



Cultivo dual *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. patógeno de *Passiflora ligularis* Juss

Dual *in vitro* culture of native strains of *Trichoderma* spp. against *Botrytis* sp. pathogen of *Passiflora ligularis* Juss

Luis T. Acosta^{1,a,*}, Deysi K. Azania^{1,b}, Rolando Azania^{1,c}

¹ Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Oxapampa, Perú.

^a Ing., ✉ luistibhy@hotmail.com,  <https://orcid.org/0000-0002-1276-1777>

^b Ing., ✉ deysikaf@hotmail.com,  <https://orcid.org/0000-0003-1441-7897>

^c Ing., ✉ rolandfox18@gmail.com,  <https://orcid.org/0000-0002-5130-4923>

* Autor de Correspondencia: Tel. +51 941696300

<http://dx.doi.org/10.25127/riagrop.20214.720>

<http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/RIAGROP>

revista.riagrop@untrm.edu.pe

Recepción: 11 de agosto 2021

Aprobación: 28 de agosto 2021

Este trabajo tiene licencia de Creative Commons.
Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0
International Public License – CC-BY-NC-SA 4.0

Resumen

El objetivo de la investigación fue evaluar el nivel de antagonismo de trece cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. A nivel *in vitro*, se evaluó mediante el método de cultivo dual en placas Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA), donde se observó crecimiento radial, competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y grado de inhibición; se utilizó el diseño completamente aleatorio, con 27 tratamientos y 4 repeticiones. Los resultados del enfrentamiento de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. mostraron un superior crecimiento radial para *Trichoderma*. Por otro lado, todos los tratamientos de *Trichoderma* spp. lograron restringir el desarrollo de *Botrytis* sp., con respecto a su testigo. En la competencia por espacio y nutrientes, las cepas nativas evaluadas de *Trichoderma* pueden ser un recurso valioso para su evaluación en el control biológico de otras enfermedades en el cultivo de granadilla, como también en el establecimiento de dosis efectivas de las cepas de *Trichoderma* spp. para el control preventivo de plántulas de granadilla a nivel de invernadero y campo.

Palabras claves: granadilla, control biológico, enfermedades, dosis.

Abstract

The objective of the research was evaluate the level of antagonism of thirteen native strains of *Trichoderma* spp. against *Botrytis* sp. At the *in vitro* level, it was evaluated by the method dual culture in Petri dishes with Potato Dextrose Agar (PDA), where growth was observed radial, space competition and nutrients, mycoparasitism and degree inhibition; the design was used completely random, with 27 treatments and 4 repetitions. The results of the confrontation of the strains of *Trichoderma* spp. versus *Botrytis* sp. showed a superior radial growth for *Trichoderma*. On the other hand, all *Trichoderma* spp. treatments managed to restrict the development of *Botrytis* sp. regarding your witness; in the competition for space and nutrients. The native strains evaluated from *Trichoderma* can be a valuable resource for evaluation in the biological control of other diseases in the cultivation of sweet granadilla, as well as in the establishment of effective doses of the strains of *Trichoderma* spp. for the preventive control of sweet granadilla seedlings at the greenhouse and field level.

Keywords: sweet granadilla, biological control, diseases, dose.

1. INTRODUCCIÓN

En el antagonismo, se conoce un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos. Este efecto es aprovechado por el hombre para la regulación, tanto de patógenos cuyo hábitat es el suelo, como aquellos que se desarrollan en la parte foliar de las plantas (Infante *et al.* 2009). Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas al control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica y efecto estimulante sobre los cultivos (Infante *et al.* 2009).

La producción de granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) en Oxapampa es afectada por enfermedades, sobre todo, en los meses de mayor precipitación, causada por *Botrytis* sp., *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. entre otros.

El control de estos hongos patógenos, actualmente, se realiza con plaguicidas que son aplicados al follaje, a las semillas y al suelo. Su uso origina problemas tales como la destrucción de la capa de ozono; contaminación del ambiente, al acumularse en el agua, suelo, plantas y animales; peligro para la salud de los agricultores cuando el uso es sin ningún tipo de protección y precaución; enfermedades en humanos y animales cuando se consumen productos vegetales contaminados con residuos tóxicos que pueden producir la muerte; exterminio de microorganismos benéficos, muchas veces alteran el equilibrio ecológico; resistencia por parte de los patógenos y conversión en plaga de aquellos organismos no considerados como tales.

La búsqueda de alternativas al uso de los plaguicidas direcciona la mirada de los investigadores hacia los microorganismos, para su utilización como agentes de control biológico, en el control de patógenos de plantas. Esto es por la diversidad de microorganismos

nativos factibles de utilizarse, tanto hongos como bacterias, reconocidos como supresores de patógenos de plantas, limitando la severidad de las enfermedades en los cultivos (Memenza, 2009).

Trichoderma spp. es de distribución cosmopolita. Se presenta principalmente en zonas que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Los mecanismos de acción que presentan distintas especies del género *Trichoderma* se apoyan principalmente en la fuerte capacidad competitiva por espacio y nutrientes, también se han reportado como parásitos de gran número de organismos fungosos fitopatógenos (Esparza, 2009). En el estudio de investigación aislamiento, identificación y caracterización cultural de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en la provincia de Oxapampa, se caracterizó culturalmente en medio de cultivo PDA 15 cepas nativas de *Trichoderma* y se describió las características macroscópicas y microscópicas más importantes, siendo las especies *T. viride* y *T. harzianum* las más abundantes de esta colección (Rosales 2012). Por tanto, es necesario la prueba *in vitro* de trece cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp., considerado como uno de los principales patógenos de *P. ligularis* Juss. El objetivo de este trabajo fue evaluar el nivel de antagonismo de trece cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp., resultados que permitirá a los investigadores disponer de información importante para la selección y uso de este controlador biológico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de estudio

El experimento fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional

Daniel Alcides Carrión, sede Oxapampa, ubicada en el distrito y provincia de Oxapampa, región de Pasco; las condiciones del ambiente dentro del laboratorio fueron en promedio una temperatura de 19 °C y humedad relativa de 67% durante la experimentación.

2.2. Material biológico

Aislamientos del hongo: *Botrytis* sp. patógeno de *P. ligularis* Juss. (granadilla) y las cepas nativas de *Trichoderma* spp. del cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, sede Oxapampa.

2.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo y enfrentamiento *in vitro* de *Botrytis* sp. y cepas de *Trichoderma* spp. fue papa dextrosa agar (PDA).

2.4. Metodología

2.4.1. Purificación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a partir de cepario

Del cepario de conservación, se purificaron cada cepa de *Trichoderma* spp., de la siguiente manera: de un tubo de ensayo con *Trichoderma* spp., se extrajo una porción de micelio con un estilete (desinfectado por flameado) para trasladarlo a una placa Petri con medio de cultivo (PDA más cloranfenicol al 0.05 %); seguido se dejó incubar de tres a cinco días hasta observar crecimiento de micelio blanquecino; luego, de este micelio se extrajo las primeras hifas y se realizó un subcultivo que se dejó desarrollar hasta la esporulación (se observó micelio de color verduzco, característico de *Trichoderma*), este se utilizó como inóculo para el cultivo monoespórico y posterior conservación en el cepario.

2.4.2. Recolección de muestras del patógeno (*Botrytis* sp.)

La colecta de frutos de granadilla (*P. ligularis*) con signos de *Botrytis* sp. se realizó en el sector de Navarra, entre las quebradas Tres Marías y Negro del distrito de Huancabamba, provincia de Oxapampa.

2.4.3. Aislamiento del patógeno

Botrytis sp.- El material muestra (fruto de granadilla) se aisló a partir del signo típico de *Botrytis*, que corresponde a una esporulación grisácea, previa observación de conidios con un estereoscopio. Seguido, se realizaron cortes de tejido en la zona de avance del patógeno de aproximadamente 17 mm de diámetro. Se desinfectó el material (tejido vegetal infectado) mediante inmersiones secuenciales con lejía Clorox (hipoclorito de sodio al 4% de concentración) diluida (1 ml por 1 Lt de agua) por 30 segundos y finalmente se lavó en agua destilada estéril por 5 minutos. Luego tejido vegetal infectado, se sembró en placas Petri con PDA y se incubaron a 22 ± 1 °C por dos días. A partir de las primeras hifas del hongo presentadas en el medio, se realizaron subcultivos para evitar posible contaminación.

2.4.4. Identificación del patógeno

Botrytis sp.- Se sembró discos de PDA con micelio de la cepa aislada en una placa Petri con medio de cultivo y se dejó desarrollar para luego observar al microscopio estructuras características de *Botrytis* sp., las que se verificaron con las claves de Barnett y Hunter (1998).

2.4.5. Estudio de variables

Crecimiento radial: se midió el avance del micelio del hongo a partir del segundo día

después de la siembra, luego cada 24 h. Competencia por área y nutrientes: se obtuvo con los radios de crecimiento radial para *Trichoderma*, *Botrytis* y testigos. Micoparasitismo: la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. se determinó por la escala propuesta por Bell et al. (1982), detallada en tabla 1. Además, se evaluó la interacción de las hifas por observación con microscopio binocular Helmut Hund GmbH con aumento de 100X. Grado de inhibición (GI): se estimó con la fórmula utilizada por Sarro et al. (2010): $GI = [A_p - A_{p+a}] / A_p \times 100$, donde A_p es el crecimiento radial del patógeno testigo y A_{p+a} es el crecimiento radial del patógeno más el antagonista (cuando es enfrentado).

Tabla 1. Escala de estimación de micoparasitismo

Clases	Valor (%)	Descripción
1	100	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio.
2	92.05	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio.
3	50	<i>Trichoderma</i> y el patógeno crecen aproximadamente la mitad de la superficie y ninguno domina al otro.
4	7.95	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	0	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio.

2.5. Análisis de datos

En el experimento se usó el diseño completamente aleatorizado con veintisiete tratamientos y cuatro repeticiones. La unidad experimental consto de cuatro placas Petri con medio PDA a pH 6.5.

Los datos obtenidos de las diferentes variables se ordenaron en hojas de cálculo de Microsoft Excel y se procesaron con el software estadístico InfoStat, versión 2013; aplicando el análisis de

varianza para determinar la significancia entre tratamientos y la prueba de significación de Duncan con $\alpha = 0.05$ para establecer jerarquía e igualdad de los tratamientos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización cultural e identificación de *Botrytis* sp.

3.1.1. Caracterización cultural

La caracterización cultural de la cepa de código MANB01 (inóculo puro del hongo) en PDA, presento una tasa de crecimiento de micelio de 1.18 cm/día. Además, presento las siguientes características en placa con medio PDA: i) Aspecto de colonia: crecimiento normal, ni muy elevado ni muy sumergido, compacta, con una zona de esporulación al 4 día después de la siembra (dds) o incubación, las cuales se secan rápidamente; ii) Conidiación: compacta, blanca al 3 dds y tornándose marrón claro al 4 dds, dispuesta en un aro de conidiación de color marrón oscuro en forma de anillo de un grosor de 1 cm, las zonas libres de conidiación son cubiertas por abundante micelio aéreo, blanquecino; iii) Color del reverso de la placa: incoloro no hay cambio en el medio de cultivo y iv) Olor de la colonia: sin olor.

3.1.2. Identificación

Se identificó morfológicamente la cepa *Botrytis* sp. en base a su estructura fructificante, características macroscópicas y microscópicas (figura 1) en contraste a las claves de Barnett y Hunter (1998) utilizadas; esta cepa se codifico como MANB01. Continuadamente se describen las características microscópicas: i) Conidióforos: de color marrón, erguidos, septados y ramificados, ramas pequeñas unidas en su punto de origen; ii) Conidios: ovalados en

forma de huevo, presenta comúnmente un punto de unión sobresaliente ligeramente, de color marrón pálido y de tamaño: largo (promedio 10.2 μm) y ancho promedio (6.12 μm) y iii) Esclerocios: presentes y poco abundantes, a los 15 dds.

Los caracteres microscópicos distintivos como: conidióforo, conidio, esclerocio y tipo de micelio concuerdan con las claves descritas por Barnett y Hunter (1998). Asimismo, hay cierta similitud con lo descrito por Pitt y Hocking (2009) quienes caracterizaron a *B. cinérea* en medios de cultivos CYA y MEA: el hongo mostro un micelio aéreo y/o aglomerado (flocoso), ritmo de crecimiento variado y el color del micelio fue de blanco a gris oscuro (producto de la conidiogénesis); también, observaron talos de duración indeterminada, presencia de conidióforos, conidios elipsoidales de 8 - 12 μm de largo de pared lisa.

3.2. *Trichoderma* spp. Frente a *Botrytis* sp.

El crecimiento radial de micelio de *Trichoderma* spp. por efecto del enfrentamiento contra *Botrytis* sp. y sus testigos demostraron que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), con un coeficiente de variabilidad de 6.5%.

La prueba de comparación múltiple de Duncan ($\alpha=0.05$ de probabilidad) jerarquizo las medias de los tratamientos estudiados (tabla 2) para el crecimiento radial de micelio de las cepas de *Trichoderma* en enfrentamiento y testigo. Resaltando estadísticamente a *T. koningii* (MHSJ11) con 4.47 cm y enfrentado con *Botrytis* sp. obtuvo 4.38 cm; *T. inhamatum* (MOBSHO01) con 4.42 cm y enfrentado con *Botrytis* sp. logró 4.26 cm; *T. harzianum* (MHMLL04) con 4.25 cm y *T. atroviride* (MHSJ01) enfrentado con *Botrytis*

sp. consiguió 4.12 cm respectivamente. Posiblemente por una mayor velocidad de crecimiento y un rápido reconocimiento del patógeno. Por el contrario, la cepa *T. longibrachiatum* (MJHU01) con 1.3 cm, y enfrentado con *Botrytis* sp., alcanzó 1.15 cm presentó un crecimiento radial significativamente inferior; tal vez por su crecimiento lento y nula diseminación en el medio que es una característica genética, acciones que no bloquean el desarrollo del patógeno. Además, cepas testigos y enfrentados de la misma especie no presentaron un crecimiento radial de micelio estadísticamente igual, como es el caso de las cepas *T. harzianum* (MHMLL04) con 4.25 cm y enfrentado con *Botrytis* sp. adquirió 4.09 cm, seguido de *T. atroviride* (MHSJ01) - *Botrytis* sp. obtuvo 4.12 cm y *T. atroviride* (MHSJ01) adquirió 4.06 cm la cepa

T. citrinoviride (MHMLL03) logró 3.91 cm y enfrentado con *Botrytis* sp. consiguió 3.46 cm, precedido de la cepa *T. atroviride* (MHMLL06) con 3.79 cm y enfrentado con *Botrytis* sp. obtuvo 3.49 cm y finalmente por la cepa *T. inhamatum* (MOBSHO03) con 3.52 cm y enfrentado con *Botrytis* sp. alcanzó 3.02 cm. Los resultados anteriores probablemente se deban a que hay cepas de una misma especie con características genéticas diferentes. En efecto, *Trichoderma* presenta actividad inhibitoria sobre diversos fitopatógenos (Dennis y Webster 1971). Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio son similares a los de Chambers y Scott (1995), quienes utilizaron la misma técnica y encontraron que *T. hamatum* y *T. pseudokoningii* inhibieron el crecimiento micelial de *Phytophthora* spp. a nivel *in vitro*.

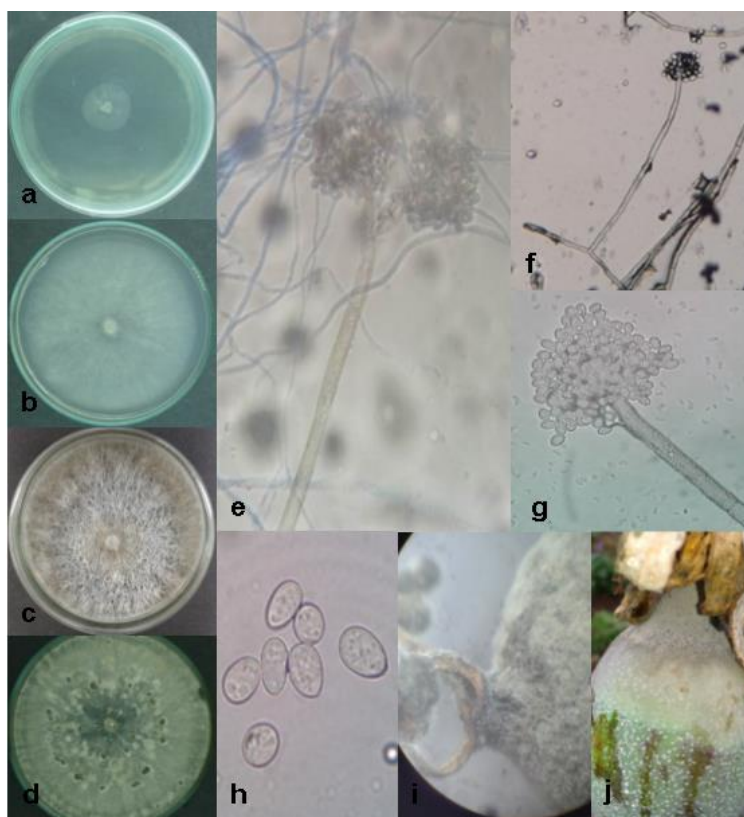


Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas de *Botrytis* sp. (MANB01). Crecimiento del hongo en PDA: a. 1 dds, b. 3 dds, c. 8 dds, d. 15 dds (micelio con esclerocios), e. Conidióforo con conidios 40X, f. Conidióforo y conidios 10X, g. Conidióforo y conidios 40X, h. Conidios ovalados 100X, i. Conidiación (visto a estereoscopio 10X), j. Muestra: fruto de granadilla (*P. Ligularis*) con signos de *Botrytis* sp.

Tabla 2. Comparación de medias para el crecimiento radial de micelio de *Trichoderma* spp. por efecto del enfrentamiento con *Botrytis* sp. y testigos

<i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Botrytis</i> sp. y testigos	Crecimiento radial de micelio (cm) 3 dds.	Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)
<i>T. koningii</i> (MHSJ11)	4.47	a
<i>T. inhamatum</i> (MOBSHO01)	4.42	ab
<i>T. koningii</i> (MHSJ11) vs <i>Botrytis</i> sp.	4.38	ab
<i>T. inhamatum</i> (MOBSHO01) vs <i>Botrytis</i> sp.	4.26	abc
<i>T. harzianum</i> (MHMLL04)	4.25	abc
<i>T. atroviride</i> (MHSJ01) vs <i>Botrytis</i> sp.	4.12	abcd
<i>T. harzianum</i> (MHMLL04) vs <i>Botrytis</i> sp.	4.09	bcd
<i>T. atroviride</i> (MHSJ01)	4.06	bcde
<i>T. koningii</i> (MCHT11) vs <i>Botrytis</i> sp.	4.05	bcde
<i>T. koningii</i> (MCHT11)	3.98	cdef
<i>T. citrinoviride</i> (MHMLL03)	3.91	cdefg
<i>T. atroviride</i> (MHMLL06)	3.79	defgh
<i>T. harzianum</i> (MCHT07)	3.71	efgh
<i>T. harzianum</i> (MOSA05)	3.63	fgh
<i>T. harzianum</i> (MCHT07) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.62	fgh
<i>Botrytis</i> sp.	3.55	ghi
<i>T. atroviride</i> (MOBSHO03)	3.52	hi
<i>T. harzianum</i> (MOSA05) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.51	hi
<i>T. atroviride</i> (MHMLL06) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.49	hi
<i>T. citrinoviride</i> (MHMLL03) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.46	hij
<i>T. strictipile</i> (MCHT04)	3.23	ijk
<i>T. strictipile</i> (MCHPS03)	3.23	ijk
<i>T. strictipile</i> (MCHT04) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.11	jk
<i>T. strictipile</i> (MCHPS03) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.03	k
<i>T. atroviride</i> (MOBSHO03) vs <i>Botrytis</i> sp.	3.02	k
<i>T. longibrachiatum</i> (MJHU01)	1.30	l
<i>T. longibrachiatum</i> (MJHU01) vs <i>Botrytis</i> sp.	1.15	l

El análisis de varianza para el crecimiento radial de micelio de *Botrytis* sp., por efecto del enfrentamiento contra cepas de *Trichoderma* spp. y testigo, indico la existencia de diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$), con un coeficiente de variabilidad de 2.7%.

La comparación múltiple de medias de Duncan ($\alpha=0.05$ de probabilidad) presento un menor crecimiento radial de micelio (2.41 cm) para *Botrytis* sp. producto del enfrentamiento a *T. atroviride* (MHSJ01); evidenciando que la cepa *T. atroviride* (MHSJ01) es estadísticamente superior al resto (tabla 3), por inhibir el

crecimiento micelial del patógeno; estos resultados posiblemente puedan deberse a la segregación de metabolitos secundarios y antibióticos que limitan el desarrollo normal de *Botrytis*. Por el contrario, la cepa *T. harzianum* (MCHT07) presento una menor inhibición en el crecimiento micelial del patógeno (3.96 cm). Además, cepas de *Trichoderma* identificadas como una misma especie presentaron contingencia en el crecimiento del micelio de *Botrytis* con respecto al testigo; pero no presentaron un comportamiento similar, como se detalla: *Botrytis* sp. - *T. atroviride* (MOBSHO03) obtuvo 3.17 cm y *Botrytis* sp. - *T.*

atroviride (MHMLL06) logró 3.39 cm. De igual manera, *Botrytis* sp. - *T. strictipile* (MCHT04) alcanzó 3.22 cm y *Botrytis* sp. - *T. strictipile* (MCHPS03) obtuvo 3.44 cm y también *Botrytis* sp. - *T. harzianum* (MHMLL04) adquirió 3.39 cm y *Botrytis* sp. - *T. harzianum* (MCHT07) agenció 3.69 cm. Los resultados anteriores probablemente puedan deberse a las diferentes características genéticas de cada cepa, en el rápido o lento desarrollo. Por otro lado, las cepas de *Trichoderma* enfrentadas al patógeno: *Botrytis* sp. - *T. koningii* (MHSJ11) con 3.43 cm y *Botrytis* sp. - *T. koningii* (MCHT11) con 3.46 cm fueron las que presentaron efecto antagónico estadísticamente igual en el crecimiento radial de micelio de *Botrytis*, posiblemente se deba a que presentan las mismas características de reconocimiento y reacción frente al patógeno. El

crecimiento radial de micelio de *Botrytis* sp. fue variado con respecto a su testigo, producto de la interacción antagónica con las cepas de *Trichoderma* spp.; asimismo, hay variación en la efectividad de las diferentes cepas de *Trichoderma*. Asimismo, Campbell (1989) ha observado que las cepas de *Trichoderma* spp. varían en su efecto antagónico debido a la versatilidad de mecanismos que posee, y que estos se expresan según las características genéticas prevalentes. Cabe agregar que, el sobrecrecimiento del micelio de *Trichoderma* en el micelio de un patógeno, es una característica ventajosa en la disputa de colonizar un área; esta característica reduce o detiene completamente el desarrollo del micelio del patógeno (Dennis y Webster 1971).

Tabla 3. Promedio de crecimiento radial de micelio de *Botrytis* sp. por efecto del enfrentamiento contra *Trichoderma* spp. y testigo

<i>Botrytis</i> sp. vs <i>Trichoderma</i> spp.	Crecimiento radial de micelio (cm), 3 dds.	Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. atroviride</i> (MHSJ01)	2.41	a
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. longibrachiatum</i> (MJHU01)	3.09	b
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. atroviride</i> (MOBSHO03)	3.17	bc
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. strictipile</i> (MCHT04)	3.22	c
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. harzianum</i> (MHMLL04)	3.39	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. atroviride</i> (MHMLL06)	3.39	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. inhamatum</i> (MOBSHO01)	3.41	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. koningii</i> (MHSJ11)	3.43	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. strictipile</i> (MCHPS03)	3.44	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. citrinoviride</i> (MHMLL03)	3.45	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. koningii</i> (MCHT11)	3.46	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. harzianum</i> (MOSA05)	3.49	d
<i>Botrytis</i> sp. vs <i>T. harzianum</i> (MCHT07)	3.69	e

3.3. Competencia por espacio y nutrientes de *Trichoderma* spp. Frente a *Botrytis* sp. y testigos

Producto del análisis de varianza se encontró diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$) en los promedios de áreas de los

tratamientos estudiados para la competencia por espacio y nutrientes de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. y testigos, con un coeficiente de variación de 12,13%.

La prueba de Duncan ($\alpha=0.05$ de probabilidad) mostro que la mayor área de medio ocupado fue

por *T. koningii* (MHSJ11) con 24.58 cm²; seguido de *T. koningii* (MHSJ11) - *Botrytis* sp. con 23.81 cm², *T. inhamatum* (MOBSHO01) - *Botrytis* sp. con 23.44 cm², *T. inhamatum* (MOBSHO01) con 23.17 cm², *T. harzianum* (MHMLL04) con 22,58 cm² y *T. atroviride* MHSJ01 vs *Botrytis* sp. con 21,41 cm² con diferencias significativas entre sí, probablemente *Trichoderma* tenga un mecanismo de rápida detección de hifas exploratorias y de reconocimiento de exudados del patógeno. Por otro lado, la cepa *T. longibrachiatum* (MJHU01) con 2.49 cm² y *T. longibrachiatum* (MJHU01) - *Botrytis* sp. con 1.98 cm² presentan una ocupación de espacio de desarrollo significativamente inferior al resto de los tratamientos; posiblemente se deba a que esta cepa sea muy exigente a condiciones de desarrollo *in vitro* o no sea muy competitiva frente a otro hongo.

La evaluación del área de desarrollo para cada cepa como testigo y enfrentado con *Botrytis* no presento similitud a nivel estadístico, siendo las cepas: *T. harzianum* (MHMLL04) con 22.58 cm² y *T. harzianum* (MHMLL04) - *Botrytis* sp. con 21.14 cm², *T. atroviride* (MHSJ01) - *Botrytis* sp. con 21.41 cm², *T. atroviride* (MHSJ01) con 20.84 cm², *T. citrinoviride* (MHMLL03) con 19.5 cm², *T. citrinoviride* (MHMLL03) - *Botrytis* sp. con 15.69 cm², *T. atroviride* (MHMLL06) con 18.48 cm², *T. atroviride* (MHMLL06) - *Botrytis* sp. con 16.05 cm², *T. harzianum* (MCHT07) con 17.79 cm² y *T. harzianum* (MCHT07) - *Botrytis* sp. con 17.07 cm², *T. inhamatum* (MOBSHO03) con 16.15 cm² y *T. inhamatum* (MOBSHO03) - *Botrytis* sp. con 12.33 cm² respectivamente. Excepto para *T. longibrachiatum* (MJHU01) como testigo y en enfrentamiento. Quizá podría deberse a características genéticas o por falta de competitividad frente a otro hongo. La superioridad de competición por espacio y

nutrientes de las cepas de *Trichoderma* spp. sea condicionado por la tasa de crecimiento, seguido se presentan las mayores tasas de crecimiento para las cepas de *Trichoderma*: *T. koningii* (MHSJ11) testigo con 1.49 cm/día; *T. koningii* (MHSJ11) enfrentado con 1.46 cm/día; *T. inhamatum* (MOBSHO01) enfrentado con 1.42 cm/día; *T. inhamatum* (MOBSHO01) testigo con 1.48 cm/día, *T. harzianum* (MHMLL04) testigo con 1.42 cm/día y *T. atroviride* (MHSJ01) enfrentado con 1.38 cm/día. Para los resultados anteriores, Ahmad y Baker (1987) mencionan que la competencia por espacio y nutrientes es una característica del controlador biológico favorecida por la velocidad de crecimiento.

3.4. Micoparasitismo

En la escala de evaluación de micoparasitismo (mecanismo de acción antagónica) alcanzado por las cepas de *Trichoderma* al enfrentarse a *Botrytis* sp. las cepas: *T. koningii* (MHSJ11), *T. atroviride* (MHSJ01), *T. atroviride* (MOBSHO03), *T. koningii* (MCHT11), *T. atroviride* (MHMLL06), *T. citrinoviride* (MHMLL03), *T. inhamatum* (MOBSHO01) y *T. harzianum* (MCHT07) lograron alcanzar la clase 1 de la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), por crecer completamente sobre la colonia de la cepa patógeno *Botrytis* sp. (MANB01) esto redujo el área de desarrollo y la formación de conidios de *Botrytis*; posiblemente, las cepas de *Trichoderma* tienen una mayor capacidad de detección quimiotrópica del patógeno a ello se suma la velocidad de su crecimiento de micelio, sobre el micelio del patógeno *Botrytis* sp.; en un segundo nivel se tiene a las cepas *T. harzianum* (MHMLL04), *T. harzianum* (MOSA05), *T. strictipile* (MCHPS03), *T. strictipile* (MCHT04) y *T. longibrachiatum* (MJHU01) los cuales alcanzaron una clase 2: logrando invadir dos

terceras partes de la superficie del medio de cultivo, posiblemente a un menor grado de reconocimiento químico y físico del patógeno *Botrytis* (figura 2).

Los resultados de micoparasitismo, que incluyen como mecanismo de acción al crecimiento de micelio de las cepas *Trichoderma* spp. sobre el micelio de *Botrytis* sp., coinciden con los obtenidos por Elad *et al.* (1983), quienes evaluaron el micoparasitismo mediante la técnica de cultivos duales (patógeno - antagonista) para las cepas de *T. harzianum* y *T. hamatum* con *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfii*; determinando el crecimiento del biocontrolador (*Trichoderma*) sobre el hongo fitopatógeno (*R. solani* o *S. rolfii*). En efecto, el sobrecrecimiento del micelio de *Trichoderma* (clase 1 de la escala micoparasítica de Bell *et al.* 1982), es un carácter ventajoso en la disputa de colonizar un área (competición por espacio y nutrientes); esta es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio de un patógeno (Denis y Webster, 1971). Consecuentemente, Harman *et al.* (1981) sugieren que, aunque el micoparasitismo es el principal mecanismo de biocontrol para *Trichoderma* spp., existen otros como: adhesión y enrollamiento, competencia por nutrientes, reconocimiento, crecimiento quimiotrófico, la antibiosis, producción de antibióticos volátiles.

En la caracterización microscópica del enfrentamiento de cepas de *Trichoderma* frente *Botrytis*, se observó que cuatro cepas de *Trichoderma* [*T. koningii* (MHSJ11), *T. atroviride* (MHSJ01), *T. atroviride* (MOBSHO03) y *T. koningii* (MCHT11)] no presentaron interacción hifal de enrollamiento; probablemente estas cepas cuentan con otro tipo de acción antagónica como segregación de sustancias

químicas como mencionan McAllister *et al.* (1994), quienes estudiaron la relación antagónica *Trichoderma* - *Glomus mossae*, observaron que, las hifas del biocontrolador en contacto con las del hongo *Glomus* no las enrollaron, afirmando que el micoparasitismo incluye segregación de antibióticos péptidos. Señalar que en una interacción hifal de enrollamiento posiblemente se dé segregación de sustancias antibióticas y/o enzimáticas. Los estudios realizados por Ochoa (2002) demostraron que las especies de *Trichoderma* spp. atacan a las hifas del hospedero por enrollamiento: engancho o aprisionando las estructuras y penetrando la pared celular del hospedero, por secreción de enzimas líticas como proteinasas básicas, β -1,3-glucanasas y quitinasas; en efecto, la actividad antifúngica de las enzimas quitinolíticas tienen un papel importante en la lisis de la pared celular de los hongos fitopatógenos.

A nivel microscópico ocho cepas de *Trichoderma* [*T. atroviride* (MHMLL06), *T. citrinoviride* (MHMLL03), *T. harzianum* (MOSA05), *T. inhamatum* (MOBSHO01), *T. harzianum* (MCHT07), *T. strictipile* (MCHPS03), *T. strictipile* (MCHT04) y *T. longibrachitum* (MJHU01)] presentaron interacción hifal de enrollamiento. Estos resultados fueron similares a los reportados por Elad *et al.* (2000), quienes observaron ante un microscopio electrónico, enrollamiento de *Trichoderma* spp. en hifas de varios fitopatógenos, entre ellos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *B. cinerea* entre otros. Consecuentemente ocho cepas [*T. atroviride* (MHSJ01), *T. atroviride* (MOBSHO03), *T. koningii* (MCHT11), *T. harzianum* (MHMLL04), *T. atroviride* (MHMLL06), *T. citrinoviride*

(MHMLL03), *T. harzianum* (MOSA05), *T. inhamatum* (MOBSHO01), *T. harzianum* (MCHT07) y *T. strictipile* (MCHPS03)] presentaron penetración en la hifa de *Botrytis*. Asimismo, Henis *et al.* (1983), al describir la acción de *Trichoderma* spp. sobre esclerocios de

Sclerotium rolfsii, resaltan que la capacidad de penetración de las hifas de *Trichoderma*, esta capacidad anidada un conjunto de mecanismos propio de cada cepa mejora la eficiencia como un biocontrolador.

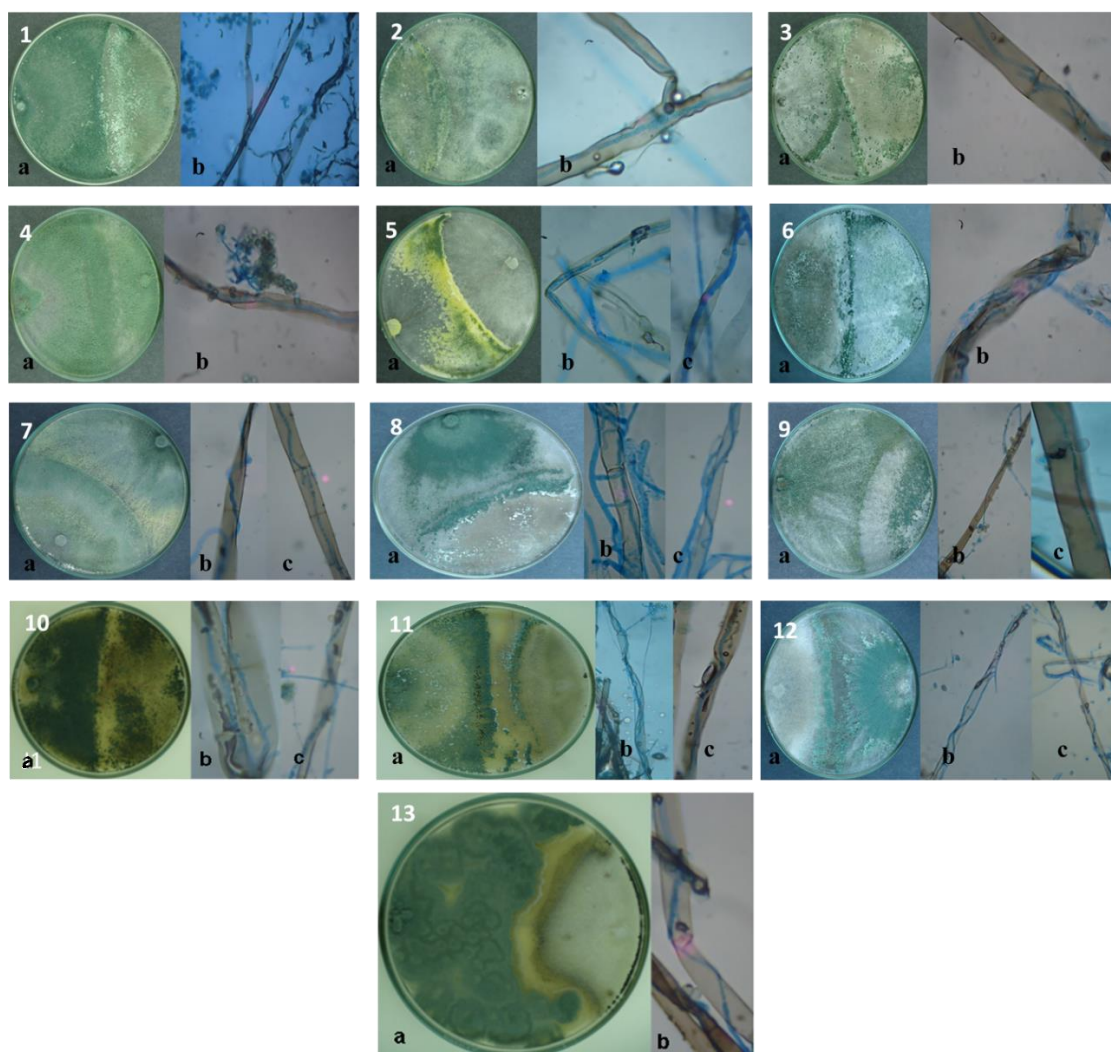


Figura 2. Comparativa de la capacidad antagonica por competición de sustrato (medio de cultivo) de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. a los 7 dds. 1. Enfrentamiento de *T. koningii* (MHSJ11) - *Botrytis* sp.: 1a. Enfrentamiento en medio PDA, 1b. Actividad lítica 40X; 2. Enfrentamiento de *T. atroviride* (MHSJ01) - *Botrytis* sp.: 2a. Enfrentamiento en medio PDA, 2b. Penetración de hifas 100X; 3. Enfrentamiento de *T. atroviride* (MOBSHO03) - *Botrytis* sp.: 3a. Enfrentamiento en medio PDA, 3b. Penetración de hifas 100X; 4. Enfrentamiento de *T. koningii* (MCHT11) - *Botrytis* sp.: 4a. Enfrentamiento en medio PDA, 4b. Penetración de hifas 100X; 5. Enfrentamiento de *T. harzianum* (MHMLL04) - *Botrytis* sp.: 5a. Enfrentamiento en medio PDA, 5b. Penetración de hifas 100X; 6. Enfrentamiento de *T. atroviride* (MHMLL06) - *Botrytis* sp.: 6a. Enfrentamiento en medio PDA, 6b. Penetración y enrollamiento de hifas 100X; 7. Enfrentamiento de *T. citrinoviride* (MHMLL03) - *Botrytis* sp.: 7a. Enfrentamiento en medio PDA, 7b. Enrollamiento de hifas 100X, 7c. Penetración de hifas 100X; 8. Enfrentamiento de *T. harzianum* (MOSA05) - *Botrytis* sp.: 8a. Enfrentamiento en medio PDA, 8b. Penetración de hifas 100X, 8c. Enrollamiento de hifas 100X; 9. Enfrentamiento de *T. inhamatum* (MOBSHO01) - *Botrytis* sp.: 9a. Enfrentamiento en medio PDA, 9b. Enrollamiento de hifas 40X, 9c. Penetración de hifas 100X; 10. Enfrentamiento de *T. harzianum* (MCHT07) - *Botrytis* sp.: 10a. Enfrentamiento en medio PDA, 10b. Penetración de hifas 100X, 10c. Enrollamiento de hifas 100X; 11. Enfrentamiento de *T. strictipile* (MCHPS03) - *Botrytis* sp.: 11a. Enfrentamiento en medio PDA, 11b. Enrollamiento de hifas 40X, 11c. Penetración de hifas 100X; 12. Enfrentamiento de *T. strictipile* (MCHT04) - *Botrytis* sp.: 12a. Enfrentamiento en medio PDA, 12b. Enrollamiento de hifas 100X, 12c. Penetración de hifas 100X y 13. Enfrentamiento de *T. longibrachitum* (MJHU01) - *Botrytis* sp.: 13a. Enfrentamiento en medio PDA, 13b. Enrollamiento de hifas 100X.

3.5. Grado de inhibición

Los resultados del análisis de varianza para el grado de inhibición que tuvieron las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis*, mostraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$), con un coeficiente de variabilidad de 6.39%.

La comparación de medias por Duncan ($\alpha=0.05$ de probabilidad) indica un mayor grado de inhibición (39,3%) para *Botrytis* sp. frente a *T. atroviride* (MHSJ01); destacando a *T. atroviride* (MHSJ01) y su posible por su activación rápida de mecanismos de acción como: competencia (rápido desarrollo sobre el medio), micoparasitismo y antibiosis (segregación de antibióticos y expulsión de antibióticos volátiles) propio de esta cepa, en respuesta al reconocimiento del patógeno *Botrytis*. En segundo lugar, los enfrentamientos *Botrytis* sp. - *T. longibrachiatum* (MJHU01) con 22.01 % y *Botrytis* sp. - *T. atroviride* (MOBSHO03) con 20.04 %. Por el contrario, el enfrentamiento de *Botrytis* sp. - *T. harzianum* (MCHT07) con 6.81 % presenta un grado de inhibición estadísticamente inferior al resto; posiblemente sus mecanismos como competencia, micoparasitismo y antibiosis no sean eficientes. Cabe agregar, que cepas de *Trichoderma* identificadas como una misma especie no presentan necesariamente un efecto de inhibición estadísticamente igual, como es el caso de: *Botrytis* sp. - *T. atroviride* (MOBSHO03) con 20.04 % y *Botrytis* sp. - *T. atroviride* (MHMLL06) con 14.57 % y finalizó *Botrytis* sp. - *T. strictipile* (MCHT04) con 18.79 % y *Botrytis* sp. - *T. strictipile* (MCHPS03) con 13.25 %. También Suarez et al. (2008), experimentaron con aislamientos nativos y comerciales de *T. harzianum*, sobresaliendo aislamiento nativo

(TCN-014) y uno comercial (TCC-005), ambos resultaron tener mayores habilidades de micoparasitismo (grado 4 y completo), competencia por espacio y nutrientes (7,33 cm y 7,32 cm de radio de crecimiento a 10 dds) e inhibición del crecimiento de micelio (65.32% y 70.6%) de los aislamientos de *Fusarium solani* a nivel *in vitro*.

4. CONCLUSIONES

Se encontró diversos niveles de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. para las variables: en el crecimiento radial de micelio de *Trichoderma* spp. por efecto del enfrentamiento contra *Botrytis* sp. y sus testigos, las cepas: *T. koningii* (MHSJ11) testigo y enfrentado; *T. inhamatum* (MOBSHO01) testigo y enfrentado y *T. harzianum* (MHMLL04) testigo fueron superiores al resto. Asimismo, la mayor contención del desarrollo de micelio de *Botrytis* sp. por efecto del enfrentamiento contra *Trichoderma* spp. lo hizo la cepa *T. atroviride* (MHSJ01). En la competencia por espacio y nutrientes por efecto del enfrentamiento *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. y sus testigos, sobresalió la cepa *T. koningii* (MHSJ11) con 24.58 cm² a los 3 dds. En micoparasitismo, las cepas que lograron la escala 1 fueron: *T. koningii* (MHSJ11), *T. atroviride* (MHSJ01), *T. atroviride* (MOBSHO03), *T. koningii* (MCHT11), *T. atroviride* (MHMLL06), *T. citrinoviride* (MHMLL03), *T. inhamatum* (MOBSHO01) y *T. harzianum* (MCHT07) y con un mayor grado de inhibición (39,3%) para *T. atroviride* (MHSJ01).

Referencias

Ahmad, J. & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 77: 182-189.

- Barnett, H. & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Ebook. Minnesota, Estados Unidos. Cuarta edición. 218p.
- Bell, D., Well, H. & Markham, C. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Campbell, R. (1989). *El control biológico de patógenos microbianos de las plantas*. Cambridge University Press. New York, USA. 218 p.
- Chambers, S. & Scott, E. (1995). *In vitro* antagonism of *Phytophthora cinnamomi* an *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology*. 471-477 p.
- Dennis, L. & Webster, J. (1971). *Antagonistic properties of species groups of Trichoderma*. III Hyphal interaction. 369p.
- Elad, Y. (2000). *Biological control of foliar pathogens by means of Trichoderma harzianum and potential modes of actions*. *Biocontrol Science and Technology*. 499 p.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 85-88 p.
- Esparza, L. (2009). *Efectividad in vitro de cepas nativas de Trichoderma spp. en aislados de Phytophthora parasitica D. obtenidos en plantas de Jamaica*. Tesis. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 69 p.
- Harman, G., Chet, I. & Baker, R. (1981). Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. *Phytopathology*. 569-672 p.
- Henis, Y., Adams P., Lewis, J. & Papavizas, G. (1983). Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 143 - 146 p.
- Infante, D., Martínez, B., Gonzales, M. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*. Univers. Agraria de La Habana. La Habana, Cuba. 11 p.
- McAllister, C., García, I., Godeas, A. & Ocampo, J. (1994). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: Effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*. 260 p.
- Memenza, Z. (2009). *Control biológico in vitro de Botrytis cinerea (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (Vitis vinifera)*. Tesis. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 75 p.
- Ochoa, M. (2002). *Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de Trichoderma spp. (Hyphomycetas: Hyphales), sobre Mycosphaerella fijiensis (Loculoascomycetes: Dothideales)*. Tesis de Maestría en el Área de Biotecnología. Univers. de Colima. México. 102 p.
- Pitt, J. & Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Ebook. Australia. Tercera edición. 524 p.
- Rosales, B. (2012). *Aislamiento, identificación y caracterización cultural de cepas nativas de Trichoderma spp. en la provincia de Oxapampa*. Tesis. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Oxapampa, Perú. 147 p.
- Sarro, B., Lara, M. & Fernández, C. (2010). Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEEP TL0601 frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *PHYTOMA España*, 225: 47-50.
- Suarez, M., Fernández, B., Osvaldo, V., Gámez, C. y Páez, R. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* Mart. Sacc. asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Colombia. 9 p