresión de la producción de inóculo de *Sclerotinia* o *Botrytis* spp, sobre tejido vegetal senescente (Kohl et al, 1995). Sin embargo el grado de la enfermedad causada por los patógenos facultativos mencionados, está directamente relacionado con su agresividad y con factores ambientales que afectan la habilidad del agente de biocontrol, por lo que la acción competitiva por nutrientes determinará el éxito de las medidas de control biológico (Harman, 1998).

#### 2) Competencia en exudados vegetales

El damping-off causado por *Pythium ultimum* en algunos cultivos, es iniciado por la rápida respuesta del patógeno a los exudados de las semillas. Las semillas tratadas con *Trichoderma* provocan una reducción en la germinación de los esporangios del patógeno, debido a la competencia por estimulantes producidos durante la germinación de algunas semillas (Harman y Nelson, 1994).

Sin embargo, no todos los aislamientos capaces de proteger las semillas del ataque realizan un control a nivel radicular o en la etapa post emergente. Un agente efectivo debe establecerse inmediatamente en la rizosfera y crecer lo suficientemente rápido para mantener una alta densidad poblacional. La competencia por nutrientes también parece ser aquí el mecanismo más potente empleado por algunas razas de *Trichoderma* para el control de *Fusarium oxysporum* (Sivan y Chet, 1989).

### 3) Competencia en heridas

Otra forma de competencia por nutrientes es la colonización temprana de heridas frescas, vulnerables al ataque de patógenos. Estos sitios pueden ser protegidos mediante el empleo de antagonistas promisorios (Fokkema, 1995). Existen ejemplos de control biológico exitoso, usando especies de género *Trichoderma*, como el caso de *T. viride* para el control de *Chondrostereum purpureum* en la filósfera (Corke, 1974). *Trichoderma* spp, previene de esta manera la infección del patógeno radicular *Armillaria luteobubalina* (Nelson et al., 1995).

### **3. Factores que afectan el establecimiento y crecimiento de *Trichoderma* spp.**

*Trichoderma* es un Hyphomycete común del suelo en todas las zonas climáticas del mundo, desde la Antártica hasta los trópicos. Como organismo saprofítico, puede usar un amplio rango de compuestos como fuentes de C y N y pueden secretar una variedad de enzimas, tales como celulasas y hemicelulasas para romper polímeros recalcitrantes a azúcares simples como fuente de energía para su desarrollo.

El hecho de que ha sido aislado de diferentes ambientes, como madera, suelo de jardín, estuarios, pulpa de café, monumentos históricos, objetos de cuero, quistes de hembras de *Heterodera glycine*, le hace muy versátil en su establecimiento y crecimiento. Sin embargo, a pesar de la adaptabilidad ecológica mostrada por miembros del género *Trichoderma*, es necesario considerar la natural sensibilidad de diferentes aislamientos a factores abióticos como temperatura, humedad, pH y nutrientes (Kubicek, 1998).

#### **a. Temperatura**

La distribución de este hongo es grandemente influenciada por la temperatura, esto puede variar su actividad antagonica (Kubicek, 1998). *Trichoderma viride* ocurre en regiones de temperaturas frías, mientras *T. harzianum* es característico de temperaturas abrigadas.

Por otra parte, en el laboratorio, temperaturas bajas son más favorables para mantener la viabilidad de las conidias. Las formulaciones en aceite reducen la viabilidad a 0 después de 20 días a 25°C, mientras que a 2°C, se mantiene entre el 95 y 99% por 40 días. (Prior, citado por Carballo, 1998).

## **b. Humedad**

La humedad es el factor más influyente en la distribución de varias especies de *Trichoderma* en el suelo. Es limitante a la hora de introducir antagonistas para colonizar la filósfera (Elad y Kirshner, 1992). A pesar de que todas las especies parecen prevalecer en suelos ácidos, el comportamiento es diverso cuando se trata de humedad (Kubicek, 1998).

La humedad influye en la fisiología del hongo afectando su crecimiento, incrementa el gasto de energía en la osmoregulación bajo condiciones secas o disminuye la disponibilidad de O<sub>2</sub> en ambientes húmedos, lo que afecta la disponibilidad de nutrientes. Pero, a pesar de las limitaciones ambientales de temperatura y humedad, aplicaciones seriadas apropiadas son útiles para el control de enfermedades de la filósfera durante períodos en los cuales la humedad y la temperatura son inadecuadas para el antagonista, mas aún, junto con un limitado uso de fungicidas químicos ha probado ser una estrategia efectiva para incrementar la consistencia del control biológico (Kubicek, 1998).

Durante el almacenamiento, la humedad es un factor determinante en la supervivencia de las conidias. Cuando las conidias están secas, pueden mantener un nivel de germinación alto, durante 3 meses a 30 °C. La viabilidad de las conidias sin secar y almacenadas a 8°C se reduce de 80 a 6% en 51 semanas y al 0% en más de 60 semanas. Por el contrario, la viabilidad de las conidias secadas en sílica gel, decrece de 95 a 90% a las 51 semanas y a 65% en mas de 60 semanas. A 17°C ocurre algo similar, por lo que la sílica es el factor clave para mantener la viabilidad, debido a que las conidias alcanzan un secado significativo (Moore citado por Carballo, 1998).

El polvo puro de conidias sin formular se puede almacenar en recipientes herméticos a 4°C, donde mantiene una viabilidad del 71% a los 21 meses, si el contenido de

humedad es menor a 10%. Por otra parte, el uso de cal viva como desecante durante el almacenamiento de polvo sin formular permite conservar un 83% de la viabilidad a los 6 meses (Feng, citado por Carballo, 1998).

### **c. pH**

*Trichoderma* spp, prevalece en suelos ácidos. En el laboratorio, el pH es el parámetro clave para su manipulación, tanto para el crecimiento como para la esporulación. A pH fijo, la relación C/N tiene una limitada influencia sobre la producción, pero es crítica para la sobrevivencia luego del almacenamiento. La longevidad mas alta de las esporas se obtiene con una relación media de C/N 14 y pH 7, ellas sobreviven hasta después de 45 días de almacenamiento. Las conidias obtenidas en estas condiciones permanecen viables bajo un amplio rango de humedades relativas durante el almacenamiento, lo que indica que ellas podrían ser más sostenibles en el campo (Agosin, 1997).

### **d. Nutrientes**

Cuando se considera una producción de *Trichoderma* spp., se debe añadir nutrientes exógenos, con lo cual se garantiza la germinación de las conidias. La disponibilidad de nutrientes es crítica, las conidias deben tomar suficientes cantidades de agua e hincharse considerablemente antes de emitir el germotubo, pero esto no ocurre si no están expuestas a suficientes nutrientes (carbono y fuentes de nitrógeno), los nutrientes además afectan la edad de las esporas (Danielson y Davey, 1973).

### **e. Exposición a la luz solar**

La vida media de las conidias aplicadas en hojas expuestas a la luz solar es de aproximadamente dos horas, debido a que la luz ultravioleta (295-320 nm) provoca su muerte (Carballo, 1998).

### **f. Tiempo de almacenamiento**

El tiempo de almacenamiento está influenciado por la temperatura y la humedad, las que interactúan y determinan la viabilidad de las conidias. En condiciones de baja humedad el tiempo de almacenamiento se incrementa y la viabilidad es alta. CATIE,

conserva las diferentes cepas en agar – papa - dextrosa ( PDA), a – 20°C, la que se renueva cada 2 años (Carballo, 1998).

## **E. APLICACIONES DE *Trichoderma* EN LA AGRICULTURA**

Las habilidades antifungales de *Trichoderma* se han conocido desde 1930 y desde entonces se han realizado muchos esfuerzos para usarlo como agente de biocontrol, pero solo recientemente, este hongo está siendo usado comercialmente (Kubicek, 1998). Combinaciones del agente de biocontrol y fungicidas o enzimas purificadas y fungicidas ya han sido propuestas, como vías alternativas de control biológico (Lorito et al, 1996).

Se debe considerar que los productos que contengan este hongo deben estar dirigidos hacia usos específicos, los cuales deben ser desarrollados en función del problema en particular.

Entre las principales aplicaciones de *Trichoderma* en la agricultura se mencionan:

### **1. Biocontrol contra patógenos de plantas**

*Trichoderma* es un género conocido, que produce varios tipos de enzimas como, liasas, proteasas, lipasas, etc., las cuales pueden ser usadas para la degradación de paredes celulares de patógenos fúngales. Algunos de ellos actúan sinérgicamente para impedir la elongación de germotubos, otros provocan cambios morfológicos, como ápices de hifas hinchadas, las que revientan; pérdida gradual de citoplasma; formación de numerosas septas e inhibición del crecimiento fúngal. Entre los compuestos involucrados en estas alteraciones se encuentran: 78 kDa  $\beta$ -1,3 - glucanasa; 72 kDa N-acetil-glucosaminidasa; 43 kDa  $\beta$ -1,6-glucanasa (Lorito et al, 1994).

Existen muchos ejemplos sobre la acción positiva de este agente biológico sobre algunos patógenos de plantas, no solamente a nivel del suelo sino también en la filósfera. Así: de 118 aislamientos de *Trichoderma spp* para establecer antagonismo contra *Rhizoctonia solani* el 74% resultaron positivos a nivel de laboratorio (Askew, 1993).

Neill, (1996), estudió a *Trichoderma harzianum* para el control biológico de *Botrytis cinerea* sobre heridas en tallos de tomate. Determinó que cuando se inocularon los dos hongos, la incidencia de tallos infectados fue reducida en un 62 - 84%, la severidad de la infección en un 68 - 71% y la intensidad de la esporulación en un 87%. Esta investigación se realizó, debido a que los métodos culturales han fallado y los fungicidas para el control de este patógeno como los benzimidazoles y dicarboximidas provocan resistencia dentro de un período relativamente corto. Esto es el fundamento, para considerar a este género como altamente efectivo cuando se lo aplica sobre inflorescencias y frutos.

En frutilla, se ha conseguido muy buenos resultados, aun a bajos volúmenes con formulaciones líquidas aplicadas sobre flores. Sin embargo, para conseguir un máximo control de la pudrición causada por *Botrytis* spp, Neill, (1996) recomienda mezclarlo con Iprodione, porque al parecer hay una acción sinérgica, mucho más efectiva que cuando se aplica el agente de biocontrol o fungicida solos.

*Trichoderma* spp, actúa también sobre *Alternaria solani*, donde se destaca su alta capacidad competitiva, mediante hiperparasitismo y antibiosis (Martínez y Solano, 1995). Sin embargo, una de las utilidades más grandes, corresponde a la protección de semillas u otros materiales de propagación.

La protección de semillas contra patógenos del suelo necesita ser efectiva por un corto período, entre 7 y 14 días y a largo término a porciones subterráneas de plantas (Harman, 1991). Algunas razas son competentes de la rizósfera e incrementan su biomasa, lo que les da una ventaja importante para tratamientos de semillas (Harman, 1998).

A pesar de que algunos fungicidas químicos, usados a bajas dosis para protección de semillas, son relativamente baratos y fácilmente disponibles, traen impactos negativos en el medio ambiente. Sin embargo, es innegable que son efectivos por un corto tiempo (menos de un mes), aunque no se difunden en el suelo con el sistema radicular como lo hace un agente biológico; por lo que es muy razonable que se use tratamientos químicos en combinación con un tratamiento biológico apropiado y *Trichoderma* es un

excelente candidato para el control integrado, pudiendo ser usado como protectante de semillas y para colonizar y proteger raíces. La combinación efectiva del hongo con fungicidas químicos, provee buena protección a largo tiempo. De esta manera, las cosechas frecuentemente se incrementan mucho más, que cuando se aplican tratamientos químicos solos. Al respecto muchos investigadores sostienen que algunos agentes de biocontrol podrían ser usados para incrementar el potencial de algunos pesticidas, como el caso de *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger*, etc. (Harman, 1998). Bhatnagar, (1995), investigó a estos organismos, los cuales al ser incluidos con los fungicidas: Foltaf 80W (Captafol 80%) y Cobre-50 para el tratamiento del marchitamiento de *Cajanus cajan*, controlaron más efectivamente la enfermedad que cuando los fungicidas fueron usados solos (Harman, 1998).

Además, sistemas de control biológico puro también son adecuados, sobre todo para el manejo de cultivos orgánicos, los cuales están experimentando un mercado creciente y donde este hongo resulta muy valioso (Harman, 1998). El organismo al colonizar partes subterráneas, incrementa la masa de raíces saludables y consecuentemente incrementa la absorción y producción.

La colonización es la clave para lograr un control superior con un agente de control biológico en nichos inexplorados por medidas químicas (Kubicek, 1998). Por ejemplo, la rizósfera es colonizada completamente por *Trichoderma*, logrando una protección inalcanzada por el control químico. Este agente de control biológico coloniza competitivamente, mediante una variedad de mecanismos antagónicos, evitando el desarrollo de resistencia de patógenos, que frecuentemente sí lo hacen con fungicidas químicos obsoletos.

## **2. Compost enriquecido**

Muchos materiales orgánicos son descompuestos gracias a la acción de microorganismos. Las propiedades físicas y químicas de los materiales descompuestos son muy útiles como mezclas para siembras en invernaderos y en campo abierto. Dependiendo del proceso de compostaje y de la comunidad microbiana que llegue a establecerse, el compost puede ser altamente favorable o supresivo para el



establecimiento de patógenos que causan pudrición radicular como: *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* spp, (Hadar et al, 1992).

En la elaboración del compost, cuando desciende la temperatura, lo cual es un indicativo para que los materiales biodegradables sean utilizados, el material es recolonizado por organismos mesófilos desde las capas más externas del compost y las sustancias húmicas, ligninas y biomasa microbiana incrementan en cantidad. Entre estos organismos se encuentran los de tipo benéfico que ejercen biocontrol, como bacterias de los géneros: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, y hongos del género *Trichoderma* (Hoitink et al, 1991).

Si el compost ha sido apropiadamente preparado ejerce una acción supresiva en contra de patógenos, como *Pythium* y *Phytophthora*. El material libera lentamente los nutrientes, manteniendo, por tanto, altos niveles de actividad microbiana, lo que le da características supresivas, y es esta cualidad la esencia del control biológico asociado con la agricultura orgánica, donde los altos niveles de materiales orgánicos parcialmente descompuestos son mantenidos en el suelo (Harman, 1998).

El control de *Rhizoctonia solani*, sin embargo es completamente diferente, debido a la presencia de esclerocios, solo un limitado grupo de organismos es capaz de ejercer supresión de este patógeno, *Trichoderma* es uno de ellos, cuando se lo añade a composts preparados (Kuter et al., 1983), pero el resultado es mucho más efectivo cuando se lo combina con bacterias del género *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (Harman, 1998).

Por los antecedentes mencionados, una de las estrategias es la preparación de composts enriquecidos, que provean control contra un amplio rango de hongos patógenos de plantas, es decir que sean tan efectivos como el mejor fungicida químico para el control de enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* y especies de *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*. La Agencia para la protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) lo ha desarrollado con *T. hamatum* y *F. balustinum* (Harman, 1998). Recientemente se ha demostrado que un compost enriquecido, además de ser supresivo, permite que las plantas que crecen en él adquieran resistencia a un amplio rango de patógenos, similar a la resistencia sistémica adquirida, provocada por la microflora asociada con el sistema

radicular y entonces otras enfermedades de la filósfera también pueden ser controladas (Zhang et al, 1996).

### **3. Estimulador del crecimiento de plantas**

Muchos aislamientos de *Trichoderma* han sido mencionados como estimuladores de crecimiento (Harman, 1998). Sin embargo, aunque la habilidad de algunas especies como promotoras directas del crecimiento de las plantas ha sido notada por muchos años, los esfuerzos para definir y aprovechar estas influencias han encontrado logros limitados (Lindsey y Baker, 1967),

Si *Trichoderma* crece y esporula profusamente con mínimos requerimientos nutricionales, produciendo metabolitos secundarios, como enzimas degradativas incluyendo quitinasas y celulasas, transformando una amplia variedad de sustratos orgánicos de origen natural o xenobiótico, no es, sorprendente que este hábil colonizador haya sido promovido como agente de biocontrol y estimulador de crecimiento a la vez (Harman, 1998).

Chang et al., (1986) observaron que la estimulación del crecimiento vegetal resulta en un incremento en la germinación, rápida floración y aumentos en el peso fresco de los órganos vegetales. El crecimiento vegetal fue demostrado en maíz, tomate, tabaco, rábano, pepinillo, azalea, érica, begonia, clavel, crisantemo, rosas y ciclamen. El estudio incluyó tasas de germinación, peso seco y emergencia. El efecto positivo de *Trichoderma* en la zona radicular muestra mejor resultado en plantas jóvenes en pleno desarrollo.

Es evidente que la adición de aislamientos de *Trichoderma* a la rizósfera puede resultar en un incremento de crecimiento, pero las diversas especies difieren en sus habilidades para mantener sus poblaciones en la rizósfera en ausencia de fuentes de alimento externo (Harman, 1982). Una raza de *Trichoderma harzianum* fue capaz de penetrar y vivir en las raíces de las plantas de una manera similar a los hongos micorrizicos (Kleifeld y Chet, 1992). Kubicek y Harman 1998, mencionan a *Trichoderma harzianum* y *T. koningii* como productores de compuestos reguladores de crecimiento, entre otros se encuentran harzianopyridona, 6 pentil  $\alpha$  pirona, koningina y ciclonerodial;

por lo que investigaciones en este campo encierra muchas expectativas dentro del campo agrícola.

#### **4. Control integrado**

Usando controles químicos y biológicos, la duración del control activo de la enfermedad será prolongada. Los protectantes químicos son efectivos bajo ciertas condiciones climáticas o ciertos niveles de presión de alguna enfermedad, en la cual el antagonista biológico es menos efectivo, mientras un activo control biológico puede profilácticamente colonizar heridas o tejido vegetal senescente (Harman, 1998).

Las medidas de control integrado pueden ser sinérgicas. Cantidades reducidas de fungicida pueden debilitar al patógeno y ponerlos más susceptibles al subsecuente ataque por el antagonista (Lorito et al, 1996).

### **F. PRODUCCION INDUSTRIAL DE CONIDIAS**

#### **1. Características**

Una significativa ventaja de *Trichoderma*, es la de poder ser cultivado en un amplio rango de fuentes de carbono y nitrógeno, donde puede ser inducido a producir tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidias (Papavizas, 1985).

Durante la producción de propágulos, es importante manejar algunos factores que influyen directamente en su calidad. Las hifas no pueden sobrevivir después de un secamiento rápido, por lo que su biomasa no es útil (Jin et al, 1991). Las clamidosporas se consideran como propágulos promisorios para programas de biocontrol, debido a que son capaces de sobrevivir en el suelo por largos periodos (Lewis y Papavizas, 1983). Sin embargo, la producción de clamidosporas toma de dos a tres semanas, por lo que, las conidias han sido los propágulos más fácilmente producidos en varios sistemas de fermentación y más ampliamente utilizados en programas de biocontrol (Elad et al, 1993), pues son resistentes al secamiento (Harman et al, 1991)

Algunas razas de *Trichoderma* han sido patentadas por su habilidad para el control de ciertos hongos fitopatógenos, sin embargo, su capacidad para esporular abundantemente en cultivo es raramente reportada. La conidiogénesis es lograda mediante manipulación de los niveles de nutrientes. La relación C/N juega un papel importante en la longevidad de las esporas y un medio que contiene una relación C/N de 14:1 provoca la producción de conidias más longevas. Además, los metabolitos que son sintetizados durante el crecimiento también desempeñan un rol importante en la sobrevivencia de las conidias (Harman, 1998).

Para producir conidias es necesario reducir la producción de hifas. Cuando el hongo forma esporas, casi inmediatamente después se produce la germinación de las mismas con un limitado crecimiento vegetativo, esto es llamado "conidiación microcíclica" (Smith et al, 1981).

El estrés ambiental afecta la calidad de las esporas. El calor aplicado al final de la fase de esporulación promueve una biomasa conidial con alta viabilidad y resistentes al calor (Pedreschi et al, 1997).

## **2. Métodos de producción**

Uno de los métodos para producir propágulos es la fermentación sólida, que consiste en el crecimiento sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre. A pesar de que en sus inicios (1000 años antes de Cristo) fue ideado en Asia para la producción de alimentos, solo muy poco se lo ha usado en países del oeste moderno. Sin embargo, se han desarrollado diversos procedimientos, los mismos que han tenido éxito para la producción de agentes fungales que controlan a varios fitopatógenos.

En el laboratorio, la producción de esporas ha sido desarrollada mediante fermentaciones sobre sustratos sólidos para un amplio rango de hongos (Weber, 1996). Este sistema tiene cuatro componentes: a) aire, en un sistema continuo que fluye a través de una cama sólida; b) fase sólida, que está compuesta de un soporte insoluble al agua; c) una solución acuosa de nutrientes que está absorbida dentro de la matriz del soporte y d) el hongo, el cual crece dentro del soporte y/o sobre la superficie y/o en el espacio libre interparticular. Es reconocido que los procesos de fermentación sólida

tienen algunas ventajas como: una productividad superior, son simples y requieren poca energía y permiten una esporulación natural del hongo (Harman, 1998).

Otro sistema para la producción de hongos agentes de biocontrol es el cultivo difásico. La fase sólida puede consistir de diferentes sustratos, los que se colocan sobre un soporte de malla, que permite que el hongo crezca sobre ambas superficies del soporte, duplicando así el área útil de crecimiento y esporulación. La cosecha y almacenamiento de las esporas en estado seco, evita la germinación antes de la aplicación en el campo (Grillo, 1996).

En Brasil, se emplean diferentes tecnologías para la producción de *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae*, pero la más extendida consiste en el uso del arroz como sustrato, el cual se deposita en bolsas de polipropileno que resisten el autoclavado. Este método también es aplicado para muchos hongos de interés agrícola, como *Trichoderma* spp.

Durante el crecimiento bajo condiciones controladas, se distinguen dos etapas muy bien definidas: la primera corresponde al crecimiento vegetativo y la segunda a la de esporulación. Los requerimientos ambientales son distintos en ambas fases para lograr el crecimiento y esporulación rápidos y elevados. Durante el crecimiento micelial se requiere una alta humedad ambiental y una temperatura entre 26 y 28°C, el crecimiento es independiente de la luz. La esporulación, por el contrario requiere de una baja humedad ambiental y temperaturas de alrededor de 30°C y alta luminosidad. En estas condiciones se obtiene la máxima esporulación del hongo a los 6 días. Este método es empleado para hongos como *Metarrhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* y *Trichoderma* spp. Con esta técnica se reduce el tiempo de esterilización a 5 - 10 minutos a 120 °C, se aumenta el área de cultivo y se obtiene una esporulación en 7 - 8 días a 26 - 30 °C (Batista, citado por Grillo, 1996).

### **3. Formulación, control de calidad y liberación**

Las formulaciones biológicas y sistemas de liberación de *Trichoderma* deben proveer un control efectivo y consistente, sin daños al medio ambiente. Para lograr un uso potencial de este hongo, no solo para controlar enfermedades sino para estimular el

crecimiento vegetal, es necesario implementar alternativas en su producción y aplicación. Ello implica no solamente trabajar con una raza superior, un sistema de producción adecuado, en el que se utilicen materiales apropiados, sino también, sistemas de liberación que provean propágulos adecuados para determinadas condiciones, que le permitan su rápido crecimiento y proliferación. Las razas que demuestren un gran potencial deben ser producidas en grandes cantidades listas para su uso, es decir la preparación debe contener altos niveles del organismo, debe ser uniforme y efectiva para la mayoría de aplicaciones con equipos agrícolas convencionales y de bajo costo. Además, debe ser producida en formulaciones que no requieran sistemas de refrigeración u otro almacenamiento especial (Jin et al, 1991).

Sin embargo, el método de aplicación es crítico, debido a que pueden requerir de adyuvantes y en muchos casos para lograr resultados exitosos es necesario usarlos en combinación con fungicidas y con un determinado valor de pH o sistema de manipulación particular. Pero, la mejor manera de usar un agente de biocontrol específico debe ser la más fácil y económica (Harman, 1998).

La comercialización de pesticidas basada en hongos, requiere un control de las propiedades biológicas, físicas y químicas, que aseguren al usuario un producto con la máxima eficacia de control en el campo (Posada, citado por Vélez, 1997). A menos que las alternativas de manejo de plagas sean simplificadas, efectivas y menos costosas, los agricultores resistirán a la sustitución de programas en los que se usen pesticidas convencionales, (Latimer, 1996). Por ello, el desarrollo de formulaciones apropiadas es esencial, en donde el agente vivo debe ser afin con uno o varios ingredientes inertes que permitan que el compuesto final sea efectivo (Daoust, citado por Carballo, 1998).

Existen algunos tipos de formulaciones desarrolladas, como granuladas, polvo y líquidas. En las formulaciones granulares se encuentra micelio y conidias en gránulos de alginato "pellets" (Knudsen, Hidalgo citados por Carballo, 1998). *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*, Miller), cuyo estado sexual posiblemente sea *Hypocrea gelatinosa*, fue formulado como una preparación granular en alginato y en polvo en vermiculita, los cuales se usaron con éxito en el combate de damping – off de hortalizas y plántulas ornamentales causadas por patógenos del suelo *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, en invernadero. Al parecer el metabolito que produce este hongo

es gliotoxina u antibiótico epipolythiopiperazina-3,6-diona, el cual tiene actividad antibacterial, antifungal, antiviral y antitumoral (Lumsden, 1995).

Las formulaciones en polvo utilizan como portadores inertes attapulgita, motmorillonita, kaolinita, diatomita, talco y polvos orgánicos. Las formulaciones líquidas en aceite mantienen un grado alto de viabilidad de las conidias, sin embargo otros líquidos como aceites de petróleo, ácidos orgánicos y agua afectan la sobrevivencia de conidias. Las formulaciones basadas en aceite (maní y soya) favorecen la adhesión, aumentan la supervivencia y pueden aplicarse con equipos de bajo volumen y ser muy efectivos en el campo (Daoust, citado por Carballo, 1998).

Daoust (1998), sostiene que el término formulación implica alteración del ingrediente activo o adición de compuestos, con el objetivo de mejorar su actividad, conservación y aplicación, con lo cual se pretende no dañar las conidias, mejorar su vida media y efectividad durante el almacenamiento y aplicación, aumentar la estabilidad (propiedades físicas y biológicas) durante el almacenamiento y después de la aplicación, permitir su fácil aplicación con equipos convencionales, mejorar su eficacia en el campo, favorecer la cobertura en el cultivo, garantizar la eficacia contra el organismo objeto de control, bajo costo de producción y no ser perjudicial para el ser humano y las especies benéficas.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### A. LUGAR EXPERIMENTAL

Esta investigación se realizó en el laboratorio del Departamento de Ciencias Biológicas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### B. MATERIAL EXPERIMENTAL

##### 1. Agentes de control biológico

*Trichoderma harzianum* Rifai

*Trichoderma viride* Pers. ex Gray

*Trichoderma pseudokoningii* Rifai

*Trichoderma reesei* E. G. Simmons

##### 2. Organismos fitopatógenos:

Fitopatógenos	Procedencia
<i>Botrytis cinerea</i> Mich. Ex Fr.	Laboratorio de Ciencias Biológicas ESPOCH
<i>Fusarium</i> spp. Link ex Fr.	Laboratorio de Ciencias Biológicas ESPOCH
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Fukel	Laboratorio de Ciencias Biológicas ESPOCH
<i>Monilia royeri</i> ( <i>Moniliophthora royeri</i> )	Laboratorio NESTLE - CENTER

##### 3. Fungicidas:

Nombre comercial
1. Benlate (Benomyl)
2. Captan (Captan)
3. Cobre Nordox (Oxido cuproso)
4. Terraclor (PCNB)
5. Previcur (Propanocarb)
6. Strobby (Metilo de Kresoxim)
7. Vitavax (Carboxin)
8. Daconil (Clorotalonil)



#### 4. Sustratos sólidos

Semillas de amaranto

Granos de trigo

Granos de avena

Arroz quebrado (75%) + cascarilla (25%)

#### 5. Medios líquidos

- Melaza (M1)
- Malta (M2)

#### 6. Portadores inertes

Selita

Caolinita

Sulfato de calcio

### C. TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

#### 1. Curva de crecimiento

Cada una de las cuatro especies de *Trichoderma* creció en 100 gramos de trigo estéril con 70 % de humedad y a 26 - 27°C. Se inoculó 1 ml de  $10^7$  esporas/ml, en cada tratamiento. Se contó el número de conidias durante 15 días. Los tratamientos fueron:

<i>Trichoderma</i> spp.	Repeticiones	Total
4	3	12

#### 2. Resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas

Se probaron 8 fungicidas comunes utilizados en la lucha contra enfermedades del suelo y del follaje. Se estudiaron dos dosis, las mismas que se basaron en las recomendadas por las casas comerciales.

FUNGICIDAS	DOSIS 1/ 400ml.	DOSIS 2/ 400ml.
1. Benlate	1 g.	1.5 g.
2. Captan	1 g.	1.5 g.
3. Cobre Nordox	4 g.	6 g.
4. Terraclor	1 g.	1.5 g.
5. Previcur	1 cc	1.5 cc
6. Strobry	0.12 g.	0.6 g.
7. Vitavax	1 g.	1.5 g.
8. Daconil	4 g.	6 g.

Se aplicó un análisis trifactorial, establecido de la siguiente manera:

FUNGICIDAS	<i>Trichoderma</i> spp	Dosis	Repeticiones	Total
8	4	2	3	192

3. Antagonismo de *Trichoderma* spp., con *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia royeri*.

Se usaron 4 métodos:

1. Bloques
2. Filtrados
3. Compuestos volátiles
4. Papel celofán

El método de bloques o "dual" consistió en sembrar en los extremos de una caja petri con medio de cultivo (PDA) un disco de 4 mm de los dos hongos. Se evaluó el crecimiento, mediante una escala visual arbitraria, donde se tomó en cuenta si los micelios de las dos colonias entraron en contacto, creciendo sobre la colonia del fitopatógeno y en que proporción lo hicieron o si sus dos micelios nunca entraron en contacto, debido probablemente a la producción de metabolitos secundarios inhibitorios.

Los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp y *Sclerotinia sclerotiorum* fueron sembrados 3 días antes que *Trichoderma* spp, mientras que *Monilia roreri* fue sembrada 15 días antes en PDA, debido a su lento crecimiento.

La escala arbitraria consistió en:

- 0: sin contacto
- 1: invasión del 25% sobre la colonia del fitopatógeno
- 2: invasión del 50% sobre la colonia del fitopatógeno
- 3: invasión del 75% sobre la colonia del fitopatógeno
- 4: invasión del 100% sobre la colonia del fitopatógeno

En el método de filtrados se probaron: a) una suspensión de  $10^7$  esporas /ml pasadas por un filtro común, b) filtrado a partir de un cultivo líquido de *Trichoderma* spp de siete días (solo micelio) y c) un filtrado estéril (pasado a través de un filtro de 0.2  $\mu$ m.) a partir de una suspensión de  $10^7$  esporas/ml.

Debido a las propiedades intrínsecas de cada especie fitopatógena estudiada, se estableció dos consideraciones para el caso de filtrados. Para *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp., por ser hongos con una prolífica esporulación y crecimiento a partir de esporas, se tomaron 100  $\mu$ l de cada filtrado y se colocaron en 4 sitios de una caja que contenía *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp, sembrados en PDA líquido enfriado a 45°C. y para el caso de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia roreri* se colocó la misma cantidad de filtrados a cajas precolonizadas por estos dos fitopatógenos.

Para el análisis del antagonismo de *Trichoderma* spp contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp se midió el diámetro en centímetros del halo transparente, el cual constituyó el indicativo de antagonismo.

El análisis del antagonismo de *Trichoderma* spp contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia roreri* se realizó aplicando la misma escala visual arbitraria usada para el método dual.

Para el método de compuestos volátiles se tomó en consideración si no hubo inhibición en el crecimiento de los dos hongos, inhibición del fitopatógeno, inhibición de *Trichoderma* spp e inhibición mutua. Se inocularon  $10^5$  esporas/ml de los patógenos *Fusarium* spp y *Botrytis cinerea*, así como de *Trichoderma* spp en PDA líquido enfriado a 45°C, una vez solidificado el medio, se enfrentaron los fitopatógenos con las respectivas especies de *Trichoderma*.

Para *Monilia roreri* y *Sclerotinia sclerotiorum* se sembraron bloques de 4mm. de diámetro de micelio en el centro de una caja petri con PDA solidificado, donde se les permitió establecerse normalmente 5 días antes de entrar en contacto con *Trichoderma* spp, el mismo, que al momento del confrontamiento fue sembrado con una suspensión de  $10^5$  esporas/ml. en PDA líquido enfriando a 45°C.

Las cajas que contenían *Trichoderma* spp se colocaron en la parte inferior y las correspondientes a los patógenos en la parte superior. Las cajas fueron selladas con el objeto de observar si la presencia de compuestos volátiles alteraba el desarrollo de las colonias de hongos.

Se evaluó en forma visual de la siguiente manera:

- 1: Sin inhibición
- 2: Inhibición del fitopatógeno
- 3: Inhibición del antagonista (*Trichoderma* spp.)
- 4: Inhibición mutua

El método del papel celofán sirvió exclusivamente para observar si hubo parasitismo. Con ayuda del microscopio se comprobó si hubo daño de las hifas de los cuatro fitopatógenos estudiados. Para lo cual, se colocaron láminas de papel celofán de 1 cm<sup>2</sup> sobre un medio pobre (agar- agua), en uno de sus extremos se sembró el fitopatógeno correspondiente y en el otro extremo *Trichoderma* spp. Cuando sus micelios se toparon o entrecruzaron se retiraron y observaron al microscopio. El método de evaluación fue visual.

### **8. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en amaranto a partir de dos cultivos líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas**

Se probaron 2 medios de incubación líquida para *Trichoderma* spp: melaza (M1) y malta (M2). Para obtener los fermentos líquidos, se inoculó 1 ml de una suspensión de  $10^7$  esporas de cada especie de *Trichoderma* en 100 ml de medio líquido. Fueron incubados en agitación constante a 26 – 27 °C por: 24, 48 y 72 horas. Cada cultivo se sembró en semillas de amaranto esterilizadas con el objeto de inducir la producción de conidias, esto constituyó la “fermentación” sólida.

Se evaluó por: a) el número de conidias producidas y b) mediante la siguiente escala visual:

- 0: sin crecimiento
- 1: micelio escaso
- 2: abundante micelio
- 3: poco esporulado
- 4: medianamente esporulado
- 5: abundantemente esporulado

El esquema para el número de tratamientos fue el siguiente:

<i>Trichoderma</i> spp	Medios	Tiempos de incubación	Repeticiones	Total
4	2	3	3	72

### **9. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en cuatro sustratos sólidos a partir de melaza incubada por 48 horas**

El propósito de esta prueba fue encontrar un sustrato (s) donde se pueda obtener un mayor número de esporas. Los sustratos fueron: semillas de amaranto, trigo, avena y una mezcla de arroz partido más cascarilla, en una proporción de 75 y 25% respectivamente.

Los tres primeros sustratos fueron remojados por un período de 10 a 12 horas, escurridos y secados hasta cuando su humedad correspondió entre 30 y 35%. Se esterilizaron durante 30 minutos por dos ocasiones; el cuarto sustrato recibió el contenido de humedad final después de su esterilización, el mismo que consistió en 40 ml de cultivo líquido mas 30 ml de agua destilada estéril, mientras que los tres primeros recibieron 40 ml de cultivo líquido, con lo cual todos los tratamientos tuvieron el 70% de humedad. El inóculo líquido fue el seleccionado en la etapa anterior, por sus mejores cualidades, el mismo que correspondió a melaza (M1) incubada por 48 horas.

Para el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp se utilizaron dos tipos de bandejas: a) bandejas Nun (cajas petri cuadradas de plástico de 30 x 30 cm y 3 cm de alto) y b) recipientes plásticos rectangulares de 2.5 litros de capacidad con una malla metálica en su interior y tapas de metal. Los recipientes fueron desinfectados con cloruro de benzalconio al 2%. Cada unidad experimental estuvo constituida de 100 gramos de sustrato sólido.

Se evaluó mediante el conteo de esporas de *Trichoderma* spp, en la etapa estacionaria, la que ocurrió a partir del el 6<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> día, establecido en su curva de crecimiento.

El esquema trifactorial se conformó de la siguiente manera:

Sustratos	<i>Trichoderma</i> spp	Métodos	Repeticiones	Total
4	3	2	3	72

#### **10. Viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes almacenadas durante cuatro semanas a 35°C.**

Las esporas obtenidas en la etapa anterior se añadieron a tres portadores inertes: selita, caolinita y sulfato de calcio, permaneciendo 4 semanas a 35°C. Con ayuda de tamices se separaron los portadores inertes y conidias de los sustratos sólidos. La viabilidad de las esporas se estableció mediante pruebas de germinación utilizando el método de **cenicafé** y expresado en porcentaje.

El esquema trifactorial estuvo conformado de la siguiente manera:

Portadores inertes	Sustratos	<i>Trichoderma</i> spp	Repeticiones	Total
3	3	3	3	81

#### D. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores en estudio fueron:

##### 1. Resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas

Factor A: fungicidas (Benlate, Captan, Cobre Nordox, Terraclor, Previcur, Stroby, Vitavax y Daconil)

Factor B: *Trichoderma* spp. (*T. reesei*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum*, *T. viride*)

Factor C: Dosis (D1 y D2)

##### 2. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en amaranto a partir de dos cultivos líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas

Factor A: *Trichoderma* spp. (*T. reesei*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. viride*)

Factor B: Medios líquidos (melaza M1 y malta M2)

Factor C: Tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas)

##### 3. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en cuatro sustratos sólidos a partir de melaza (M1) incubada por 48 horas.

Factor A: Sustratos sólidos (amaranto, trigo, avena y arroz quebrado mas cascarilla)

Factor B: *Trichoderma* spp (*T. reesei*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*)

Factor C: Métodos de esporulación (platos Nun y bandejas plásticas con mallas metálicas)

**4. Viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes almacenadas durante cuatro semanas a 35°C.**

Factor A: Portadores inertes (selita, caolinita y sulfato de calcio)

Factor B: Sustratos sólidos (amaranto, trigo y avena)

Factor C: *Trichoderma* spp (*T. reesei*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*)

**E. MATERIALES Y EQUIPOS**

Para esta investigación se utilizaron: equipos de laboratorio, medios de cultivo para hongos: PDA (agar papa dextrosa), colorantes, material fotográfico y de escritorio.

**F. DISEÑO EXPERIMENTAL**

**1. Tipo de diseño**

Se utilizó Diseño completo al azar con arreglo factorial.

**2. Esquema del análisis de varianza**

**a. Resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas**

**CUADRO 01.** Esquema del Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Factor A	$a - 1$	7
Factor B	$b - 1$	3
AB	$(a - 1)(b - 1)$	21
Factor C	$c - 1$	1
AC	$(a - 1)(c - 1)$	7
BC	$(b - 1)(c - 1)$	3
ABC	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	21
Error	$abc(r - 1)$	12
TOTAL		191



**b. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en amaranto a partir de dos cultivos líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas.**

**CUADRO 02.** Esquema del Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Factor A	$a - 1$	3
Factor B	$b - 1$	1
AB	$(a - 1) (b - 1)$	3
Factor C	$c - 1$	2
AC	$(a - 1) (c - 1)$	6
BC	$(b - 1) (c - 1)$	2
ABC	$(a - 1) (b - 1) (c - 1)$	6
Error	$abc (r - 1)$	48
TOTAL		71

**c. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en cuatro sustratos sólidos a partir de melaza (M1) incubada por 48 horas.**

**CUADRO 03.** Esquema del Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Factor A	$a - 1$	3
Factor B	$b - 1$	2
AB	$(a - 1) (b - 1)$	6
Factor C	$c - 1$	1
AC	$(a - 1) (c - 1)$	3
BC	$(b - 1) (c - 1)$	2
ABC	$(a - 1) (b - 1) (c - 1)$	6
Error	$abc (r - 1)$	48
TOTAL		71

- d. Viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes almacenadas durante 4 semanas a 35°C.

**CUADRO 04.** Esquema del Análisis de Varianza.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Factor A	$a - 1$	2
Factor B	$b - 1$	2
AB	$(a - 1) (b - 1)$	4
Factor C	$c - 1$	2
AC	$(a - 1) (c - 1)$	4
BC	$(b - 1) (c - 1)$	4
ABC	$(a - 1) (b - 1) (c - 1)$	8
Error	$abc (r - 1)$	54
TOTAL		80

### 3. Análisis funcional

#### a. Prueba de separación de medias

Para la separación de medias se aplicó la prueba de Tukey al 5%.

#### b. Coeficiente de variación

## G. METODOS DE EVALUACION Y DATOS REGISTRADOS

### 1. Curva de crecimiento

Se registró el número de conidias de las cuatro especies de *Trichoderma* producidas durante 15 días, obteniendo esporas/g de sustrato y expresado en logaritmo.

## 2. Resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas

Se registró el crecimiento radial en cm de *Trichoderma* spp en PDA mezclado con los fungicidas en las dosis indicadas anteriormente a los 3, 6 y 9 días.

## 3. Antagonismo de *Trichoderma* spp con *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia royeri*.

Por la naturaleza de cada hongo fitopatógeno, el antagonismo fue evaluado mediante escalas arbitrarias y medidas de crecimiento de la siguiente manera:

### a. Método de bloques o dual.

Para su evaluación se realizó a los 10 días, mediante la siguiente escala arbitraria:

0: sin contacto

1: invasión del 25% sobre la colonia del fitopatógeno

2: invasión del 50% sobre la colonia del fitopatógeno

3: invasión del 75% sobre la colonia del fitopatógeno

4: invasión del 100% sobre la colonia del fitopatógeno

### b. Método de filtrados.

Para el análisis del antagonismo de *Trichoderma* spp contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp. se midió el diámetro en centímetros del halo transparente a los cinco días.

Para el análisis del antagonismo de *Trichoderma* spp contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia royeri* se aplicó la misma escala visual arbitraria usada para el método dual. Se evaluó a los 10 días.

### c. Método de compuestos volátiles.

Se observó a los 15 días, para los cuales aplicó la siguiente escala arbitraria:

- 1: Sin inhibición
- 2: Inhibición del fitopatógeno
- 3: Inhibición del antagonista (*Trichoderma* spp.)
- 4: Inhibición mutua

#### **d. Método del papel celofán**

Se utilizó para confirmar si hubo o no parasitismo a los cuatro días, mediante observaciones microscópicas con colorante.

#### **4. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en amaranto a partir de dos cultivos líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas.**

Se evaluó mediante dos métodos: a) escala arbitraria, observando su crecimiento diario hasta el 5to día y b) conteo de esporas durante la etapa estacionaria.

La escala arbitraria fue la siguiente:

- 0 Sin crecimiento
- 1 micelio escaso
- 2 micelio abundante
- 3 poco esporulado
- 4 medianamente esporulado
- 5 abundantemente esporulado

#### **5. Producción de esporas de *Trichoderma* spp en tres sustratos sólidos a partir de melaza (M1) incubada por 48 horas.**

Se registró el número de esporas/g de sustrato sólido de las cuatro especies estudiadas, expresado en logaritmo a los 7 días.

**6. Viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp añadidos a tres portadores inertes almacenadas durante cuatro semanas a 35°C.**

La viabilidad se evaluó mediante el porcentaje de germinación de las esporas obtenidas a partir de los portadores inertes, utilizando la metodología de **cenicafé**.

**H. MANEJO DEL ENSAYO**

Para el crecimiento de *Trichoderma* spp se consideró una temperatura de incubación de 26- 27°C para cajas petri con PDA, incubación líquida y sustratos sólidos. 20°C para la prueba de antagonismo y 35°C para el período de secado de esporas en los portadores inertes.

Los sustratos sólidos fueron seleccionados, lavados y remojados previo a la esterilización.

El porcentaje de humedad final de todos los sustratos sólidos fue 70%, incluido el inóculo líquido.

Las dosis de los fungicidas empleados se basaron en las recomendadas por las casas comerciales para el combate de varios hongos fitopatógenos. Estas fueron:

Fungicidas	Dosis comerciales
Benlate (Benomyl)	50 – 100 g/200 L.
Captan (Captan)	400 – 500 g/200 L.
Cobre Nordox (Oxido cuproso)	2 Kg/200 L.
Terraclor (PCNB)	1.5 – 2.5 Kg/ha.
Previcur (Propanocarb)	500 cc/200 L.
Stroby (Metilo de Kresoxim)	0.2 – 0.4 Kg/ ha
Vitavax (Carboxin)	500 g/200 L.
Daconil (Clorotalonil)	225 - 400 g/ha.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

##### A. CURVA DE CRECIMIENTO Y ESPORULACION DE *Trichoderma* spp DURANTE 15 DIAS A 26 - 27 °C.

Los resultados obtenidos (Figura 01), demostraron que la máxima tasa de crecimiento y esporulación en granos de trigo se ubicó entre el 6<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> día, a partir del cual se observó una fase estable hasta el decimoquinto día. Las pequeñas fluctuaciones presentadas corresponden, sin duda, a la "conidiación microcíclica", cualidad propia de este género, es decir la producción de nuevo micelio y conidias cuando las condiciones de humedad son apropiadas, por lo que no fue posible establecer la fase de muerte, característica de todo organismo. Sin embargo, la variación no fue lo suficientemente grande, como para influir considerablemente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Grillo (1996).

Además, se pudo notar que el mayor número de esporas producidas correspondió a las especies *T. pseudokoningii*, *T. reesei* y *T. harzianum*, a diferencia de *T. viride* cuya esporulación fue menor.

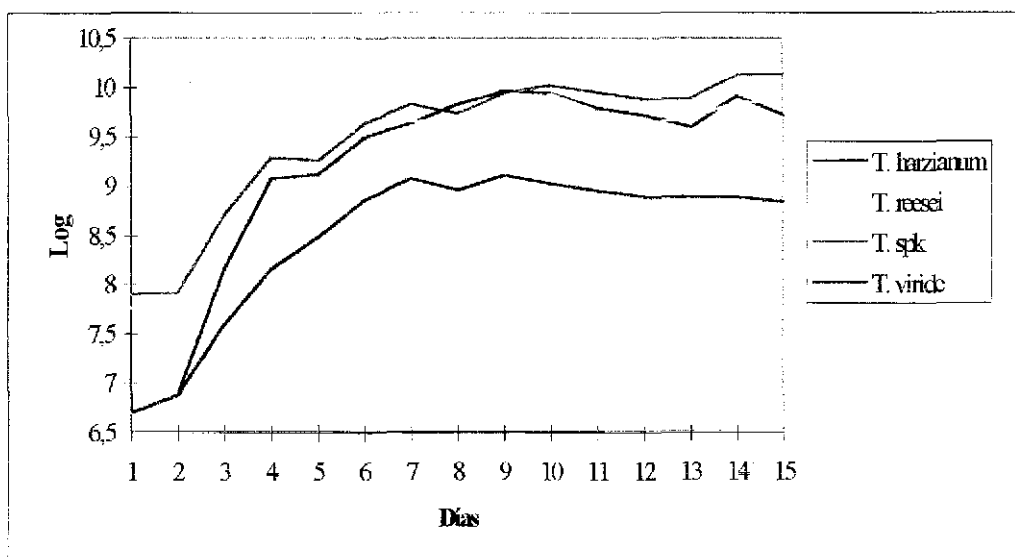


FIGURA 01. Producción de conidias de *Trichoderma* spp, en granos de trigo, expresada en logaritmo, durante 15 días de incubación a 26 – 27 °C.

## B. RESISTENCIA DE *Trichoderma* spp A OCHO FUNGICIDAS

El análisis de varianza realizado en el 3er día (Cuadro 05) demostró que hubo diferencias altamente significativas para los 3 factores: fungicidas, *Trichoderma* spp, dosis y sus interacciones. Para el 6<sup>to</sup> y 9<sup>no</sup> día (Cuadros 06 y 07) hubo diferencia altamente significativa para todos los factores y sus interacciones, excepto para la interacción BC, es decir para *Trichoderma* spp y dosis, esto se debió a que en los primeros días algunos fungicidas limitaron en gran medida el crecimiento de las cuatro especies de *Trichoderma*, pero, posteriormente éstas crecieron en mayor o menor grado.

Debido a lo anterior, se efectuó la prueba de Tukey al 5% solamente para el 9<sup>no</sup> día (Cuadro 08), donde para el factor A (fungicidas): Previcur y Stroby ocuparon los niveles mas altos, con 4.5 cm, máximo crecimiento radial de *Trichoderma* spp, le siguió Terraclor que obtuvo una media de crecimiento de 2.942 cm. En los niveles más bajos se ubicaron Cobre Nordox, Daconil, Benlate y Vitavax, los cuales prácticamente anularon el crecimiento de *Trichoderma* spp.

Para el factor B (*Trichoderma* spp), de acuerdo a la prueba de Tukey al 5% (Cuadro 09), *Trichoderma harzianum*, se encontró en el primer nivel, seguido de *T. reesei*, *T. viride* y finalmente *T. pseudokoningii*.

Para la interacción AB (fungicidas vs. *Trichoderma* spp), conforme se presenta en el Cuadro 10, el primer nivel ocuparon Stroby y Previcur con todas las especies de *Trichoderma*, con una media de 4.5 cm, seguido de Terraclor con *T. harzianum*, *pseudokoningii*, *reesei* y *viride* respectivamente, este último fue afectado en mayor grado por Terraclor. Los demás fungicidas afectaron severamente el crecimiento de *Trichoderma* spp, por lo que no se recomienda usarlos en programas donde este hongo sea utilizado como agente de control.

La prueba de Tukey al 5% para el factor C (dosis) fue significativa, a las dosis menores de ingrediente químico determinaron un crecimiento mayor del micelio, según los datos anotados en el Cuadro 11.

Por consiguiente, para la interacción ABC (fungicidas, *Trichoderma* spp y dosis), el análisis de varianza fue altamente significativo (Cuadro 12). Los fungicidas: Previcur y Stroby permitieron el crecimiento de todas las especies de *Trichoderma*, pero fueron diferencialmente sensibles a los fungicidas restantes a las dos dosis utilizadas. *Trichoderma* spp fue drásticamente afectado por Benlate, Cobre Nordox, Vitavax y Daconil. Sin embargo, Cobre Nordox en sus dos dosis no fue completamente letal para *T. viride*, observándose un ligero crecimiento, mientras que Daconil permitió un incipiente crecimiento a la menor dosis (D1).

Captan anuló el crecimiento de *T. reesei* y *pseudokoningii*, pero para *T. harzianum* a la dosis 1 no fue completamente letal. *Trichoderma viride* creció ligeramente ante la presencia de Captan a las dos dosis.

Los fungicidas que permitieron el crecimiento sin ningún obstáculo fueron Previcur y Stroby, en efecto, las cuatro especies de *Trichoderma* al 9<sup>no</sup> día cubrieron el PDA de las cajas petri y presentaron esporulación normal. Terraclor limitó el crecimiento de las cuatro especies estudiadas en los primeros días, pero al 9<sup>no</sup> día tuvieron un apreciable crecimiento, especialmente *T. harzianum* a la dosis 1. Sin embargo, este fungicida afectó en mayormente a *T. viride*.

De los resultados obtenidos se puede concluir que, los fungicidas que deben tomarse en cuenta para un manejo integrado de enfermedades junto con *Trichoderma* spp. son Previcur, Stroby y Terraclor con las restricciones del caso para el último.



**CUADRO 05.** Análisis de varianza para resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas, a los tres días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27°C.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.Cal.
Factor A: fungicidas	7	439.336	62.762	0.0000**
Factor B: <i>Trichoderma</i> spp.	3	4.996	1.665	0.0000**
AB	21	44.293	2.109	0.0000**
Factor C: dosis	1	0.607	0.607	0.0000**
AC	7	1.128	0.161	0.0000**
BC	3	0.101	0.034	0.0038**
ABC	21	0.786	0.037	0.0000**
Error	128	0.920	0.007	
TOTAL	191	492.168		

Coefficiente de variación: 9.13%

**CUADRO 06.** Análisis de varianza para resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas, a los seis días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27 °C.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.Cal.
Factor A: fungicidas	7	568.536	81.219	0.0000**
Factor B: <i>Trichoderma</i> spp.	3	0.995	0.332	0.0002**
AB	21	27.479	1.309	0.0000**
Factor C: dosis	1	1.577	1.577	0.0000**
AC	7	2.957	0.422	0.0000**
BC	3	0.192	0.064	0.2581ns
ABC	21	5.117	0.244	0.0000**
Error	128	6.033	0.047	
TOTAL	191	612.887		

Coefficiente de variación: 16.59%

**CUADRO 07.** Análisis de varianza para resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas, a los nueve días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27°C.

F.V	G.L	S.C	C.M	F.Cal.
Factor A: fungicidas	7	696.862	99.552	0.0000**
Factor B: <i>Trichoderma</i> spp.	3	1.199	0.400	0.0000**
AB	21	35.539	1.692	0.0000**
Factor C: dosis	1	0.574	0.574	0.0007**
AC	7	0.715	0.102	0.0439*
BC	3	0.306	0.102	0.0986ns
ABC	21	3.327	0.158	0.0000**
Error	128	6.107	0.048	
TOTAL	191	744.629		

Coefficiente de variación: 13.67%

**CUADRO 08.** Prueba de Tukey al 5% para resistencia de *Trichoderma* spp. a ocho fungicidas, a los nueve días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27 °C.

Factor A: Fungicidas:

FUNGICIDAS	MEDIA	RANGO
Previcur	4.500	A
Stroby	4.500	A
Terraclor	2.942	B
Captan	0.425	C
Cobre Nordox	0.329	C
Daconil	0.083	D
Benlate	0.000	D
Vitavax	0.000	D

**CUADRO 09.** Prueba de Tukey al 5% para resistencia de *Trichoderma* spp. a ocho fungicidas, a los nueve días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27 °C.

Factor B. *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	MEDIA	RANGO
<i>Trichoderma harzianum</i>	1.725	A
<i>Trichoderma reesei</i>	1.581	B
<i>Trichoderma viride</i>	1.575	B
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	1.508	B

**CUADRO 10.** Prueba de Tukey al 5% para resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas, a los nueve días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27 °C.

AB: Fungicidas - *Trichoderma* spp.

Fungicidas - <i>Trichoderma</i> spp.	MEDIA	RANGO
Previcur – <i>Trichoderma reesei</i>	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma harzianum</i>	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma viride</i>	4.500	A
Stroby - <i>Trichoderma reesei</i>	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma harzianum</i>	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma viride</i>	4.500	A
Terraclor - <i>Trichoderma harzianum</i>	3.917	B
Terraclor - <i>Trichoderma reesei</i>	3.533	BC
Terraclor – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	3.067	C
Cobre Nordox - <i>Trichoderma viride</i>	1.317	D
Terraclor - <i>Trichoderma viride</i>	1.250	D
Captan - <i>Trichoderma harzianum</i>	0.883	DE
Captan - <i>Trichoderma viride</i>	0.700	EF
Daconil - <i>Trichoderma viride</i>	0.333	FG
Captan - <i>Trichoderma reesei</i>	0.117	G
Cobre Nordox – <i>Trichoderma reesei</i>	0.000	G

**CUADRO 11.** Prueba de Tukey al 5% para resistencia de *Trichoderma* spp. a ocho fungicidas, a los nueve días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27 °C.

Factor C: Dosis

DOSIS	MEDIA	RANGO
D1	1.652	A
D2	1.543	B

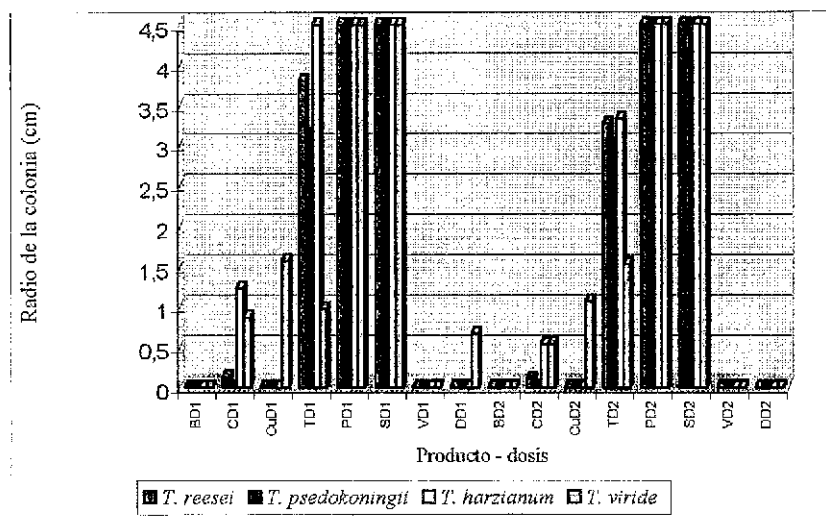
**CUADRO 12.** Prueba de Tukey al 5% para resistencia de *Trichoderma* spp. a ocho fungicidas, a los nueve días de crecimiento radial (cm) a 26 – 27 °C.

Factores ABC: Fungicidas - *Trichoderma* spp y dosis

FUNGICIDAS - <i>Trichoderma</i> spp - DOSIS	MEDIA	RANGO
Previcur – <i>Trichoderma reesei</i> - D1	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma reesei</i> - D 2	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma pseudokoningii</i> - D1	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma pseudokoningii</i> - D 2	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 1	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 2	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma viride</i> - D 1	4.500	A
Previcur – <i>Trichoderma viride</i> - D 2	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma reesei</i> - D1	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma reesei</i> - D 2	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma pseudokoningii</i> – D 1	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma pseudokoningii</i> – D 2	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 1	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 2	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma viride</i> - D 1	4.500	A
Stroby – <i>Trichoderma viride</i> - D 2	4.500	A
Terraclor – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 1	4.500	A
Terraclor – <i>Trichoderma reesei</i> – D 1	3.800	AB
Terraclor – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 2	3.333	BC
Terraclor – <i>Trichoderma reesei</i> – D 2	3.267	BC

Terraclor – <i>Trichoderma pseudokoningii</i> - D 1	3.133	BC
Terraclor – <i>Trichoderma pseudokoningii</i> - D 2	3.000	C
Cobre Nordox – <i>Trichoderma viride</i> - D 1	1.567	D
Terraclor – <i>Trichoderma viride</i> – D 2	1.533	D
Captan – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 1	1.233	DE
Cobre Nordox – <i>Trichoderma viride</i> - D 2	1.067	DE
Terraclor – <i>Trichoderma viride</i> – D 1	0.967	DE
Captan – <i>Trichoderma viride</i> - D 1	0.867	DEF
Daconil – <i>Trichoderma viride</i> - D 1	0.667	EFG
Captan – <i>Trichoderma harzianum</i> - D 2	0.533	EFG
Captan – <i>Trichoderma viride</i> - D 2	0.533	EFG
Captan – <i>Trichoderma reesei</i> - D 1	0.133	FG
Captan – <i>Trichoderma reesei</i> - D 2	0.100	FG
Cobre Nordox – <i>Trichoderma reesei</i> - D 2	0.000	G

En la figura 02 se puede observar que los fungicidas Previcur y Stroby a las dos dosis no inhibieron el crecimiento de las cuatro especies de *Trichoderma* a los 9 días. Terraclor no inhibe a este hongo, obteniéndose radios de crecimiento considerables con las dos dosis utilizadas, sin embargo *Trichoderma viride* fue afectado en mayor grado, concordando con las afirmaciones de Kubicek y Harman (1998), los cuales mencionan a *Trichoderma* como uno de los organismos que puede desdoblar la molécula de PCNB (Terraclor). Sin embargo, la especie *viride* parece ser la mas afectada.



**FIGURA 02.** Resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas. Crecimiento radial en cm de las colonias a los nueve días.

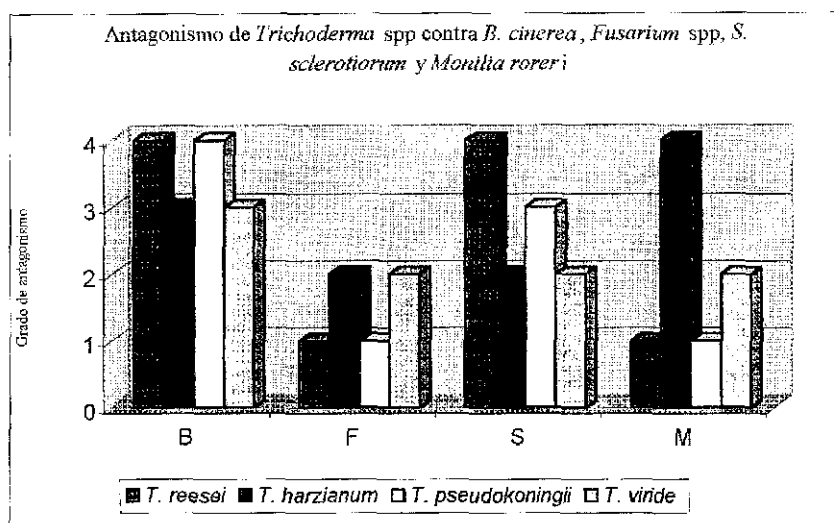
### C. ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, y *Monilia roleri* IN VITRO

#### 1. Método de bloques

De acuerdo a la escala establecida en métodos de estudio y datos a registrar, los resultados mostraron que *Trichoderma* spp fue agresivo en su crecimiento, de manera que impidió el desarrollo de los patógenos e incluso fue capaz de crecer y esporular sobre ellos.

En la Figura 03, se observa que *Trichoderma reesei* y *Trichoderma pseudokoningii* permitieron un mejor control de *Botrytis cinerea* y *Sclerotium sclerotiorum*; en cambio *Fusarium* spp presentó resistencia a la acción de las cuatro especies de *Trichoderma*. Finalmente, contra *Monilia roleri*, el mejor efecto antagónico lo exhibió *T. harzianum*.

Sin embargo, mediante este método no es posible asegurar que el mecanismo antagónico de las cuatro especies de *Trichoderma* spp sea el parasitismo, ya que una de las características predominantes de este género es la competencia agresiva por espacio, por lo que estos resultados deben ser complementados con otros métodos que confieren su mecanismo de control.



**FIGURA 03.** Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia royeri* a los diez días, mediante el método de bloques..

### 3. Método del filtrado de: suspensión de esporas (F1), cultivo líquido (F2) y filtrado estéril (F3).

El análisis de varianza (Cuadro 13) indica que existieron diferencias altamente significativas para los tres factores en estudio, es decir para *Trichoderma* spp, tipos de filtrado y para fitopatógenos.

Conforme se establece en el Cuadro 14, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma pseudokoningii* ejercieron acción inhibitora para *Botrytis cinerea*, usando el filtrado de suspensión de esporas (F1). *Trichoderma viride* tuvo acción inhibitora sobre *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp, con el filtrado 1 aunque para éste, el efecto fue menor. *Trichoderma harzianum* inhibió a *Botrytis cinerea* utilizando filtrado a partir de una suspensión de esporas (F1). *Trichoderma viride* también inhibió a *Botrytis cinerea* pero con el filtrado de cultivo líquido (F2). La información de este Cuadro me permite concluir que las cuatro especies de *Trichoderma* ejercen acción inhibitora sobre los dos fitopatógenos estudiados usando los filtrados 1 y 2, no así el filtrado 3, el cual no ejerció inhibición alguna, demostrado cuando en el último nivel del cuadro es representado por *Trichoderma reesei* - F3 - *Botrytis cinerea*, donde se obtiene un valor

de 0, de similar forma ocurre con el filtrado F3 obtenido a partir de las tres especies de *Trichoderma* estudiadas, no representadas en el cuadro. Debido a lo mencionado, es probable que sea necesaria la presencia de esporas y micelio, los mismos que durante su germinación y crecimiento podrían producir sustancias inhibidoras.

La separación de medias para la interacción ABC, utilizando la prueba de Tukey al 5%, Cuadro 14 indica que los primeros niveles fueron ocupados por *T. reesei* – Filtrado 1 (de suspensión de esporas) contra *Botrytis cinerea*, *T. viride*, *T. harzianum* y *T. pseudokoningii* - F1, contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp. Los últimos lugares lo ocuparon *Trichoderma harzianum* – F2 – *Fusarium* spp; *Trichoderma viride* – F3 – *Fusarium* spp y *Trichoderma reesei* – F3 -- *Botrytis cinerea* donde prácticamente no hubo inhibición de los fitopatógenos.

**CUADRO 13.** Análisis de varianza para diámetro (cm) del halo transparente usando el método antagónico por filtrados contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp, a los cinco días

F.V	G.L	S.C	C.M	F. Calc.
Factor A	3	4.051	1.350	0.0000**
Factor B	2	51.926	25.963	0.0000**
AB	6	7.566	1.261	0.0000**
Factor C	1	2.973	2.973	0.0000**
AC	3	0.569	0.190	0.0502ns
BC	2	1.519	0.759	0.0001**
ABC	6	1.572	0.262	0.0032**
Error	48	3.257	0.068	
TOTAL	71	73.432		

Coefficiente de variación: 26.44%



**CUADRO 14.** Prueba de Tukey al 5% para diámetro (cm) del halo transparente usando el método antagónico por filtrados contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp a los cinco días

Factor ABC: *Trichoderma* spp. – Filtrados - Fitopatógenos

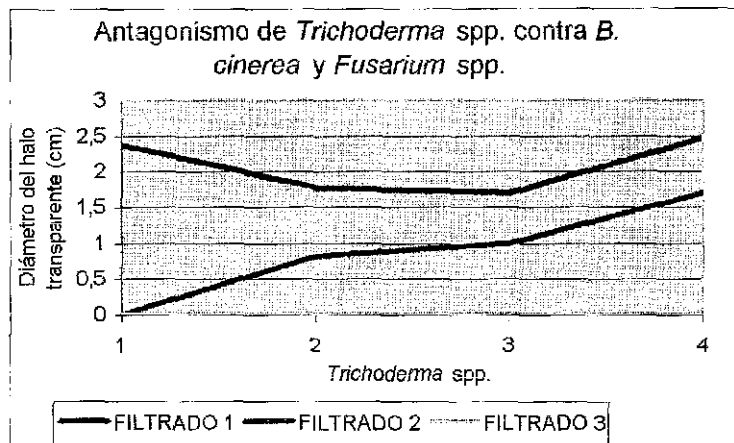
<i>Trichoderma</i> spp. – Filtrados – Fitopatógenos	MEDIA	RANGO
<i>Trichoderma reesei</i> - F1 - <i>Botrytis cinerea</i>	2.800	A
<i>Trichoderma viride</i> - F1- <i>Botrytis cinerea</i>	2.658	AB
<i>Trichoderma viride</i> – F1- <i>Fusarium</i> spp.	2.267	ABC
<i>Trichoderma harzianum</i> – F1 – <i>Botrytis cinerea</i>	2.100	ABCD
<i>Trichoderma viride</i> – F2 - <i>Botrytis cinerea</i>	2.100	ABCD
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> – F1 – <i>Botrytis cinerea</i>	2.000	ABCD
<i>Trichoderma reesei</i> - F1 - <i>Fusarium</i> spp.	1.933	BCD
<i>Trichoderma harzianum</i> – F2 – <i>Botrytis cinerea</i>	1.533	CDE
<i>Trichoderma harzianum</i> – F1 – <i>Fusarium</i> spp.	1.433	CDE
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> – F1 – <i>Fusarium</i> spp.	1.400	DE
<i>Trichoderma viride</i> F2 – <i>Fusarium</i> spp.	1.300	DE
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> – F2 – <i>Botrytis cinerea</i>	1.067	E
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> – F2 – <i>Fusarium</i> spp.	0.933	EF
<i>Trichoderma harzianum</i> – F2 – <i>Fusarium</i> spp.	0.100	FG
<i>Trichoderma viride</i> – F3 - <i>Fusarium</i> spp.	0.015	G
<i>Trichoderma reesei</i> - F3 - <i>Botrytis cinerea</i>	0.000	G

F1: Filtrado de esporas

F2: Filtrado de cultivo líquido

F3: Filtrado estéril

La Figura 04 demuestra el efecto de los filtrados en el antagonismo de *Trichoderma* spp contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp. Se observa un efecto positivo con los filtrados de esporas y de cultivo líquido pero no con el filtrado estéril, el cual no manifestó ningún antagonismo.

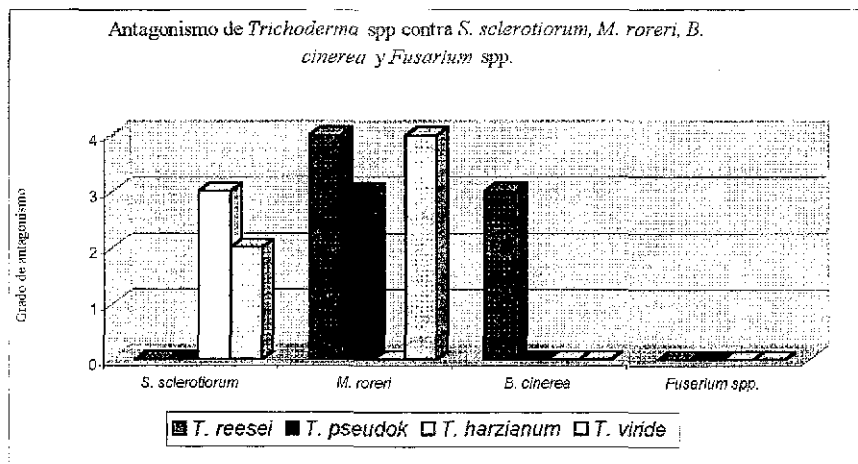


**FIGURA 04.** Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp utilizando el método de filtrados.

Los resultados demostrados en la Figura 05, al usar el método de placa precolonizada para los cuatro fitopatógenos afirman que *Trichoderma viride*, *T. reesei* y *T. pseudokoningii* son capaces de invadir las colonias de *Monilia roreri*, mientras que *T. harzianum* no lo hizo hasta los 10 días en que fueron evaluados, posiblemente debido a que la colonias de *Monilia roreri* presentaron estromatización con mayor producción de metabolitos secundarios. Para el caso de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma harzianum* fue el mejor, *T. viride* lo hizo con menor agresividad. *Botrytis cinerea* fue colonizado solo por *T. reesei*; mientras que a *Fusarium* spp ninguna especie de *Trichoderma* lo parasitó. Los resultados indican que existe una especificidad en el control. Además, el grado de desarrollo del fitopatógeno influye en la efectividad del control, seguramente debido a su contenido químico, el cual muchas veces es capaz de detener la invasión del organismo antagonico, como sucedió con *Fusarium* spp.

Este método es de significativa importancia por cuanto nos revela, que el grado de desarrollo del organismo objeto de control es fundamental para establecer el tiempo en que ha de hacerse un control biológico.

Es necesario establecer primero el agente antagonico para garantizar un buen control, ya que si los fitopatógenos han logrado desarrollarse completamente es muy probable que el contenido de metabolitos secundarios sea lo suficientemente grande como para anular cualquier organismo antagonico.



**FIGURA 05.** Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Monilia royeri*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp. usando placas precolonizadas.

### 3. Método de compuestos volátiles

Según las observaciones, las colonias de *Sclerotinia sclerotiorum* fueron invadidas por *T. pseudokoningii*, donde esporuló profusamente; *T. harzianum* provocó una coloración marrón en el micelio del fitopatógeno. Sin embargo, *T. harzianum* presentó poca esporulación. La producción de esclerocios no fue afectada por ninguna especie de *Trichoderma*.

En la relación *Trichoderma harzianum* y *Monilia royeri*, éste hongo fue afectado por la presencia de compuestos volátiles producidos por *T. harzianum*, presentando micelio poco compacto, diferente del control y de un color marrón, mientras que su crecimiento y apariencia no fue afectado por *T. reesei*, *T. viride* y *T. pseudokoningii*.

El antagonismo entre hongos, mediante compuestos volátiles permitió ver el alcance real de una interrelación química mutua, fundamental para los organismos a la hora de defenderse o tomar el control sobre el otro. Confirmado, cuando al destapar las cajas correspondientes a *Monilia royeri* vs. *T. harzianum*, este último presentó poca esporulación y con aparente deterioro de la mayoría de esporas; quizá esta sería la razón porque *T. harzianum* se convirtió en parásito de sus hifas al invadirlas y causar lisis, con lo cual asegura su sobrevivencia, esta aseveración quedó apoyada además con las

observaciones microscópicas realizadas en papel celofán, donde se observó lisis y deformación de sus hifas.

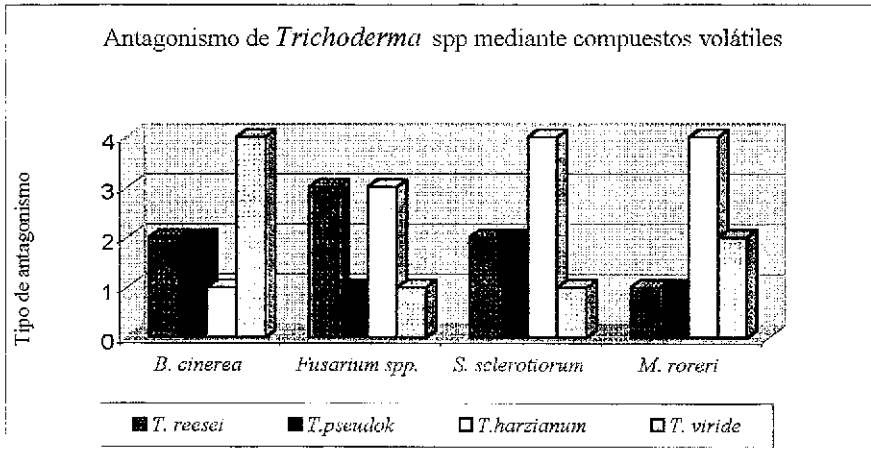
Por otra parte, la esporulación de *Trichoderma reesei* fue anulada por *Fusarium* spp, este último fue totalmente normal similar al control. Igual fenómeno sucedió en la relación *Fusarium* spp y *T. harzianum* el cual no esporuló, mientras *Fusarium* spp lo hizo normalmente.

Finalmente en la relación de *Botrytis cinerea* y *Trichoderma viride*, se dio un hecho sorprendente, pues los dos no esporularon o lo hicieron en forma incipiente. Sin embargo, existió indicios de formación de esclerocios en las colonias de *B. cinerea*.

De lo anterior, se desprende que en un control biológico se debe tomar en cuenta el tipo más adecuado de organismo antagónico, por cuanto, los resultados en las diversas pruebas revelaron que las diversas especies de *Trichoderma* tienen su especificidad en el control.

En la Figura 06 se observa que al utilizar el método de compuestos volátiles hubo variación en el comportamiento de *Trichoderma* spp frente a los cuatro fitopatógenos estudiados, presentándose desde la no inhibición del patógeno hasta una inhibición nutua, como en el caso de las relaciones: *Trichoderma viride* - *Botrytis cinerea*; *Trichoderma harzianum* - *Slerotinia sclerotiorum* y *Trichoderma harzianum* - *Monilia rozeri*.

De estas observaciones se puede concluir que es fundamental determinar el momento adecuado para realizar un control biológico, por cuanto, el antagonismo funciona mejor cuando el crecimiento del fitopatógeno se está iniciando debido a que no está dotado de los metabolitos secundarios necesarios o son muy pocos para soportar la presión de invasión del antagonista, el cual debe presentar cualidades relevantes como rápido crecimiento, amplia variedad de compuestos químicos y versatilidad ante diversas condiciones ecológicas, todas estas encontradas en varias especies de *Trichoderma*. Además, la especie y la raza adecuada de antagonista influye en la efectividad de control.



**FIGURA 06.** Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia roreri* mediante compuestos volátiles.

#### 4. Método del papel celofán

Este método tuvo por objeto observar al microscopio la existencia de parasitismo por parte de *Trichoderma* spp.

Las observaciones indican que para el caso de *Monilia roreri* y *Trichoderma harzianum*, las hifas del primero se presentaron deformes, destruidas, presumiendo que hubo un efecto lítico, característica de un inminente parasitismo.

El fenómeno que se observó en las demás especies de *Trichoderma* con el resto de patógenos estudiados, fue mas bien la presencia de una zona clara muy delgada de alrededor de 1 mm de ancho, presumiendo que no existió una invasión mutua, sino más bien hubo un “respeto” por las colonias de los fitopatógenos, evidenciándose además una esporulación masiva de los dos organismos.

Del comportamiento de los hongos antagonicos y los fitopatógenos en los diferentes métodos se puede concluir que *Trichoderma* spp tiene diversos mecanismos que le permite establecerse exitosamente en diversos sustratos, uno de ellos, sin duda es el agresivo crecimiento, que le permite ocupar áreas mas rápidamente que otros organismos; la producción de sustancias inhibitoras observada al utilizar el método

antagónico por filtrado de suspensión de esporas y de cultivo líquido, así como la relación de parasitismo evidenciado en la relación *Trichoderma harzianum* y *Monilia royeri* con el método de bloques y papel celofán.

#### **D. PRODUCCION DE ESPORAS EN AMARANTO A PARTIR DE DOS MEDIOS LIQUIDOS INCUBADOS DURANTE 24, 48 Y 72 HORAS.**

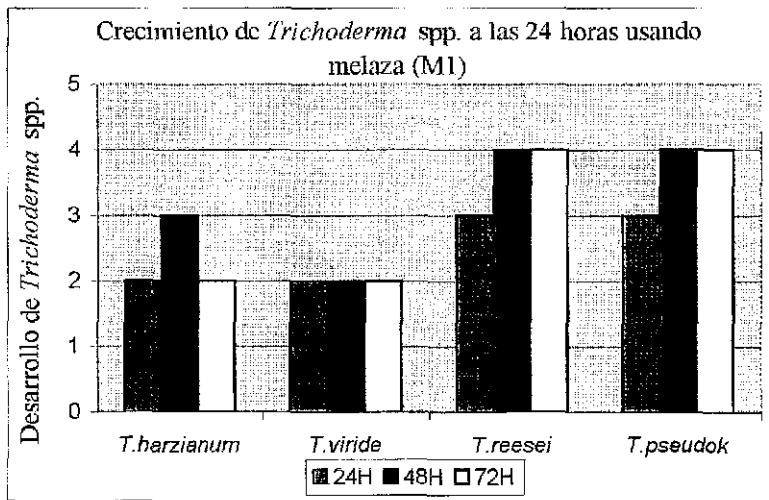
Según la Figuras 07, 08 y 09, usando la escala arbitraria señalada en Métodos de evaluación, *Trichoderma reesei*, *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* se desarrollaron y esporularon de mejor manera que *T. viride*, usando el medio líquido melaza (M1) incubada por 24, 48 y 72 horas, donde al tercer día se obtuvo un crecimiento y esporulación apreciables. *T. viride* no esporuló o fue insignificante en el sustrato sólido empleado, a pesar de su comportamiento similar durante la incubación líquida al resto de especies de *Trichoderma*, por lo que es probable que esta especie fue afectada por el tipo de sustrato sólido.

Las Figuras 10, 11 y 12, se analizan los datos para la misma variable, al utilizar medio líquido malta (M2) incubada por 24, 48 y 72 horas. Se observó un comportamiento similar a los tratamientos con melaza, a los tres días de incubación en amaranto presentaron buena esporulación *Trichoderma reesei*, *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* no así de *T. viride* que como el caso anterior, su esporulación fue nula, a pesar de presentar un buen desarrollo de micelio en cultivo líquido.

Si se compara los dos tipos de medios líquidos melaza (M1) y malta (M2) se puede observar que al tercer día los dos medios líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas permitieron llegar a resultados similares con buena esporulación de las especies *T. reesei*, *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* no así *T. viride*, el mismo que se mantuvo sin esporular.

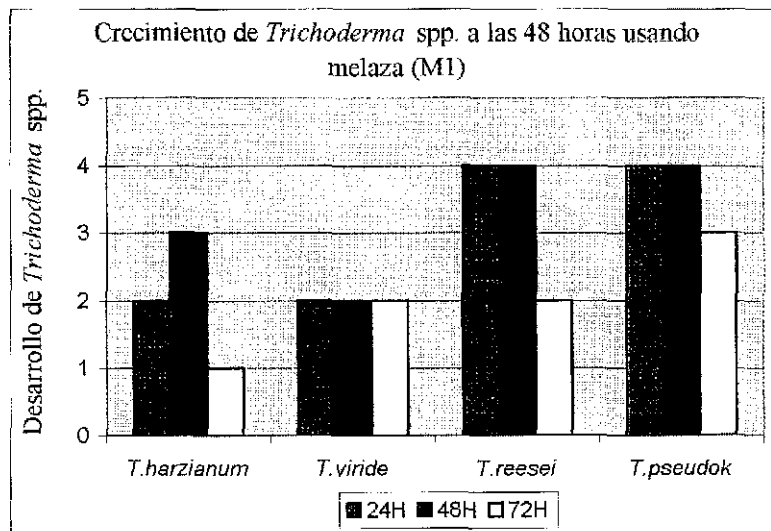
Cabe anotar que, a pesar de que el fermento líquido de 72 horas correspondientes a los dos tipos de medios provocó también una buena esporulación, desde el punto de vista de la manipulación es inadecuada, por cuanto se presentó grumoso con hifas largas y enredadas que dificultó al momento de verter en el sustrato sólido.

*Crecimiento de Trichoderma spp. a las 24 horas usando melaza (M1)*



**FIGURA 07.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. en amaranto a partir de melaza (M1) a las 24 horas.

*Crecimiento de Trichoderma spp. a las 48 horas usando melaza (M1)*



**FIGURA 08.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. en amaranto a partir de melaza (M1) a las 48 horas.

*Crecimiento de Trichoderma spp. a las 72 horas usando melaza (M1)*

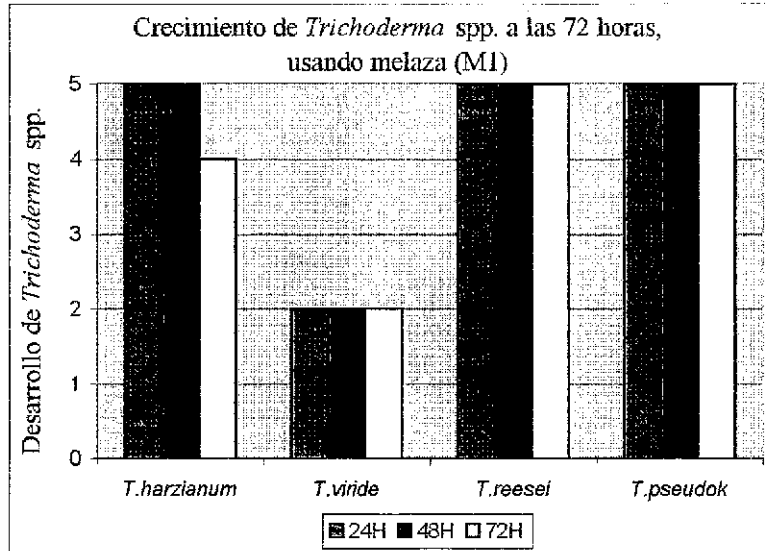


FIGURA 09. Crecimiento de *Trichoderma* spp. en amaranto a partir de melaza (M1) a las 72 horas.

*Crecimiento de Trichoderma spp. a las 24 horas usando malta (M2)*

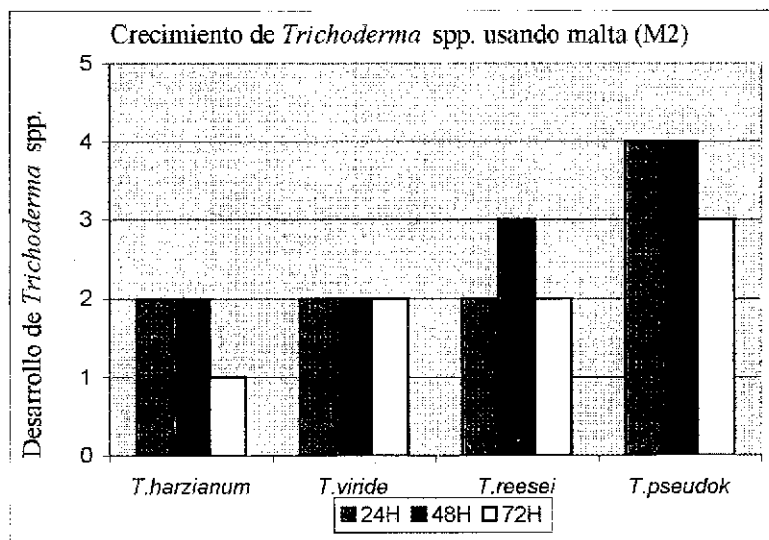
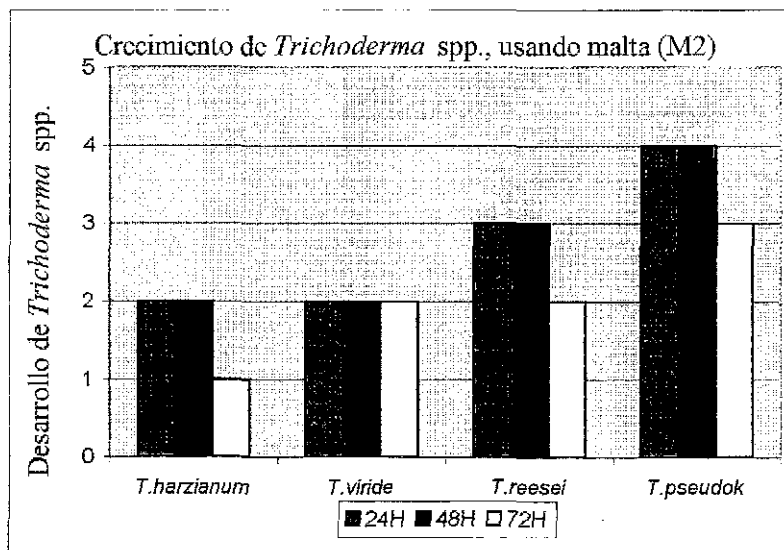


FIGURA 10. Crecimiento de *Trichoderma* spp. en amaranto a partir de malta (M2) a las 24 horas.

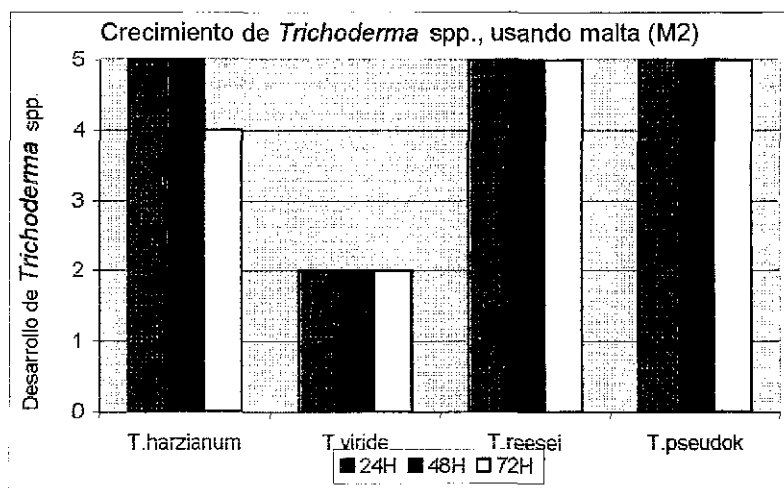


*Crecimiento de Trichoderma spp. a las 48 horas usando malta (M2)*



**FIGURA 11.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. en amaranto a partir de malta (M2) a las 48 horas.

*Crecimiento de Trichoderma spp. a las 72 horas usando malta (M2)*



**FIGURA 12.** Crecimiento de *Trichoderma* spp. en amaranto a partir de malta (M2) a las 72 horas.

Para el número de esporas cosechadas a partir de estos medios líquidos incubados por 24, 48 y 72 horas, el análisis de varianza (Cuadro 15), indica que existe una diferencia altamente significativa para el factor A (*Trichoderma* spp.); mientras que para el resto de factores y sus interacciones no hay diferencia. Por las observaciones realizadas usando la escala anterior se deduce que la diferencia altamente significativa se dio por que *T. viride* no produjo conidias en amaranto. Los medios líquidos preparados con melaza y malta no fueron estadísticamente diferentes pero desde el punto de vista económico melaza fue más barato.

Según la prueba de Tukey al 5% (Cuadro 16), *Trichoderma pseudokoningii* y *T. harzianum* ocuparon los primeros niveles, con una mayor producción de conidias a diferencia de *Trichoderma reesei* y *T. viride*, los cuales se ubicaron en el tercero y último lugar respectivamente.

**CUADRO 15.** Análisis de varianza para producción de esporas en amaranto a partir de dos medios líquidos incubados durante 24, 48 y 72 horas.

F. V	G. L	S.C	C.M	F. Cal.
Factor A	3	1174.059	342.309	0.000**
Factor B	1	1.140	0.997	ns
AB	3	2.605	0.759	ns
Factor C	2	5.123	2.240	0.117ns
AC	6	9.791	1.427	0.224ns
BC	2	2.996	1.310	0.290ns
ABC	6	6.706	0.977	0.279ns
Error	48	54.877		
TOTAL	71	1257.297		

Coefficiente de variación: 15.29%

**CUADRO 16.** Prueba de Tukey al 5%, para producción de esporas en amaranto a partir de dos medios líquidos incubados durante 24, 48 y 72 horas.

Factor A: *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	MEDIA	RANGO
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	9.491	A
<i>Trichoderma harzianum</i>	9.324	B
<i>Trichoderma reesei</i>	9.150	C
<i>Trichoderma viride</i>	0.000	D

#### **E. PRODUCCION DE ESPORAS MEDIANTE INCUBACION SOLIDA EMPLEANDO TRES SUSTRATOS SOLIDOS.**

El propósito de esta prueba fue encontrar un sustrato (s) para la obtención del mayor número de esporas. Los sustratos fueron amaranto, trigo, avena y una mezcla de arroz partido y su cascarilla.

El análisis de varianza (Cuadro 17) indica que fue altamente significativa para los factores A, B y C, así como para la interacción AC, es decir sustratos, *Trichoderma* spp y métodos así como para sustratos vs métodos de esporulación respectivamente. Las interacciones AB, BC, y ABC no fueron significativas.

Según la prueba de Tukey al 5% (Cuadro 18) los mejores tratamientos fueron amaranto y trigo, en los cuales se obtuvo el mayor número de esporas; el nivel B le correspondió a la avena. El tratamiento arroz quebrado mas cascarilla fue eliminado, debido a la incipiente producción de esporas comparado con el resto de sustratos, por lo que no ameritó incluirlo en el análisis estadístico. *Trichoderma pseudokoningii* y *T. reesei* produjeron una mayor esporulación, seguido por *Trichoderma harzianum* (Cuadro 19). Al comparar los métodos de esporulación platos Nun (m1) y bandejas plásticas con mallas metálicas (m2) (Cuadro 20), se observó que el empleo del segundo método, bandejas plásticas con mallas metálicas dio una mayor esporulación, debido posiblemente a la condición aeróbica de este género favorecido por la mayor superficie aireada, sin embargo, el número de esporas no fue lo suficientemente significativo

como para que haya diferencia estadística en la interacción ABC. En la interacción AC (Cuadro 21), se observó que el amaranto y el trigo produjeron el mayor número de conidias cuando se utilizó el método 2 (bandejas de plástico con malla metálica) ocupando los primeros niveles, mientras que el quinto y sexto nivel estuvieron ocupados por la avena con los dos métodos.

De lo anterior se concluye, que desde el punto de vista estadístico, los mejores sustratos sólidos para producir conidias de *Trichoderma* spp son amaranto y trigo. Sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, el amaranto fue el mejor, ya que por su tamaño, forma, dureza y superficie se prestó para una mejor manipulación y presentación del producto como formulación granular en bandejas plásticas con o sin malla.

**CUADRO 17.** Análisis de varianza para producción de esporas de *Trichoderma* spp en tres sustratos sólidos.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. Calc.
Factor A	2	12.844	6.422	0.000**
Factor B	2	0.742	0.371	0.008**
AB	4	0.079	0.020	ns
Factor C	1	3.395	3.395	0.000**
AC	2	0.811	0.405	0.005**
BC	2	0.018	0.009	ns
ABC	4	0.617	0.154	0.077ns
Error	36	0.402	0.067	
TOTAL	53	20.908		

Coefficiente de Variación: 2.8%

**CUADRO 18.** Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de *Trichoderma* spp en tres sustratos sólidos.

Factor A: Sustratos

SUSTRATOS	MEDIA	RANGO
Amaranto	9.621	A
Trigo	9.523	A
Avena	8.541	B

**CUADRO 19.** Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de *Trichoderma* spp. en tres sustratos sólidos.

Factor B: *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	MEDIA	RANGO
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	9.359	A
<i>Trichoderma reesei</i>	9.251	AB
<i>Trichoderma harzianum</i>	9.075	B

**CUADRO 20.** Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de *Trichoderma* spp. en tres sustratos sólidos.

Factor C: Métodos

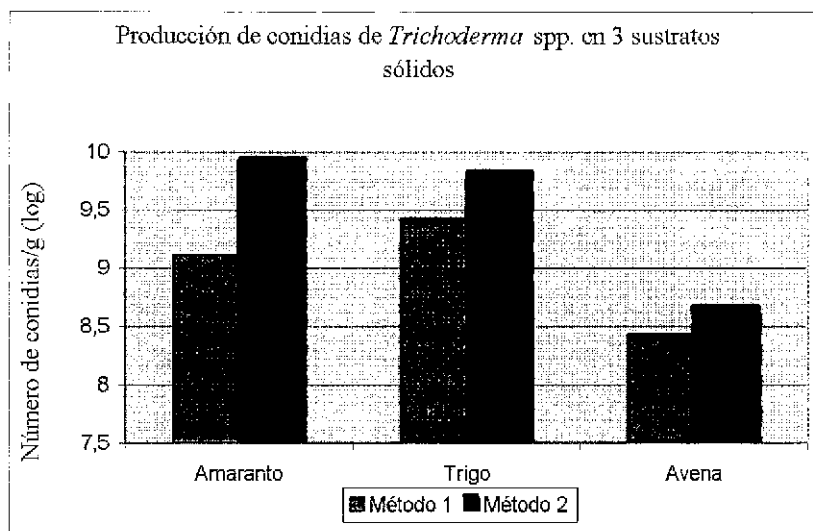
METODOS	MEDIA	RANGO
Método 2 (Rec. plásticos mas malla)	9.479	A
Método 1 (Platos Nun)	8.978	B

**CUADRO 21.** Prueba de Tukey al 5% para producción de esporas de *Trichoderma* spp en tres sustratos sólidos.

Factores AC: Sustratos - Métodos

SUSTRATOS - METODOS	MEDIA	RANGO
Amaranto – método 2	9.940	A
Trigo - método 2	9.832	A
Trigo – método 1	9.410	B
Amaranto – método 1	9.107	B
Avena – método 2	8.666	C
Avena – método 1	8.417	C

La Figura 13 demuestra que los mejores sustratos sólidos para producción de esporas fueron amaranto y trigo usando el método 2. Sin embargo, también se aprecia buena esporulación en estos mismos materiales utilizando el método 1, a diferencia de la avena donde se produjo el menor número de conidias.



**FIGURA 13.** Producción de conidias de *Trichoderma* spp en tres sustratos sólidos, utilizando dos métodos de esporulación.

## F. VIABILIDAD DE LAS ESPORAS DE *Trichoderma* spp EN TRES PORTADORES INERTES ALMACENADAS DURANTE CUATRO SEMANAS A 35°C

El análisis de varianza para esta variable (Cuadro 22), indica que hay diferencia altamente significativa para el factor C, es decir para especies de *Trichoderma* y significativo para la interacción ABC.

Los portadores inertes: caolinita, selita y sulfato de calcio así como los sustratos sólidos: amaranto, trigo y avena no influyeron en la sobrevivencia de las esporas a la temperatura utilizada en esta prueba (35°C). *Trichoderma reesei* y *T. pseudokoningii* presentaron un mayor porcentaje de germinación en todos los portadores inertes en comparación con *Trichoderma harzianum*, aparentemente esta especie podría ser más sensible a esta temperatura o posiblemente es una condición intrínseca de esta especie (Cuadro 23)

La prueba de Tukey al 5% (Cuadro 24) demuestra que el nivel A está ocupado por los tres portadores inertes combinado con *Trichoderma reesei* y *T. pseudokoningii*, mientras que en los últimos niveles se encuentran los tres portadores inertes combinados con *Trichoderma harzianum*.

**CUADRO 22.** Análisis de varianza para viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes almacenadas durante cuatro semanas a 35°C.

F.V	G.L	S.C	C.M	F. Calc.
Factor A	2	5.045	2.522	ns
Factor B	2	4.451	2.226	ns
AB	4	3.891	0.973	ns
Factor C	2	1540.694	770.347	0.000**
AC	4	14.855	3.714	0.381ns
BC	4	24.182	6.045	0.155ns
ABC	8	76.307	9.538	0.013*
Error	54	187.760	3.477	
TOTAL	80	1857.185		

Coefficiente de Variación: 2.11

**CUADRO 23.** Prueba de Tukey al 5% para viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp. en tres portadores inertes almacenadas durante cuatro semanas a 35°C.

Factor C: *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	MEDIA	RANGO
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	91.46	A
<i>Trichoderma reesei</i>	91.16	A
<i>Trichoderma harzianum</i>	82.06	B



**CUADRO 24.** Prueba de Tukey al 5% para viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes almacenadas durante cuatro semanas a 35°C

Factores: ABC: Portadores inertes - sustratos sólidos - *Trichoderma* spp.

Portadores inertes - sustratos sólidos - <i>Trichoderma</i> spp.	MEDIA	RANGO
Caolinita – avena - <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	93.47	A
Selita – avena - <i>Trichoderma reesei</i>	92.87	A
Sulfato de Ca. – trigo - <i>Trichoderma reesei</i>	92.47	A
Caolinita – trigo - <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	92.17	A
Caolinita – amaranto - <i>Trichoderma reesei</i>	92.13	A
Sulfato de Ca. – amaranto - <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	92.00	A
Caolinita – trigo – <i>Trichoderma reesei</i>	91.83	A
Selita – trigo – <i>Trichoderma reesei</i>	91.60	A
Selita – amaranto - <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	91.47	A
Sulfato de Ca. – trigo – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	91.17	A
Selita – avena – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	91.07	A
Sulfato de Ca – amaranto - <i>Trichoderma reesei</i>	91.00	A
Sulfato de Ca. – avena - <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	90.90	A
Caolinita – amaranto – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	90.63	A
Selita – amaranto – <i>Trichoderma reesei</i>	90.50	A
Sulfato de Ca. – avena – <i>Trichoderma reesei</i>	90.43	A
Caolinita – avena – <i>Trichoderma reesei</i>	90.30	A
Selita – trigo – <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	87.60	AB
Caolinita – amaranto – <i>Trichoderma harzianum</i>	83.60	BC
Sulfato de Ca. – avena – <i>Trichoderma harzianum</i>	83.33	BC
Selita – trigo – <i>Trichoderma harzianum</i>	83.03	BC
Selita – amaranto – <i>Trichoderma harzianum</i>	82.87	BC
Sulfato de Ca. – amaranto – <i>Trichoderma harzianum</i>	82.77	BC
Caolinita – trigo – <i>Trichoderma harzianum</i>	82.10	BC
Caolinita – avena – <i>Trichoderma harzianum</i>	80.53	C
Selita – avena – <i>Trichoderma harzianum</i>	80.27	C
Sulfato de Ca. – trigo - <i>Trichoderma harzianum</i>	80.07	C

## **V. CONCLUSIONES**

1. La máxima tasa de esporulación de *Trichoderma* spp. se obtuvo entre el quinto y sexto día de incubación a 26 – 27°C.
2. Los fungicidas Previcur y Strobby no afectaron el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp. El producto Terraclor permitió un crecimiento apreciable de este hongo
3. Las especies de *Trichoderma* estudiadas mostraron diferente aptitud antagónica contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia roreri*.
4. El mejor medio líquido usado para inducir esporulación en el sustrato sólido amaranto fue melaza, incubada por 48 horas. A pesar de que los cultivos líquidos melaza y malta incubados por 72 horas también indujeron buena esporulación, no se recomienda su uso por su difícil manipulación.
5. Los mejores sustratos sólidos para producir conidias de *Trichoderma* spp fueron amaranto y trigo. Sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, amaranto fue el mejor.
6. Los portadores inertes no influyeron en la sobrevivencia de las esporas de *Trichoderma* spp a las cuatro semanas de secamiento a 35 °C. Sin embargo, por las características físicas, selita puede ser usado para formulaciones en polvo y caolinita para granulares.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Cosechar las conidias de *Trichoderma* spp a partir de sustrato sólido entre el quinto y sexto día de incubación a 26 – 27°C.
2. Utilizar los fungicidas Previcur y Stroby en controles integrados contra algunos fitopatógenos ya que éstos no inhiben el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp.
3. Probar Terraclor con dosis menores a las utilizadas en esta investigación.
4. Utilizar melaza como medio líquido para producción de micelio de *Trichoderma* spp , incubada por 48 horas para inducir esporulación en medio sólido.
5. Usar amaranto como sustrato sólido para producir conidias de *Trichoderma* spp.
7. Por sus características físicas utilizar selita como portador de conidias de *Trichoderma* spp.
8. Probar la resistencia de *Trichoderma* spp a otros pesticidas usados comunmente para el control de hongos del suelo y del follaje y aquellos que están promoviéndose, particularmente de las líneas ecológicas o biológicas.
9. Realizar varias pruebas de antagonismo de *Trichoderma* spp con los hongos que causan mayores problemas a nivel radicular y de la filósfera de los cultivos de interés económico
10. Determinar otros sustratos sólidos para el cultivo de *Trichoderma* spp.
11. Establecer otros portadores inertes de esporas de *Trichoderma* spp a diferentes temperaturas y con otros contenedores.

12. Probar la acción antagónica de *Trichoderma* spp en el campo a partir de varias formulaciones sólidas y líquidas con algunos fitopatógenos.
13. Establecer la inocuidad de agentes surfactantes para la aplicación de formulaciones de *Trichoderma* spp.
14. Determinar la habilidad de *Trichoderma* spp como agentes promotores de crecimiento.

## VII. RESUMEN

Como un método alternativo en el combate de enfermedades causadas por patógenos del suelo y de la filósfera, se considero a *Trichoderma* spp por sus múltiples cualidades que lo han convertido en el candidato ideal en el manejo de agroecosistemas.

Sin embargo, para que sea fácilmente disponible y aceptado, es necesario contar con formulaciones apropiadas, por lo que esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

- Determinación de la curva de crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp.
- Evaluación de la resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas.
- Establecimiento del antagonismo de *Trichoderma* spp con *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia royeri*.
- Análisis de dos medios líquidos para el crecimiento de *Trichoderma* spp.
- Evaluación de cuatro sustratos para el crecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp.
- Evaluación de dos métodos de producción de *Trichoderma* spp. a nivel de laboratorio.
- Evaluación de tres sustratos inertes como portadores de esporas de *Trichoderma* spp.

Se utilizó un diseño Completo al Azar con arreglo factorial con tres repeticiones. Para la separación de medias se usó Tukey al 5%

Las variables estudiadas fueron:

- Curva de crecimiento de *Trichoderma* spp.

- Resistencia de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia roreri*.
- Producción de esporas de *Trichoderma* spp a partir de cultivo líquido incubado por 24, 48 y 72 horas.
- Producción de esporas de *Trichoderma* spp en cuatro sustratos sólidos.
- Viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes.

Con el objeto de conocer el mejor tiempo de cosecha de conidias, se estudió la curva de crecimiento y esporulación de este hongo, la misma que se determinó entre el quinto y sexto día.

Para la segunda variable estudiada, es decir resistencia de *Trichoderma* spp a ocho fungicidas, se concluye que *Trichoderma* spp puede ser aplicado conjuntamente con los fungicidas Previcur y Stroby, los mismos que no causaron daño a este hongo, demostrado por su normal crecimiento y esporulación.

Para el caso de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. *Sclerotinia sclerotiorum* y *Monilia roreri*, las cuatro especies de *Trichoderma* spp. presentaron especificidad en su control. Sin embargo, se destaca *Trichoderma viride* y *pseudokoningii* para el combate de *Botrytis cinerea*, mientras que *Trichoderma harzianum* hace un mejor control de *Monilia roreri*, donde se pudo observar parasitismo.

El mejor medio líquido fue melaza (M1) incubada por 48 horas. Para la producción de esporas de *Trichoderma* spp en sustratos sólidos, los tratamientos correspondientes a amaranto y trigo en bandejas con o sin malla resultaron los mejores, con la mayor producción de esporas a partir de melaza (M1) incubada por 48 horas, pero las cualidades físicas del amaranto le hacen el mejor sustrato sólido. Finalmente, a pesar de que estadísticamente no presentaron diferencias significativas los tres portadores inertes, selita debe ser escogido para formulaciones en polvo mojable y caolinita para formulaciones granulares por sus cualidades físicas.

## VIII. SUMMARY

As an alternative method for the control of plant diseases caused by phylosphere and soil pathogens, it was considered *Trichoderma* spp because of its multiple qualities, which have made it the ideal candidate in the agroecosystems management.

However, in order to make this fungus easily available and accepted, it is necessary to have appropriated formulations. For this reason, this research had the following objectives:

- To determine the sporulation and growth curve of *Trichoderma* spp.
- To evaluate the resistance of *Trichoderma* spp to eight fungicides.
- To establish the antagonism of *Trichoderma* spp against *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Monilia roreri*.
- To study two liquid media for the growth of *Trichoderma* spp.
- To evaluate four substrate for the growth and sporulation of *Trichoderma* spp.
- To evaluate two production methods of *Trichoderma* spp., under laboratory conditions.
- To evaluate three inert substrates as carries of *Trichoderma* spp. spores.

A Completely Randomised Design, with factorial arrangement and three replications, was utilised. The Tuckey test, at 5% level of significance, was used for mean separation.

The variables under study were:

- Growth curve of *Trichoderma* spp.

- Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* and *Monilia roseri*.
- Production of *Trichoderma* spp spores in a liquid culture incubated 24, 48 and 72 hours.
- Production of *Trichoderma* spp spores in four solid substrates.
- Viability of *Trichoderma* spp spores in three inert carriers.

With the purpose of knowing the best time for the harvesting of conidia, it was studied the growth and sporulation curve of this fungus. It was determined that the best time was between the fifth and sixth days.

For the resistance of *Trichoderma* spp to eight fungicides, it was concluded *Trichoderma* spp can be applied together with Previcur and Stroby, because they do not caused damage to the fungus, with had a normal growth and sporulation.

The four studied species of *Trichoderma* showed antagonism against *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. *Sclerotinia sclerotiorum* and *Monilia roseri*. However, *Trichoderma viride* and *T. pseudokoningii* had a better control of *Botrytis cinerea*, while *Trichoderma harzianum* was more effective against *Monilia roseri*, where it was possible to observe parasitism.

The best growth was observed molasses (M1) after 48 hours of incubation. For spore production of *Trichoderma* spp in solid substrate, the treatments with amaranto and wheat on trays with and without mesh, proved to be the best, although the physical qualities of amaranto make it the most appropriated substrate. Finally, even though there were not statistically significant differences among the inert carriers, because their physical qualities, "selita" (diatomaceous earth) should be chosen for wetting powder formulations, and kaolinite for granular ones.



## **IX. BIBLIOGRAFIA**

Alexander, M. 1980. Microbiología del suelo. Segunda edición. Libros y editoriales, S.A. 491p.

Atlas, R.M. 1993. Management of environment through biotechnology. World journal of microbiology and biotechnology. MIRCEN Network. P: 493, 494.

Agosin, E. et al 1997. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. World J. Microbiol. Biotechnol. 13: 225 – 232.

Askew, D. J. and Laing, M. D. 1993. The in vitro screening of *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. Plant and soil 159. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 5p.

Beagle – Ristaino, J. E. and Papavizas, G. C. 1985. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. Phytopathology 75: 729 – 732.

Bhatnagar, H. 1995. Integrated use of biocontrol agents with fungicides to control wilt incidence in pigeon – pea. World journal of microbiology & biotechnology. UNESCO. Vol. 11 Number 5. p 564

Blakeman, J. P. 1975. Germination of *Botrytis cinerea* conidia in vitro in relation of nutrient conditions on leaf surfaces. Trans. Br. Mycol. Soc. 65: 239 – 247.

Carballo, M. 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. Manejo integrado de plagas. Hoja técnica N° 25. CATIE. Costa Rica. 4 p.

Claydon, N. et al. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88: 503 – 513.

Corke, A. T. 1974. The prospect for biotherapy in trees infected by silver leaf. *J. Hort. Sci.* 49: 391 – 394

Chang, Y. C. and Baker, R. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70: 145 – 148.

Danielson, R. M. and Davey, C. B. 1973. Effect of nutrients and acidity on coniospore germination of *Trichoderma* in vitro. *Soil Biol. Biochem.* 5: 485 – 494.

Dasilva, D. and Ratledge. 1987. *Microbial technology in the Developing world.* Oxford University Press. London. 444 p.

Di Pietro, A. et al. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83: 308 – 313.

Dubos, B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In I. Chet (ed), *Innovative Approaches to Plant Disease Control.* Wiley, New York, pp. 107 – 135.

Elad, Y. et al. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28: 719 – 725.

Elad, Y. and Kirshner, B. 1992. Establishment of an active *Trichoderma* populations in the phylloplane and its effect on grey mould (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica* 20: 86. 188 – 194.

Elad, Y. et al. 1993. Isolate of *Trichoderma* fungicidal compositions containing said isolate and use against *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*. United States Patent 5, 238, 690.

Fokkema, N. J. 1995. Strategies for biocontrol of foliar fungal disease. In M. Manka (ed.), *Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control.* The Polish Phytopathological Society, Poznan, pp. 69 – 79.

Gomero, L. y Lizarraga, A. 1995. Aportes del control biológico en la Agricultura sostenible. Red de acción en alternativas al uso de agroquímicos. Editorial Gráfica Sttefany. Lima. 465 p.

Gutierrez, G. Et al. 1981. Relaciones ecológicas. Editorial Blume. Barcelona España. 151 pp.

Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, k. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 23: 1011 – 1020.

Grillo, H. et al. 1996. Nuevo sistema para la producción de algunos hongos empleados en el control biológico. Centro Agrícola. Centro de investigaciones Agropecuarias, Universidad Central de las Villas. Cuba. 6 p.

Hassan, S. A. and P. A. Omen. 1985. Intergration of biological and chemical control of diseases and minor pests, N.W. Hussey and N. Scopes. Biological pest control: Cornell Univ. N. Y. p. 145-165.

Hadar, Y. et al. 1992. Biological control of soil borne plant pathogens by suppressive compost. In E. C. Tjanos (ed.), biological control of plant Disease. Plenum Press, New York, pp. 79 – 83.

Harman, G. E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatment. Plant Dis. 73: 631 – 637.

Harman, G. E. 1991. Seed treatments for biological control of plant disease. Crop Prot. 10: 166 – 171.

Harman, G. E. 1992. Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. J. Plant Nutr. 15: 835 – 843.

Harman, G. E. and Nelson, E. B. 1994. Mechanisms of protection of seed and seedlings by biological seed treatments: implications for practical disease control.

- Harman, G. E. and Kubicek, C. 1998. *Trichoderma & Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial applications. Volume 2. Taylor & Francis. UK. 393 p.
- Harman, G. E. 1998. *Trichoderma* for Biocontrol of Plant Pathogens: from basic Research to Commercialized products. Conference on Biological pest control. CORNELL COMMUNITY. Cornell University NYSAES. Geneva, 14456. 6 p.
- Howell, C. R. et al. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling disease. *Biocontrol Sci. and Technol.* 3: 435 – 441.
- Hoitink, H. A. J. et al. 1991. Status of compost – emended potting mixes naturally suppressive to soilborne disease of floricultural crops. *Plant Dis.* 75: 869 – 873.
- Jin, X. et al. 1991. Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. *Biol Control* 1: 237 – 243.
- Kleifeld, O. and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144: 267 – 272.
- Kohl, J. et al. 1995. Suppression of sporulation of *Botrytis* spp as a valid biocontrol strategy. *Eur. J. Plant pathol.* 101: 251 – 259.
- Kubicek, C. and Harman, G. 1998. *Trichoderma & Gliocladium*. Basic Biology, taxonomy and genetics. Volume 1. Taylor & Francis. UK. 278 p.
- Kuter, G. A. et al. 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia* damping-off. *Phytopathology* 73: 1450 – 1456.
- Latimer, J. Et al. 1996. Reducing pollution potential of pesticides and fertilizers. *HortTechnology*. Volume 6, Number 2. American Society for Horticultural Science. Denver Colorado. 115-122 p.

- Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1983. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* in liquid and solid growth media. *Soil Biol. Biochem.* 15: 351 – 357.
- Lindsey, D. L. and Baker, R. 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 78: 1262 – 1263.
- Lorito, M. et al. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of glucan – 1, 3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398 – 405.
- Lorito, M. et al. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molec. Plant- Microbe Interact.* 9: 206- 213.
- Lumsden, R. D. et al. 1995. Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control. *Canadian Journal of plant pathology*. Toronto. 6 p.
- Martin (de.), seed treatment: Progress and Prospects. *British Crop Protection Council Monograph N° 57* Canterbury, UK. Pp. 283 – 292.
- Martinez, B. y Solano, T. 1995. Antagonismo de *Trichoderma* spp frente a *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout. Dpto. Fitopatología Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). La Habana. 3 p.
- Neill, T. M. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Pathology*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 6p.
- Nelson, E. E. et al. 1995. Effects of *Trichoderma* spp and ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. *Mycol. Res.* 99: 957 – 962.
- Papavizas, G. C. 1982. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and pea and bean rhizospheres. *Phytopathology* 71: 121 – 125.

Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev Phytopathology*. 17: 23 – 54.

Pedreschi, F. and Aguilera, D. 1997. Viability of dry *Trichoderma harzianum* spores under storage. *Bioprocess Eng.* 17: 177 – 183

Pirozynski, K.A. 1988. Coevolution of fungi with plants and animals. Academic Press. Oxford. Great Britain. 285 p.

Sasson, A. 1994. Biotechnologies en developing countries: present and future. *World Journal of microbiology and biotechnology*. MIRCEN Network. UNESCO. P: 127-128.

Sivan, A. and Chet, I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*. 80: 880 – 885.

Smith, V. L. et al. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 79: 198 – 203.

Soglio, F. K. 1998. production of chitinolytic enzymes and endoglucanasa in the soybean rhizosphere in the presence of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. Biological control article N° BC 980623. Academic Press. Illinois. 7 p.

Swan, A. and Chet, I. 1986. Possible mechanism for control of *Fusarium* spp by *Trichoderma harzianum*. *Proc. Br. Crop Prot. Conf.* “: 865 – 875.

Vélez, P. E. et al. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Cenicafé. Federación Nacional de cafetaleros de Colombia. 36 p.

Weber, F. 1996. Fungal antagonists production by solid- substrate fermentation. PhD-projects of OSPT – Wageningen. 3p.

Zhang, G. et al. 1996. Compost – induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology* 86: 1066- 1070.

Zymand, G. et al. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255 – 1260.

## X. ANEXOS

ANEXO 1. Curva de crecimiento de *Trichoderma* spp durante 15 días, expresado en logaritmo.

Días	<i>T. harzianum</i>	<i>T. reesei</i>	<i>T.pseudokoningii</i>	<i>T. viride</i>
1	6,7	7,76	7,89	6,7
2	6,88	7,80	7,92	6,88
3	8,16	8,93	8,71	7,59
4	9,07	9,33	9,29	8,16
5	9,12	9,21	9,26	8,48
6	9,49	9,69	9,63	8,86
7	9,64	9,67	9,83	9,07
8	9,82	9,63	9,73	8,96
9	9,96	9,68	9,94	9,11
10	9,94	9,93	10,02	9,02
11	9,79	9,76	9,95	8,95
12	9,72	9,63	9,88	8,89
13	9,59	9,68	9,88	8,88
14	9,91	9,84	10,12	8,88
15	9,72	9,85	10,13	8,83



**ANEXO 2.** Producción de esporas de *Trichoderma* spp en amaranto a partir de medio líquido incubado por 24, 48 y 72 horas, expresado en logaritmo.

Variables:

A: *Trichoderma* spp. B: Medios líquidos. C: Tiempos de incubación. R: Repeticiones

A	B	C	R						
1	1	1	1	9,69	2	1	1	1	9,49
1	1	1	2	9,82	2	1	1	2	9,59
1	1	1	3	9,57	2	1	1	3	9,38
1	1	2	1	9,93	2	1	2	1	9,51
1	1	2	2	9,77	2	1	2	2	9,92
1	1	2	3	9,80	2	1	2	3	9,71
1	1	3	1	9,46	2	1	3	1	9,05
1	1	3	2	9,62	2	1	3	2	8,80
1	1	3	3	9,33	2	1	3	3	8,59
1	2	1	1	9,75	2	2	1	1	9,38
1	2	1	2	9,53	2	2	1	2	9,44
1	2	1	3	9,68	2	2	1	3	9,62
1	2	2	1	9,65	2	2	2	1	9,72
1	2	2	2	9,74	2	2	2	2	9,77
1	2	2	3	9,80	2	2	2	3	9,87
1	2	3	1	9,46	2	2	3	1	8,54
1	2	3	2	9,59	2	2	3	2	8,80
1	2	3	3	9,21	2	2	3	3	8,65
3	1	1	1	9,65	4	1	1	1	0,00
3	1	1	2	9,25	4	1	1	2	0,00
3	1	1	3	9,20	4	1	1	3	0,00
3	1	2	1	9,80	4	1	2	1	0,00
3	1	2	2	10,09	4	1	2	2	0,00
3	1	2	3	10,02	4	1	2	3	0,00
3	1	3	1	9,05	4	1	3	1	0,00
3	1	3	2	8,81	4	1	3	2	0,00
3	1	3	3	8,95	4	1	3	3	0,00
3	2	1	1	9,89	4	2	1	1	0,00
3	2	1	2	9,73	4	2	1	2	0,00
3	2	1	3	9,56	4	2	1	3	0,00
3	2	2	1	10,03	4	2	2	1	0,00
3	2	2	2	9,88	4	2	2	2	0,00
3	2	2	3	9,83	4	2	2	3	0,00
3	2	3	1	9,05	4	2	3	1	0,00
3	2	3	2	8,99	4	2	3	2	0,00
3	2	3	3	9,05	4	2	3	3	0,00

**ANEXO 3.** Resistencia de *Trichoderma* spp a: Benlate, Captan, Cobre Nordox, Terraclor, Previcur, Stroby, Vitavax y Daconil. Radio de crecimiento en cm de las colonias.

A: Fungicidas. B: *Trichoderma* spp. C: Dosis. R: Repeticiones

A	B	C	R											
1	1	1	1	0,00	0,00	0,00	2	1	1	1	0,00	0,10	0,20	
1	1	1	2	0,00	0,00	0,00	2	1	1	2	0,00	0,10	0,10	
1	1	1	3	0,00	0,00	0,00	2	1	1	3	0,00	0,00	0,10	
1	1	2	1	0,00	0,00	0,00	2	1	2	1	0,00	0,10	0,10	
1	1	2	2	0,00	0,00	0,00	2	1	2	2	0,00	0,10	0,10	
1	1	2	3	0,00	0,00	0,00	2	1	2	3	0,00	0,10	0,10	
1	2	1	1	0,00	0,00	0,00	2	2	1	1	0,00	0,00	0,00	
1	2	1	2	0,00	0,00	0,00	2	2	1	2	0,00	0,00	0,00	
1	2	1	3	0,00	0,00	0,00	2	2	1	3	0,00	0,00	0,00	
1	2	2	1	0,00	0,00	0,00	2	2	2	1	0,00	0,00	0,00	
1	2	2	2	0,00	0,00	0,00	2	2	2	2	0,00	0,00	0,00	
1	2	2	3	0,00	0,00	0,00	2	2	2	3	0,00	0,00	0,00	
1	3	1	1	0,00	0,00	0,00	2	3	1	1	0,20	0,70	0,80	
1	3	1	2	0,00	0,00	0,00	2	3	1	2	0,20	0,70	1,20	
1	3	1	3	0,00	0,00	0,00	2	3	1	3	0,10	0,80	1,70	
1	3	2	1	0,00	0,00	0,00	2	3	2	1	0,00	0,30	0,50	
1	3	2	2	0,00	0,00	0,00	2	3	2	2	0,00	0,10	0,50	
1	3	2	3	0,00	0,00	0,00	2	3	2	3	0,00	0,20	0,60	
1	4	1	1	0,00	0,00	0,00	2	4	1	1	0,10	0,70	1,00	
1	4	1	2	0,00	0,00	0,00	2	4	1	2	0,20	0,50	0,80	
1	4	1	3	0,00	0,00	0,00	2	4	1	3	0,20	0,70	0,80	
1	4	2	1	0,00	0,00	0,00	2	4	2	1	0,30	0,40	0,60	
1	4	2	2	0,00	0,00	0,00	2	4	2	2	0,00	0,20	0,30	
1	4	2	3	0,00	0,00	0,00	2	4	2	3	0,10	0,30	0,70	
3	1	1	1	0,00	0,00	0,00	4	1	1	1	0,30	1,20	3,40	
3	1	1	2	0,00	0,00	0,00	4	1	1	2	0,30	1,80	3,50	
3	1	1	3	0,00	0,00	0,00	4	1	1	3	0,20	1,40	4,50	
3	1	2	1	0,00	0,00	0,00	4	1	2	1	0,00	0,40	2,50	
3	1	2	2	0,00	0,00	0,00	4	1	2	2	0,00	0,70	4,50	
3	1	2	3	0,00	0,00	0,00	4	1	2	3	0,00	0,20	2,80	
3	2	1	1	0,00	0,00	0,00	4	2	1	1	0,70	2,10	3,10	
3	2	1	2	0,00	0,00	0,00	4	2	1	2	0,70	2,40	3,00	
3	2	1	3	0,00	0,00	0,00	4	2	1	3	0,60	1,90	3,30	
3	2	2	1	0,00	0,00	0,00	4	2	2	1	0,50	2,00	3,20	
3	2	2	2	0,00	0,00	0,00	4	2	2	2	0,80	1,60	2,70	
3	2	2	3	0,00	0,00	0,00	4	2	2	3	0,30	2,50	3,10	
3	3	1	1	0,00	0,00	0,00	4	3	1	1	1,20	3,30	4,50	
3	3	1	2	0,00	0,00	0,00	4	3	1	2	1,30	3,50	4,50	
3	3	1	3	0,00	0,00	0,00	4	3	1	3	1,00	3,10	4,50	
3	3	2	1	0,00	0,00	0,00	4	3	2	1	0,70	2,20	3,40	

3	3	2	2	0,00	0,00	0,00	4	3	2	2	0,60	1,80	2,40
3	3	2	3	0,00	0,00	0,00	4	3	2	3	0,70	2,50	4,20
3	4	1	1	0,20	0,80	1,40	4	4	1	1	0,40	0,70	1,00
3	4	1	2	0,30	1,20	1,80	4	4	1	2	0,50	0,70	1,10
3	4	1	3	0,20	1,00	1,50	4	4	1	3	0,30	0,60	0,80
3	4	2	1	0,10	0,70	1,00	4	4	2	1	0,00	0,70	1,60
3	4	2	2	0,10	0,80	1,20	4	4	2	2	0,00	0,60	1,20
3	4	2	3	0,20	0,50	1,00	4	4	2	3	0,00	0,80	1,80
5	1	1	1	4,50	4,50	4,50	6	1	1	1	4,50	4,50	4,50
5	1	1	2	4,50	4,50	4,50	6	1	1	2	4,50	4,50	4,50
5	1	1	3	4,50	4,50	4,50	6	1	1	3	4,50	4,50	4,50
5	1	2	1	4,50	4,50	4,50	6	1	2	1	4,50	4,50	4,50
5	1	2	2	4,50	4,50	4,50	6	1	2	2	4,50	4,50	4,50
5	1	2	3	4,50	4,50	4,50	6	1	2	3	4,30	4,50	4,50
5	2	1	1	4,50	4,50	4,50	6	2	1	1	3,30	4,50	4,50
5	2	1	2	4,50	4,50	4,50	6	2	1	2	3,70	4,50	4,50
5	2	1	3	4,50	4,50	4,50	6	2	1	3	3,50	4,50	4,50
5	2	2	1	4,50	4,50	4,50	6	2	2	1	3,00	4,20	4,50
5	2	2	2	4,50	4,50	4,50	6	2	2	2	2,80	4,00	4,50
5	2	2	3	4,50	4,50	4,50	6	2	2	3	2,60	3,80	4,50
5	3	1	1	3,60	4,50	4,50	6	3	1	1	1,90	3,20	4,50
5	3	1	2	3,80	4,50	4,50	6	3	1	2	1,60	3,00	4,50
5	3	1	3	4,00	4,50	4,50	6	3	1	3	1,80	3,60	4,50
5	3	2	1	3,20	4,50	4,50	6	3	2	1	1,80	3,50	4,50
5	3	2	2	3,50	4,50	4,50	6	3	2	2	1,70	3,30	4,50
5	3	2	3	3,70	4,50	4,50	6	3	2	3	1,40	3,40	4,50
5	4	1	1	4,50	4,50	4,50	6	4	1	1	1,60	3,50	4,50
5	4	1	2	4,50	4,50	4,50	6	4	1	2	1,20	3,10	4,50
5	4	1	3	4,50	4,50	4,50	6	4	1	3	1,30	3,50	4,50
5	4	2	1	4,50	4,50	4,50	6	4	2	1	0,70	2,40	4,50
5	4	2	2	4,50	4,50	4,50	6	4	2	2	0,60	2,40	4,50
5	4	2	3	4,50	4,50	4,50	6	4	2	3	0,50	2,60	4,50
7	1	1	1	0,00	0,00	0,00	8	1	1	1	0,00	0,00	0,00
7	1	1	2	0,00	0,00	0,00	8	1	1	2	0,00	0,00	0,00
7	1	1	3	0,00	0,00	0,00	8	1	1	3	0,00	0,00	0,00
7	1	2	1	0,00	0,00	0,00	8	1	2	1	0,00	0,00	0,00
7	1	2	2	0,00	0,00	0,00	8	1	2	2	0,00	0,00	0,00
7	1	2	3	0,00	0,00	0,00	8	1	2	3	0,00	0,00	0,00
7	2	1	1	0,00	0,00	0,00	8	2	1	1	0,00	0,00	0,00
7	2	1	2	0,00	0,00	0,00	8	2	1	2	0,00	0,00	0,00
7	2	1	3	0,00	0,00	0,00	8	2	1	3	0,00	0,00	0,00
7	2	2	1	0,00	0,00	0,00	8	2	2	1	0,00	0,00	0,00
7	2	2	2	0,00	0,00	0,00	8	2	2	2	0,00	0,00	0,00
7	2	2	3	0,00	0,00	0,00	8	2	2	3	0,00	0,00	0,00
7	3	1	1	0,00	0,00	0,00	8	3	1	1	0,00	0,00	0,00
7	3	1	2	0,00	0,00	0,00	8	3	1	2	0,00	0,00	0,00
7	3	1	3	0,00	0,00	0,00	8	3	1	3	0,00	0,00	0,00
7	3	2	1	0,00	0,00	0,00	8	3	2	1	0,00	0,00	0,00
7	3	2	2	0,00	0,00	0,00	8	3	2	2	0,00	0,00	0,00
7	3	2	3	0,00	0,00	0,00	8	3	2	3	0,00	0,00	0,00
7	4	1	1	0,00	0,00	0,00	8	4	1	1	0,00	0,10	0,20

7	4	1	2	0,00	0,00	0,00	8	4	1	2	0,00	0,30	0,80
7	4	1	3	0,00	0,00	0,00	8	4	1	3	0,00	0,40	1,00
7	4	2	1	0,00	0,00	0,00	8	4	2	1	0,00	0,00	0,00
7	4	2	2	0,00	0,00	0,00	8	4	2	2	0,00	0,00	0,00
7	4	2	3	0,00	0,00	0,00	8	4	2	3	0,00	0,00	0,00

**ANEXO 4.** Producción de esporas de *Trichoderma* spp en tres sustratos sólidos.

Variables:

A: Sustratos sólidos. B: *Trichoderma* spp. C: métodos

1	1	1	1	9,00	3	1	1	1	8,45
1	1	1	2	8,95	3	1	1	2	8,00
1	1	1	3	9,38	3	1	1	3	8,90
1	1	2	1	10,00	3	1	2	1	8,60
1	1	2	2	9,81	3	1	2	2	8,36
1	1	2	3	10,51	3	1	2	3	8,84
1	2	1	1	9,29	3	2	1	1	8,18
1	2	1	2	9,10	3	2	1	2	8,00
1	2	1	3	9,00	3	2	1	3	8,36
1	2	2	1	9,72	3	2	2	1	8,58
1	2	2	2	8,88	3	2	2	2	8,50
1	2	2	3	9,95	3	2	2	3	8,69
1	3	1	1	9,08	3	3	1	1	8,61
1	3	1	2	9,14	3	3	1	2	8,45
1	3	1	3	9,02	3	3	1	3	8,80
1	3	2	1	10,12	3	3	2	1	8,70
1	3	2	2	10,06	3	3	2	2	8,91
1	3	2	3	10,41	3	3	2	3	8,81
1	1	1	1	9,30					
2	1	1	2	9,05					
2	1	1	3	9,77					
2	1	2	1	9,86					
2	1	2	2	9,89					
2	1	2	3	9,85					
2	2	1	1	9,23					
2	2	1	2	9,00					
2	2	1	3	9,46					
2	2	2	1	9,81					
2	2	2	2	9,93					
2	2	2	3	9,67					
2	3	1	1	9,60					
2	3	1	2	9,86					
2	3	1	3	9,42					
2	3	2	1	9,89					
2	3	2	2	9,99					
2	3	2	3	9,60					

ANEXO 5. Viabilidad de las esporas de *Trichoderma* spp en tres portadores inertes

Variables:

A: Portadores inertes. B: Sustratos sólidos. C: *Trichoderma* spp.

A	B	C	R						
1	1	1	1	92,6	2	2	2	3	80
1	1	1	2	90	2	2	3	1	92
1	1	1	3	88,9	2	2	3	2	93,4
1	1	2	1	84,3	2	2	3	3	91,1
1	1	2	2	83,1	2	3	1	1	87,7
1	1	2	3	81,2	2	3	1	2	89,9
1	1	3	1	89,6	2	3	1	3	93,3
1	1	3	2	91,5	2	3	2	1	78
1	1	3	3	93,3	2	3	2	2	82,3
1	2	1	1	91,6	2	3	2	3	81,3
1	2	1	2	91	2	3	3	1	92
1	2	1	3	92,2	2	3	3	2	93,3
1	2	2	1	84,6	2	3	3	3	95,1
1	2	2	2	81,7	3	1	1	1	91
1	2	2	3	82,8	3	1	1	2	92,2
1	2	3	1	88,3	3	1	1	3	89,8
1	2	3	2	89,2	3	1	2	1	80
1	2	3	3	85,3	3	1	2	2	85,3
1	3	1	1	94,3	3	1	2	3	83
1	3	1	2	91,7	3	1	3	1	90,3
1	3	1	3	92,6	3	1	3	2	92,2
1	3	2	1	81,3	3	1	3	3	93,5
1	3	2	2	80,3	3	2	1	1	95,3
1	3	2	3	79,2	3	2	1	2	90,3
1	3	3	1	92,3	3	2	1	3	91,8
1	3	3	2	91,4	3	2	2	1	76
1	3	3	3	89,5	3	2	2	2	81,1
2	1	1	1	92,3	3	2	2	3	83,1
2	1	1	2	90,8	3	2	3	1	91
2	1	1	3	93,3	3	2	3	2	92,2
2	1	2	1	86	3	2	3	3	90,5
2	1	2	2	81,5	3	3	1	1	91,6
2	1	2	3	83,3	3	3	1	2	90
2	1	3	1	89,6	3	3	1	3	89,7
2	1	3	2	92,3	3	3	2	1	84,6
2	1	3	3	90	3	3	2	2	83,3
2	2	1	1	93,3	3	3	2	3	82,2
2	2	1	2	90,7	3	3	3	1	88,9
2	2	1	3	91,5	3	3	3	2	90,7
2	2	2	1	85	3	3	3	3	93,1
2	2	2	2	81,3					