

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Antibiosis del Extracto Metabólico de *Trichoderma asperellum* T2-31  
Sobre la Capacidad Reproductiva de *Fusarium oxysporum*

Por:

**WILFREDO FLORES FLORES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Antibiosis del Extracto Metabólico de *Trichoderma asperellum* T2-31  
Sobre la Capacidad Reproductiva de *Fusarium oxysporum*

Por:

**WILFREDO FLORES FLORES**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:



**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada:



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor Principal

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coasesor  
Dr. Francisco Castillo Reyes  
Coasesor  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2013

## AGRADECIMIENTOS

A dios, por darme vida, una buena familia, salud, por permitirme cumplir una meta más en la vida y por poner en mi camino a toda esa gente que siempre me apoyó.

A toda mi familia, por brindarme su apoyo en los momentos que más lo necesitaba.

A mi “Alma Mater” por darme la dicha de formarme como un profesionalista de la parasitología agrícola.

A los maestros del Departamento de Parasitología: Dr. Abiel Sánchez, Dr. Oswaldo García, Dr. Jerónimo Landeros, Dr. Melchor Cepeda, Dr. Ma. Elizabeth Galindo, M.C. Víctor Sánchez, M.C. Arturo Coronado, Dr. Ernesto Cerna, Dr. Sergio René Sánchez, por haberme brindado sus experiencias y conocimientos en el área de la Parasitología Agrícola.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo, por sus enseñanzas, consejos, asesoramiento y tiempo invertido para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por su valiosa colaboración, disponibilidad y aportaciones en este trabajo.

Al Dr. Francisco Castillo Reyes, por su colaboración en la revisión de este trabajo.

AL Ing. Epifanio Castro Del Ángel, Por su amistad, aportaciones y consejos brindados en la realización de este trabajo de tesis.

A todos mis compañeros de la generación “CXIV”, por permitirme pasar momentos agradables con ustedes.

A la T.Q.L. Cristina Sánchez Flores, por su amistad, consejos y todo el apoyo proporcionado para realización de este trabajo.

A los estudiantes de posgrado, por sus consejos y amistad.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

**Hipólita Flores Martínez**

**Lázaro Flores Rojas**

Por su cariño, atenciones, consejos, sustento y por todos los sacrificios que han realizado en bien de mi educación.

### **A mis hermanos:**

Por apoyarme de una u otra manera en la terminación de mis estudios, ustedes han sido mi ejemplo a seguir.

## INDICE DE CONTENIDO

	Página
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	V
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>INDICE DE CUADROS DEL APENDICE</b> .....	VII
<b>RESUMEN</b> .....	VIII
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivos.....	2
<b>REVISION DE LITERATURA</b> .....	3
Pudrición de la Raíz del Chile ( <i>Capsicum annuum</i> L).....	3
Importancia del Control Biológico de Hongos Fitopatógenos.....	4
Género <i>Trichoderma</i> .....	5
Historia.....	5
Características del Género <i>Trichoderma</i> .....	5
Sistemática de <i>Trichoderma</i> .....	6
Hábitat.....	8
Mecanismos Empleados por <i>Trichoderma</i> en el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos.....	8
Antagonismo.....	9
Competencia.....	10
Competencia por Nutrientes.....	10
Micoparasitismo.....	10
Antibiosis.....	11
Inducción de Resistencia.....	13
Usos de <i>Trichoderma</i> spp.....	14
<i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
Morfología.....	15
Síntomas.....	16
Ubicación Taxonómica.....	16
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	17

Localización del Experimento .....	17
Obtención del Material Biológico.....	17
Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	17
Cepas de Hongos Antagónicos.....	17
Incremento de los Microorganismos Estudiados.....	18
Bioensayo No. 1. Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>F. oxysporum</i> en Cultivos Duales.....	18
Variables Estudiadas .....	18
Diseño Experimental.....	19
Bioensayo No. 2. Efecto del Extracto Metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre el Crecimiento Micelial de <i>F. oxysporum</i> . ....	20
Obtención del Extracto Metabólico .....	20
Establecimiento del Experimento .....	20
Diseño Experimental.....	21
Bioensayo No. 3. Efecto del Extracto Metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre la Conidiogénesis de <i>F. oxysporum</i> .....	21
Diseño Experimental.....	21
Bioensayo 4. Efecto de los Extracto Metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre la Viabilidad de Conidios de <i>F. oxysporum</i> .....	22
Diseño Experimental.....	22
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	23
Aislamiento e Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	23
Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>F. oxysporum</i> en Cultivos Duales.....	25
Efecto del Extracto Metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre el Crecimiento Micelial de <i>F. oxysporum</i> .....	28
Efecto del Extracto Metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre la Conidiogénesis de <i>F. oxysporum</i> .....	32
Efecto del Extracto Metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre la Viabilidad de Conidios de <i>F. oxysporum</i> .....	33
<b>CONCLUSIONES</b> .....	35
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	36
<b>APENDICE</b> .....	45

## INDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Frecuencia de aislamiento de hongos patógenos asociados a las raíces de plantas de Chile con síntomas de pudrición en Aguascalientes y Zacatecas.....	3
<b>Cuadro 2.</b> Clases de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre hongos fitopatógenos de acuerdo a Bell <i>et al.</i> , 1982.....	19
<b>Cuadro 3.</b> Traslape (cm) del crecimiento micelial de las cepas T2-31 y T2-11 sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> , días al primer contacto entre los microorganismos y clases de antagonismo.....	26
<b>Cuadro 4.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> con extracto de <i>Trichoderma asperellum</i> T2-31, a diferentes concentraciones, en 15 días de incubación.....	30
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de las concentraciones de extracto de <i>Trichoderma asperellum</i> T2-31, sobre el crecimiento promedio de <i>F. oxysporum</i> .....	31
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de la concentración de extracto de <i>Trichoderma asperellum</i> T2-31, sobre la conidiogénesis de <i>F. oxysporum</i> .....	33
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de la concentración de extracto de <i>Trichoderma asperellum</i> T2-31, sobre la germinación de conidios de <i>F. oxysporum</i> , a las 24 horas.....	34

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1.</b> Características fenotípicas de <i>F. oxysporum</i>. (A) Esporodoquio en CLA. (B) Microconidios en monofialides cortos (Falsas cabezas) en PDA. (C) Microconidios en PDA. (D) Clamidosporas en PDA. (E) Monofialides en PDA. (F) Macroconidios en CLA.....</p>	24
<p><b>Figura 2.</b> Comparación del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en presencia de los antagonistas <i>T. asperellum</i> T2-31 y <i>Trichoderma</i> sp. T2-11, con respecto al testigo.....</p>	27
<p><b>Figura 3.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> por el extracto metabólico de <i>Trichoderma aspellum</i> T2-31 a las concentraciones 100% (A), 75% (B), 50% (C), 25% (D) y testigo (E).....</p>	29
<p><b>Figura 4.</b> Dinámica de crecimiento de <i>F. oxysporum</i>, expuesto a diferentes concentraciones de extracto de <i>Trichoderma aspellum</i> T2-31.....</p>	31
<p><b>Figura 5.</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento promedio/día de <i>F. oxysporum</i>, a diferentes concentraciones de extracto.....</p>	32



## ÍNDICE DE CUADROS DEL APENDICE

	Página
<b>Cuadro 1A.</b> Análisis de varianza para evaluar el antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>F. oxysporum</i> en cultivos duales.....	45
<b>Cuadro 2A.</b> Radios de crecimiento del patógeno y radios de crecimiento de Antagonistas (cm), correspondientes a cultivos duales evaluados a los 14 días de incubación.....	45
<b>Cuadro 3A.</b> Análisis de varianza para medir el efecto del extracto metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre la viabilidad de conidios de <i>F. oxysporum</i> .....	46
<b>Cuadro 4A.</b> Análisis de varianza para medir efecto del extracto metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre la conidiogénesis de <i>F. oxysporum</i> .....	46
<b>Cuadro 5A.</b> Análisis de varianza para evaluar el extracto metabólico de <i>T. asperellum</i> T2-31 sobre el crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> .....	46
<b>Cuadro 6A.</b> Crecimiento diario acumulado de <i>F. oxysporum</i> tratado con extracto de <i>T. aspellum</i> T2-31 respecto a las concentraciones.....	47

## RESUMEN

En el presente estudio, se planteó determinar la efectividad antagónica de *Trichoderma* sp. T2-11 y *T. asperellum* T2-31, sobre *Fusarium oxysporum* en cultivos duales y el efecto del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la capacidad reproductiva del fitopatógeno. La capacidad antagónica se midió considerando los criterios de Bell *et al.* (1982) y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se determinó con la fórmula de Samaniego *et al.*, (1989). A los 14 días de confrontamiento, la cepa T2-31 inhibió el crecimiento radial en un 86.5%, mientras que la cepa T2-11 un 69.8%. Los días a contacto entre las dos especies de *Trichoderma* y *F. oxysporum* se presentó a los tres días. De acuerdo a la clasificación de Bell *et al.*, (1982), se ubicaron a las dos especies en la escala 2, donde T2-31 y T2-11 cubrieron dos tercios de la superficie del medio. A concentraciones de 75 y 100% del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 se logró inhibir el crecimiento micelial en un 26.08% y 29.76% respectivamente. La formación de los conidios se ve reducida en un 59.82% al 100% del extracto, en tanto que al 25% de concentración solo se reduce un 27.87%. La germinación de los conidios se redujo de forma gradual por las diferentes concentraciones del extracto y el porcentaje de germinación de los conidios oscilo entre un 55 y 82.5%. *Trichoderma asperellum* T2-31 produjo enzimas y metabolitos secundarios en fermentación líquida, los cuales reducen la capacidad reproductiva de *F. oxysporum*, disminuyendo el crecimiento micelial, la esporulación e inhibiéndose la germinación de los conidios.

**Palabras clave:** Extractos metabólicos, antagonismo, antibiosis, capacidad reproductiva, *Trichoderma* sp. T2-11, *T. asperellum* T2-31, *Fusarium oxysporum*.

## INTRODUCCIÓN

La producción de chile a escala mundial se localiza principalmente en China, México, Turquía, España, Estados Unidos, Nigeria e Indonesia (SNITT, 2003). Durante el año 2011 en México se sembró una superficie total de 152,742.37 hectáreas, de las cuales se obtuvieron 2,131,739.73 toneladas de chile verde (SIAP, 2011). Con facilidad podría pensarse que México es el principal productor mundial, ya que posee la mayor variedad genética del género *Capsicum*, sin embargo no es así, ocupa el segundo lugar después de China debido a los bajos rendimientos que registra, que oscilan alrededor de 10 ton/ha (SNITT, 2003). Esta disminución de la producción es consecuencia de diversos factores, entre los que destacan climáticos, edáficos, insectos y enfermedades. Una de las enfermedades más comunes en la zona Norte-Centro de México es la pudrición de la raíz. La mortalidad de plantas en parcelas experimentales, ha sido estimada entre un 26 y 40% en variedades de chile mirasol y ancho respectivamente (Velásquez *et al.*, 2000). Los agentes causales de esta enfermedad pertenecen a hongos de los géneros; *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Verticillium* y *Pythium*, con frecuencia de aislamiento de 34.1, 31.6, 14.1, 2.5 y 1.0 % respectivamente (Velásquez *et al.*, 2001).

El método de control más empleado contra la secadera del chile es el químico, pero su uso es cuestionado por muchos debido a que al utilizarlo constantemente puede provocar resistencia del hongo, además pueden causar daños en la salud humana y ocasionar contaminación en el ambiente. En la actualidad la producción agropecuaria se enfoca a una agricultura sostenible, donde se optimicen los recursos naturales, se use la menor cantidad de productos químicos y se potencialice el uso de productos microbianos y hasta donde sea posible se realice una agricultura orgánica, donde los microorganismos juegan un papel importante en el esquema de la producción.

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos sobre otros microorganismos, esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Orietta *et al.*, 2001). Dentro del grupo de los hongos antagónicos se encuentra el género *Trichoderma*, las especies de este hongo son las más

estudiadas y utilizadas en todo el mundo, como agentes de control biológico de fitopatógenos. La exitosa capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos está dada por sus variados modos de acción, tales como el micoparasitismo, la excreción de enzimas líticas (Schirmbock *et al.*, 1994), la competencia en la rizosfera por espacio y nutrientes (Howell, 2003), la promoción en el crecimiento de las plantas y la inducción de resistencia sistémica (Harman, 2006; Abeysinghe, 2009), inhibe enzimas producidas por el patógeno necesarias para penetrar a la planta (Zimand y Chet, 1991, citados por Harman, 2006) y antibiosis, donde se producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que impiden el crecimiento del patógeno (Stefanova, 1999). *Trichoderma* spp. como un controlador biológico y antagonista natural de fitopatógenos muestra una amplia gama de hospedantes; dentro de ellos están los hongos fitopatógenos de importancia económica, tales como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder y Hans, *Fusarium roseum* Link, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *Passiflorae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, *Botrytis cinérea* Pers, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp. *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., entre otros (Michel *et al.*, 2004; Aquino *et al.*, 2007; Infante, 2009; Fernández *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2011<sup>a</sup>; Hernández *et al.*, 2011<sup>b</sup>).

Dado que *F. oxysporum* es uno de los principales patógenos que ataca al cultivo de chile, se planteó estudiar a *Trichoderma* spp. como una alternativa de control biológico, usando sus extractos metabólicos como una forma de mitigar la capacidad reproductiva del fitopatógeno.

Por lo anterior expuesto se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Determinar el efecto del extracto metabólico de *Trichoderma asperellum* T2-31 sobre la capacidad reproductiva de *Fusarium oxysporum*.
- b) Determinar la efectividad antagónica de *Trichoderma* sp. T2-11 y *T. asperellum* T2-31, sobre *Fusarium oxysporum* en cultivos duales.

## REVISION DE LITERATURA

### Pudrición de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L)

Las pudriciones de la raíz son el principal problema fitopatológico del cultivo de chile en el Norte-Centro de México (Velásquez *et al.*, 2001), donde puede provocar del 40 al 70 % de mortandad en la población inicial de plantas (Velásquez *et al.*, 2002). En muestreos de campo realizados durante el año 2000 en los Estados de Aguascalientes y Zacatecas, se detectó a los hongos *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp. y *Pythium* spp. en raíces de plantas enfermas (Cuadro 1). La sintomatología asociada con la pudrición de la raíz del chile incluyó defoliación, cambio de color y rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, maduración adelantada e irregular, pudrición de la raíz, raicillas necróticas, presencia de rebrotes y otros síntomas como nudos deprimidos (Velásquez *et al.*, 2001).

**Cuadro 1.** Frecuencia de aislamiento de hongos patógenos asociados a las raíces de plantas de chile con síntomas de pudrición en Aguascalientes y Zacatecas (Velásquez y Medina, 2003).

Patógeno (s)	Frecuencia de aislamiento (%)
<i>Rhizoctonia</i> spp	31.6
<i>Fusarium</i> spp	34.1
<i>Phytophthora</i> spp	14.1
<i>Rhizoctonia</i> spp + <i>Fusarium</i> spp	1.5
<i>Phytophthora</i> spp + <i>Fusarium</i> spp	0.5
<i>Rhizoctonia</i> spp + <i>Phytophthora</i> spp	0.5
<i>Pythium</i> spp	1.0
<i>Verticillium</i> spp	2.5
<i>Fusarium</i> spp + <i>Phytophthora</i> spp + <i>Rhizoctonia</i> spp	0.5

Apodaca *et al.*, (2004) reportan que en el estado de Sinaloa, *Fusarium oxysporum* está ampliamente asociado a la enfermedad conocida como pudrición de la corona del chile (PCCH), la incidencia de esta enfermedad, es de hasta un 35% en determinadas zonas. Como síntomas las plantas mostraron clorosis, flacidez y defoliación parcial; también se observó pudrición de raíces y cuello que en ocasiones ascendió de 10 a 15 cm de la base del tallo, afectando la corteza, médula y el sistema vascular. Las plantas murieron generalmente en etapa de fructificación.

Macías *et al.*, (2010) recomiendan un tratamiento de control que se inicia con la aplicación de fumigante Metam Sodio al terreno donde se va a establecer el cultivo, con el objetivo de disminuir el nivel de inóculo y mantenerlo bajo durante todo el ciclo del cultivo, utilizando fungicidas químicos dirigidos. También mencionan fortalecer las defensas de la planta mediante una buena nutrición y el control en el suministro de agua.

En lo que respecta al control biológico de *Fusarium* spp., que es el hongo con más frecuencia de aislamientos, por lo menos en la parte centro-norte de México; se han reportado microorganismos antagónicos entre los que tenemos a las bacterias; *Streptomyces* spp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* (Trujillo *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2008 y Fermino *et al.*, 2009) y hongos como *Gliocladium virens*, *Fusarium oxysporum* (no patogénico), *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* spp. (Fadel, 2005; Belgrove 2007 y Quiroz *et al.*, 2008).

## **Importancia del Control Biológico de Hongos Fitopatógenos**

El control biológico se refiere a la utilización intencionada de organismos vivos introducidos o nativos, para suprimir las actividades y poblaciones de uno o más fitopatógenos (Pal y McSpadden, 2006).

Los fitopatógenos son los factores más importantes que causan pérdidas a los productos agrícolas cada año. Para minimizar estas pérdidas, los agricultores utilizan fungicidas que causan efectos tóxicos a la salud humana. Por lo tanto, la necesidad de una agricultura sostenible dependerá cada vez más en la integración de la biotecnología con

las prácticas agrícolas tradicionales. El método de control sostenible y ambientalmente más aceptable, puede conseguirse utilizando el control biológico, debido al esfuerzo para reducir el uso de agroquímicos y sus residuos en el medio ambiente y en los alimentos. Para mejorar la producción de cultivos es necesario, identificar, entender y utilizar microorganismos o productos microbianos para el control de fitopatógenos, estos puntos son partes integrales de la agricultura sostenible (Khokhar *et al.*, 2012).

## **Género *Trichoderma***

### **Historia**

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1791 en Alemania y cuatro especies fueron originalmente descritas. En 1927 Gilman y Abbott reconocieron cuatro especies en base a la forma de la conidia, el color y al desarrollo de la colonia (Mohiddin *et al.*, 2010). El potencial de *Trichoderma* como agente biocontrolador fue sugerido por Weindling en 1932, quien fue el primero en demostrar la actividad parasítica de los miembros de este género hacia patógenos de suelo (Fadel, 2005). El primer intento serio de distinguir morfológicamente especies de *Trichoderma*, o más bien "especies agregadas", fue hecho por Rifai en 1969, logrando definir nueve especies (Kubicek y Harman, 1998).

### **Características del Género *Trichoderma***

*Trichoderma* forma una colonia que se desarrolla rápidamente, al inicio el micelio es sumergido y eventualmente es aéreo hialino muy variable en su forma, puede ser enmarañado, flocoso, lanoso o aracnoideo, dependiendo de la cepa y del medio de cultivo. El color de la colonia es variable, puede ser amarillo, ámbar, rojizo opaco o amarillo-verde. Produce un olor principalmente pronunciado o débil, característico del género, lo que sugiere el olor a coco o alcanfor. La producción de conidios es abundante en pústulas o formando mechones

compactos, normalmente en tonos verdes y con menos frecuencia blanco, gris o marrones. El conidióforo en la mayoría de las especies posee un eje principal ampliamente ramificado a intervalos regulares, con ramas sucesivas apicalmente, las distales son más cortas y estrechas; la ramificación del conidióforo es más o menos divergente, solitario, emparejados o en verticilos; las ramificaciones verticiladas en forma consecutiva pueden dar como resultado una estructura piramidal altamente ramificada, en otras especies la ramificación es menor, regularmente con ramas solitarias o en parejas. La anastomosis puede ocurrir entre conidióforos adyacentes. Presenta células conidiogénicas, conocidas como fiálides, por lo general dispuestas en verticilos divergentes, terminales en las ramas del conidióforo o directamente debajo de los septos a lo largo de los conidióforos y ramas, de lo contrario son emparejadas o solitarias y dispuestas irregularmente; cilíndricas, subuladas, lageniformes, ampuliformes o subglobosas; generalmente atenuadas a un conidióforo estrecho, teniendo el cuello corto y cilíndrico. Los conidios son unicelulares, típicamente verdes, grisáceos o parduscos o incoloros; las paredes son lisas a claramente rugosas o con proyecciones sinuosas, ampollosas o en forma de ala de la pared exterior; subglobosos, ovoides, elipsoides, oblongos o cilíndricos. Las clamidosporas generalmente están presentes y son abundantes, especialmente en el micelio sumergido; son intercalares o terminales en cortas ramas laterales de las hifas vegetativas; de apariencia globosa a elipsoide, incoloras o de color amarillento a verdoso, lisas y a veces de paredes gruesas ( $4 \mu\text{m}$ ). Las hifas vegetativas generalmente son hialinas de paredes lisas de  $1 - 10 \mu\text{m}$  de ancho, con menos frecuencia (o en el micelio sumergido) de color amarillo pálido, con un engrosamiento de pared irregular de hasta  $16 \mu\text{m}$  de anchura (Gams y bissett, 1998).

### **Sistemática de *Trichoderma***

La taxonomía del género *Trichoderma* ha sido debatida fuertemente y no ha sido sino hasta épocas recientes que se ha podido realizar una identificación taxonómica confiable (Druzhinina y Kubicek, 2005). Los análisis filogenéticos muestran que *Trichoderma* e *Hypocrea* son congéneres (Samuels, 2006). Otros análisis revelan que especies de *Hypocrea* con ascosporas verdes y anamorfos de *Trichoderma* son derivados desde dentro de *Hypocrea* pero no forman un grupo monofilético. Los caracteres fenotípicos por sí solos no son



generalmente útiles en la comprensión de relaciones filogenéticas en este grupo de organismos, ya que los caracteres teleomorfos son generalmente muy conservados y caracteres anamorfos tienden a ser morfológicamente divergentes dentro de los linajes monofiléticos o clados (Cheverri y Samuels, 2003).

En los últimos 15 años, se inició una nueva era de la sistemática de hongos, mediante la aplicación de técnicas moleculares para responder preguntas de patrones y procesos evolutivos. La clasificación de los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*, como teleomorfos dentro de los Hypocreales, ha beneficiado enormemente la aplicación de análisis moleculares (Lieckfeldt *et al.*, 2002). En el 2004 se tenían 88 especies (que aparecían como 14 holomorfos, 49 teleomorfos y 25 anamorfos en la naturaleza) de *Trichoderma/Hypocrea* que habían sido confirmadas por una combinación de características morfológicas, fisiológicas y enfoques genéticos (Druzhinina y Kubicek, 2005). Para el 2006 la ISTH (International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* taxonomy) enlistó, 104 especies que ubicó, en 5 secciones (Pachybasium, Longibrachiatum, Trichoderma, Hypocreamun y linajes solitarios) que consecutivamente las dividió en 16 clados (ISTH, 2006).

Mohiddin *et al.*, (2010) ubican al género *Trichoderma* como sigue.

**Reino:** Fungi

**División:** Ascomycota

**Subdivisión:** Pezizomycotina

**Clase:** Sordariomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Hypocreaceae

**Genero:** Tel= *Hypocrea* ; An= *Trichoderma*

**Especie:** *asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg

## Hábitat

La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de *Trichoderma* spp., está en el rango de 25-30 °C Según estudios de laboratorio (Klein y Eveleigh, 1998). Daved (1983) demostró que *Trichoderma harzianum* introducido en un suelo de campo fue capaz de sobrevivir saprofiticamente por 3 años.

*Trichoderma* se considera generalmente como un género de hongos del suelo de vida libre, pero la evidencia sugiere que las especies de *Trichoderma* pueden ser simbioses oportunistas de plantas, no virulentas, así como parásitos de otros hongos. Los miembros del género *Trichoderma* están universalmente presentes en casi todos los suelos del mundo, aunque algunas especies puede ser cosmopolitas (por ejemplo, *T. harzianum*) o limitadas (por ejemplo, *T. viride*) en su distribución geográfica (Samuels, 2006).

Las especies de *Hypocrea* se encuentran con mayor frecuencia en la corteza o en la madera descortezada de árboles, pero muchas especies crecen en hongos de repisa (por ejemplo *H. pulvinata*), exidia (*H. sulphurea*), nidos de pájaro (*H. latizonata*) o en agárlicos (*H. avellanea*) (Cheverri y Samuels, 2013).

## Mecanismos Empleados por *Trichoderma* en el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos.

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas y patógenos interactúan con una amplia variedad de organismos. Estas interacciones pueden afectar significativamente la salud de las plantas de varias formas. Para comprender los mecanismos de control biológico, es útil apreciar las diferentes formas en que los organismos interactúan (Pal y McSpadden, 2006). Las poblaciones de dos especies pueden interactuar de dos maneras básicas, que corresponden a combinaciones neutras, positivas y negativas (Odum *et al.*, 2008). Desde la perspectiva de la planta, el control biológico puede ser considerado como un resultado neto positivo, procedente de una variedad de interacciones específicas y no específicas (Pal y McSpadden, 2006).

Por su tipo de asociación los microorganismos presentan diferentes interacciones. Los tipos de interacciones entre dos especies son: a) amensalismo, en el cual una población es inhibida y la otra no se ve afectada; b) comensalismo, en el cual una población se beneficia y la otra no se ve afectada; c) protooperación, (llamada también *cooperación facultativa*), en la cual ambas poblaciones se benefician por su asociación, aunque sus relaciones no son obligatorias; d) mutualismo, en el cual el desarrollo y crecimiento de ambas poblaciones se ve beneficiado, y ninguna de ellas puede sobrevivir en condiciones naturales sin la otra; e) Neutralismo, en el cual ninguna población es afectada por asociación con otra (Odum *et al.*, 2008); en contraste, el antagonismo entre organismos resulta en una forma negativa para uno u otro (Pal y McSpadden, 2006), f) Competencia del tipo de interferencia directa, en la cual ambas poblaciones se inhiben de manera activa una a la otra; g) competencia del tipo de uso de recursos, en la cual cada población afecta adversamente a la otra de manera indirecta en la lucha por recursos de poca abundancia; h) parasitismo y depredación, en la cual una población afecta adversamente a la otra por ataque directo; sin embargo, puede depender de ella (Odum *et al.*, 2008).

### **Antagonismo**

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista. Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación, siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógenos el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo, los antagonistas producen antibióticos, actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

## **Competencia**

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento, desarrollo y resistencia a fungicidas, por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Ahmad y Baker, 1987; Klein y Eveleigh, 1998).

### **Competencia por Nutrientes**

La competencia entre *Trichoderma* y otros microorganismos es por nitrógeno, fosfatos, carbohidratos, polisacáridos (almidón, laminarina, pectinas) y biopolímeros (celulosa, quitina) (Vera *et al.*, 2002; Stefanova *et al.*, 2009)

Se han manipulado ciertas especies de *Trichoderma*, para hacerlas más competitivas en la rizosfera, tal y como se ha observado en mutantes-UV y fusión de protoplasmas de *Trichoderma harzianum*, mostrando una mejor capacidad de biocontrol en comparación con las cepas de tipo salvaje o cepas padres (Guazzone *et al.*, 2010).

### **Micoparasitismo**

El micoparasitismo es el ataque de un hongo a otro, es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales incluyendo reconocimiento, ataque y subsecuentemente penetración y muerte del hospedero, esto tiene especial relevancia cuando la presa es un patógeno de plantas, proporcionando una estrategia para el control biológico de fitopatógenos, (Mohiddin *et al.*, 2010; Kubicek *et al.*, 2011).

En el primer paso del micoparasitismo, *Trichoderma* detecta al hongo hospedero y crece hacia él; la teledetección es al menos parcialmente debido a la expresión secuencial de enzimas degradadoras de pared celular en su mayoría quitinasas, glucanasas y proteasas (Inbar y chet, 1995; Harman *et al.*, 2004), en seguida ocurre una difusión de estas enzimas, así como liberación de oligómeros de la pared celular del hongo hospedero y estos a su vez inducen la expresión de endoquitinasas fungitóxicas (Mach *et al.*, 1999; Brunner *et al.*, 2003), que se difunden y comienzan el ataque contra el hongo de destino antes de que realmente se haga el contacto (Viterbo *et al.*, 2002). En observaciones hechas por Singh *et al.*, (2005) concluyeron que el reconocimiento / unión del micoparásito (*T. harzianum* y *T. viride*) a la superficie del hospedero (*M. phaseolina*) puede ser más probable debido a interacción con lectinocarbohidratos.

Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* spp. se fija al hospedero y puede enrollarse alrededor de él, enseguida los apresorios se forman sobre la superficie del hospedero (Harman *et al.*, 2004). Al final la muerte de la presa, es resultado de las acciones sinérgicas de metabolitos secundarios antifúngicos y enzimas hidrolíticas (amilasas, celulasas, proteasas, poligalacturonasas, glucanasas, esterases, quitinasas, entre otras) (Chirmbock *et al.*, 1994) que son secretadas por la pared celular de *Hypocrea* / *Trichoderma* spp. estos compuestos desintegran y perforan la pared celular del patógeno, ocurriendo la entrada directa de hifas de *Trichoderma* en el lumen del hongo blanco (Elad *et al.*, 1982; Reithner *et al.*, 2011; Druzhinina *et al.*, 2011 ;Anita *et al.*, 2012; Gruper y Seidl, 2012). Los genes que codifican las enzimas parecen útiles para producir plantas transgénicas resistentes a enfermedades y las enzimas mismas son beneficiosas para el control biológico y otros procesos (Harman, 2006).

## **Antibiosis**

La antibiosis es la producción de metabolitos o antibióticos fúngicos, estos son toxinas que pueden ser nocivas para otros microorganismos a bajas concentraciones (Pal y McSpadden, 2006). Dichos metabolitos no solo actúan de forma directa contra los fitopatogenos, sino también de forma indirecta desempeñando un papel esencial en las

respuestas de defensa de las plantas (Brotman *et al.*, 2010). Los metabolitos secundarios son en general divididos en varios grupos característicos; policétidos, terpenos, fenoles, alcaloides, que reflejan su origen y la biosíntesis (Sivasithamparam y Ghisalberti, 2002).

*Trichoderma* spp. son una fuente rica de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles (Ajith y Lakshmidivi, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012), generalmente los metabolitos volátiles inhiben el crecimiento de otros hongos sin hacer contacto físico, por ejemplo, Stefanova *et al.*, (1999) detectaron, una lactona volátil con aroma a coco, probablemente 6 pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP) que inhibe el crecimiento de *Phytophthora nicotianae*. Este metabolito volátil causó a nivel celular vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis. La 6 pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP) producido por *Trichoderma* spp., inhibe el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* y reduce su capacidad reproductiva. (Michel *et al.*, 2004).

Vinale *et al.*, (2006), reportaron que los metabolitos secundarios producidos por cepas comerciales de *Trichoderma harzianum* (T22 y T39) tienen diferentes actividades contra patógenos, lo que sugiere que los compuestos individuales puede tener modos específicos de acción. La T22 antraquinona mostró una actividad débil o nula contra los patógenos ensayados, en contraste la T39 butenolide y harzianopyridona mostraron actividad fuerte contra *G. graminis* var. *tritici* incluso a bajas concentraciones. La T22 azaphilona era activo contra todos los patógenos de plantas ensayadas, mientras que la T39 butenolide era activo contra *G. graminis* var. *tritici* y *R. solani*, pero no contra *P. ultimum*.

Anita *et al.*, (2012) sintetizaron metabolitos secundarios de la cepa Tv1 de *T. atroviride*. El filtrado del cultivo del antagonista mostró la presencia de varios compuestos tales como N-phenylethylenediamine, el fenol, 2-(2-benzoxazolilo), ácido ftálico, dialilamina, 1,2,4,5-tetrazina,3,6-bis(1-metiletil), propanal, 2-metil-oxima, N-(2-propinil)-2,2-dimethylaziridine. El cromatograma de análisis de GC-MS determinó que el ácido ftálico, dialilamina y 1,2,4,5-tetrazina3,6-bis (1-metiletil) obtenido en el tiempo de retención de 20,91, 21,83 y 23,26, respectivamente mostró picos más altos. Estos metabolitos secundarios tal vez sirven al antagonista en la función de supervivencia al competir contra el patógeno.

La secuenciación reciente del genoma de *T. virens* reveló que alberga más de 500 genes relacionados con el metabolismo secundario, muchos de ellos están en grupos. Sin

embargo, hasta la fecha sólo unos pocos metabolitos se han caracterizado, en particular gliotoxina, gliotoxina dimetoxi, gliovirin, ácido heptelídico, viridin, viridiol y un peptaibol 18-mer (Mukherjee y Kenerley, 2010).

## Inducción de Resistencia

Se ha observado que *Trichoderma* spp. colonizan las raíces de las plantas e inducen resistencia sistémica (Harman *et al.*, 2004). Estas especies son capaces de modificar beneficiosamente la respuesta de más de 10 diferentes dicotiledóneas y monocotiledóneas, que incluyen gramíneas, solanáceas y cucurbitáceas contra la infección causada por hongos (*R. solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., etc), bacterias (*Xanthomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, etc), e incluso virus (virus del mosaico del pepino) (Woo *et al.*, 2006).

Raíces tratadas con *Trichoderma* revelan la penetración del micoparásito, restringido principalmente a la epidermis y la corteza exterior. La colonización de *Trichoderma* dió como resultado el fortalecimiento de las paredes de las células epidérmicas y corticales y la deposición de las barreras recién formadas, estas reacciones del huésped típicas se encuentran más allá de los sitios de penetración del hongo (Mukherjee *et al.*, 2008).

Hung *et al.*, (2013) reportaron que las plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en presencia de compuestos orgánicos volátiles (COVS) de *T. viride* eran más altas, más grandes, florecieron antes, y tenían más raíces laterales, que las no tratadas. También había aumentado la biomasa total (45%) y la concentración de clorofila (58%). Análisis de *T. viride* revelaron 51 COVS de los cuales alcohol isobutílico, alcohol isopentilo, y 3-metilbutanal eran más abundantes. Concluyeron en que los COVS emitidos por *T. viride* tiene efectos en la promoción del crecimiento de *A. thaliana* en ausencia de contacto físico directo.

Especies de *Trichoderma* producen tricotecenos, especialmente trichodermina y harzianum A (HA). El HA desempeña una función importante en la sensibilización de la planta contra patógenos fúngicos, induciendo la expresión de genes de defensa pertenecientes a la vía del ácido salicílico y jasmonatos (Malmierca *et al.*, 2012).

## Usos de *Trichoderma* spp.

En el ámbito agrícola *Trichoderma* es ampliamente usado como un biofungicida de hongos fitopatógenos de la raíz principalmente, en el mercado existe una gran cantidad de cepas capaces de controlar gran variedad de diferentes especies de hongos, estas cepas pertenecen principalmente a las especies *T. viride*, *T. harzianum* y *T. virens* (Mohiddin *et al.*, 2010). En general los formulados comerciales a base de la biomasa de *Trichoderma* spp, son derivadas de la fermentación líquida y sólida (Sriram *et al.*, 2010). Hernández *et al.* (2012) reportan que los microencapsulados (MICS) de *Trichoderma* muestran un efecto mejor que los formulados líquidos, los MICS poseen un buen efecto antifúngico, promueven el crecimiento y aumentan la tasa fotosintética de las plantas de Chile.

Recientemente se han hecho trabajos en la construcción y análisis de la función de *Trichoderma* transformado con genes de *Metarhizium* contra insectos y se han tenido muy buenos resultados (Chen y Li, 2010). Por otra parte varios aislamientos de *Trichoderma* revelan actividad nematicida contra *Meloidogyne* spp, teniendo como modos de acción, actividades enzimáticas, parasitismo directo, antibiosis y la resistencia inducida (Spiegel y Sharon, 2010).

Dashtban *et al.*, (2013) reportaron que se puede obtener Xilitol, modificando genéticamente cepas de *Trichoderma reesei*, utilizando paja de cebada como materia prima. El Xilitol, es un edulcorante derivado de la D-xilosa, es actualmente muy demandado por las industrias. También se ha demostrado que *Trichoderma viride* es un adsorbente adecuado para la eliminación de plomo (Prasad *et al.*, 2013), cromo y cadmio (Singh *et al.*, 2012) de efluentes y suelos contaminados.



## *Fusarium oxysporum*

*F. oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988, citado por Garcés *et al.*, 2001).

Existen más de 120 formas especiales diferentes, estas han sido identificadas sobre la base de la especificidad de especie huésped que pertenecen a una amplia gama de familias de plantas (Di pietro *et al.*, 2003). Entre las formas especiales de importancia económica tenemos a: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (mal de Panamá del banano); *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (marchitez del tomate); *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (marchitez del frijol); *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* (marchitez de la arveja); *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (marchitez del clavel); *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* (marchitez del crisantemo); *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Agrios, 2005).

### **Morfología**

El micelio es incoloro al principio, pero con la edad se vuelve de color crema, amarillo pálido, rosa pálido o violeta (Agrios, 2005). Los macroconidios se forman en esporodoquios de color naranja pálido, generalmente abundantes. Los macroconidios son cortos a medio en longitud, encorvados a casi rectos y de paredes delgadas, generalmente con 3 septos. La célula apical es corta y ligeramente enganchada en algunos aislamientos. La célula basal posee forma de pie. Los macroconidios se forman a partir de monofialides en conidióforos ramificados en los esporodoquios y en menor medida de monofialides en hifas. Los microconidios generalmente sin septos, pueden ser de forma oval, elíptica o reniforme (en forma de riñón) y se forman abundantemente en falsas cabezas en cortos monofialides. Las clamidosporas se forman abundantemente en hifas en la superficie del agar en la mayoría de

los aislados, especialmente en clones saprofitos del suelo, pero pueden formarse lentamente (4-6 semanas) en algunos aislamientos (Leslie *et al.*, 2006). Los tres tipos de esporas se producen en los cultivos del hongo y probablemente en el suelo, aunque sólo las clamidosporas puede sobrevivir en el suelo durante mucho tiempo (Agrios, 2005).

## **Síntomas**

Los primeros síntomas de la enfermedad son el amarillamiento del follaje, comenzando con la caída de las hojas. Las hojas infectadas posteriormente muestran un encrespamiento bajo, seguidamente se oscurecen y se secan. La parte superior de la planta se marchita durante el día y se recupera en la noche, pero el marchitamiento empeora hasta que la planta se marchita completamente observándose el oscurecimiento vascular en los tallos y los pecíolos infectados de las hojas grandes. Las plantas afectadas y sus sistemas de raíces se atrofian. El patógeno puede estar en el suelo como saprófito durante muchos años sin un hospedante (Cerkauskas, 2005).

## **Ubicación Taxonómica**

Clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum* (Michielse y Rep, 2009)

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Sordariomycetes

**Order:** Hypocreales

**Familia:** Nectriaceae

**Género:** *Fusarium*

**Especie:** *oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Localización del Experimento**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología, perteneciente al Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

### **Obtención del Material Biológico**

#### **Aislamiento de *Fusarium oxysporum***

De una parcela experimental de chile (*Capsicum annum* L) del departamento de horticultura perteneciente a la UAAAN, se seleccionaron cuatro plantas que mostraban los síntomas de la marchitez del chile mencionados por Velásquez *et al.*, (2001), el aislamiento del fitopatógeno se llevó a cabo de acuerdo a la metodología mencionada por Agrios (2005). El hongo aislado se purificó de acuerdo a la técnica de cultivo monosporico, de las plantas se logró obtener a *Fusarium oxysporum* en forma pura, que fue caracterizado fenotípicamente de acuerdo a las características morfológicas descritas por Leslie *et al.*, (2006).

#### **Cepas de Hongos Antagónicos**

Las cepas T2-11 de *Trichoderma* sp. y T2-31 de *Trichoderma asperellum* fueron proporcionadas de la colección de hongos del proyecto 1330-3611-2262, coordinado por el Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo del departamento de parasitología de la UAAAN. Las cepas fueron seleccionadas por su gran capacidad antagónica contra *Phytophthora capsici*

Leonian, en cultivos duales, filtrados tóxicos y compuestos volátiles, dichas cepas fueron caracterizadas y evaluadas con anterioridad por Osorio *et al.*, (2011) y fueron identificadas de acuerdo a secuenciaciones del gen ribosomal 18s.

### **Incremento de los Microorganismos Estudiados**

Tanto *Trichoderma* spp. como *F. oxysporum* se incrementaron en cajas de Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), colocando en el centro un explante de 5 mm de diámetro. Las cajas fueron incubadas en oscuridad a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ .

### **Bioensayo No. 1. Antagonismo de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum* en Cultivos Duales**

Se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990), estudiando cuantitativamente la zona de intersección o traslape entre el hongo antagonista y el fitopatógeno. En cajas de Petri con medio de cultivo PDA, se colocó en un extremo un explante de 5 mm de diámetro de *Fusarium oxysporum* de 10 días de edad, dicho hongo se dejó crecer sin el antagonista tres días, esto debido a que en pruebas preliminares mostró un crecimiento lento. Transcurridos los tres días de la siembra del fitopatógeno, se colocó en el extremo contrario un explante de *Trichoderma* de 5 mm de diámetro con siete días de edad, enseguida se incubaron a  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ . Posteriormente se midió con un Vernier el radio de la zona de intersección y/o traslape de cada uno de los tratamientos.

### **Variables Estudiadas**

Las cepas se compararon con respecto a su capacidad antagónica, de acuerdo con la escala propuesta por Bell *et al.*, (1982) que se muestra en el cuadro 2; se consideró los días al contacto entre el antagonista y el fitopatógeno, y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum*, se determinó con la fórmula de

Samaniego *et al.*, (1989), citado por Ezziyyani *et al.*, (2004),  $PICR = R1 - R2 / R1 \times 100$ .  
 Dónde: R1 es el radio mayor (radio del patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

**Cuadro 2.** Clases de antagonismo de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos de acuerdo a Bell *et al.*, 1982.

Clase	Característica
Clase 1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y al medio.
Clase 2	<i>Trichoderma</i> cubrió dos tercios de la superficie del medio.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno, cada uno colonizó aproximadamente la mitad de la superficie del medio (más de un tercio y menos de dos tercios) y ni un organismo parece dominar al otro.
Clase 4	El patógeno colonizó por lo menos dos tercios de la superficie del medio y pareció resistir la invasión por <i>Trichoderma</i> .
Clase 5	El patógeno creció completamente y ocupó toda la superficie del medio.

## Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos tratamientos y cuatro repeticiones, con un total de 16 unidades. La variable a evaluar fue antagonismo de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum*. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9.1, las medias fueron comparadas con la prueba Tukey al 0.05 de significancia.

## **Bioensayo No. 2. Efecto del Extracto Metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre el Crecimiento Micelial de *F. oxysporum***

### **Obtención de los Extractos Metabólicos**

Se preparó medio de cultivo líquido con 200 gr de infusión de papa fresca sin cascara, 20 gr de sacarosa y 10 g de malta, del cual se vaciaron 100 ml del medio de cultivo líquido en matraces Erlenmeyer de 250 ml, y se esterilizó a 120° C por 15 min en autoclave, en cada matraz se colocaron tres explantes de 5 mm de diámetro de *T. asperellum* T2-31. Los matraces se mantuvieron en agitación a 150 rpm a 25±2 °C durante seis días. El contenido de los matraces se filtró primero en papel Watman No. 1, el filtrado se centrifugó a 4000 rpm por un tiempo de 10 min, enseguida el sobrenadante se esterilizó dos veces por filtro milipore de 0.20 µm. El extracto estéril se mantuvo en refrigeración a 4° C hasta su utilización.

### **Establecimiento del Experimento**

En la cámara de flujo laminar se prepararon cinco soluciones de extracto, en concentraciones de 100, 75, 50 y 25 %, se usó como solvente agua destilada estéril. De estas concentraciones preparadas se colocaron 1000 µl en cajas de Petri vacías, enseguida se vertió el medio de cultivo PDA a medio solidificar, las cajas se agitaron suavemente 10 veces en forma circular. Para cada concentración se establecieron cuatro repeticiones y un testigo. Las cajas se dejaron en observación por 24 h, esto para verificar que no hubiese crecimiento del antagonista o de algún contaminante. Posteriormente transcurridas las 24 h de reposo, se inocularon las cajas de Petri, colocando en el centro un explante de 5 mm de diámetro del fitopatógeno con 10 días de edad, se incubó a 28±2 °C por 15 días (días que tardó el testigo en llenar la caja). Se midió el crecimiento del hongo con un Vernier cada 24 h y se determinó el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum* con la fórmula anteriormente mencionada.

## **Diseño Experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones para cada concentración (Tratamientos) y el testigo que fue PDA+Agua. La variable a evaluar fue efecto del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9.1, las medias fueron comparadas con la prueba Tukey al 0.05 de significancia.

### **Bioensayo No. 3. Efecto del Extracto Metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la Conidiogénesis de *F. oxysporum***

Para medir el efecto del extracto sobre la conidiogénesis de *F. oxysporum* se procedió lo siguiente: al terminar las mediciones del bioensayo No. 2 (15 días) se procedió a colocar 10 ml de agua destilada en cada caja de Petri de ese mismo bioensayo, el micelio y las conidias se rasparon cuidadosamente con una varilla de vidrio, la suspensión obtenida se colocó en un tubo de ensaye con rosca y se agitó con un vortex por 10 segundos, con una micropipeta se tomó una pequeña cantidad de la suspensión y se colocó en una cámara de Neubauer donde se llevó a cabo el conteo. Los resultados se expresaron en número de conidios por mililitro.

## **Diseño Experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones y el control. La variable a evaluar fue efecto del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la conidiogénesis de *F. oxysporum*. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9.1, las medias fueron comparadas con la prueba Tukey al 0.05 de significancia.

#### **Bioensayo 4. Efecto del Extracto Metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la Viabilidad de Conidios de *F. oxysporum***

Se determinó el efecto del extracto sobre la germinación de los conidios de *F. oxysporum*, para lo cual se preparó medio cultivo envenenado como en el bioensayo No. 2, pero en vez de usar PDA se usó Agar-Agua (AA) al 2%. Las cajas de Petri se dejaron reposar por 24 h; transcurrido el tiempo se les añadió 1 ml de una suspensión conidial de  $1 \times 10^6$  conidios/ml de un cultivo vigoroso de *F. oxysporum* de 10 días de edad, la suspensión se dispersó en las cajas homogéneamente con una varilla de vidrio, posteriormente las cajas se incubaron a  $28 \pm 2$  °C en la oscuridad. Se utilizaron cinco cajas de Petri (cuatro repeticiones y un testigo) por tratamiento. El porcentaje de germinación se determinó a las 24 h por medio de un microscopio compuesto a 40X de aumento. Se contaron 10 conidios al azar por cada repetición y se registraron los datos en dos categorías:

- 1.- Germinación normal= longitud del tubo germinativo similar al tubo germinativo del testigo.
- 2.- No germinado.

#### **Diseño Experimental**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos, cada uno con cuatro repeticiones y el testigo absoluto. La variable a medir fue efecto del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la viabilidad de conidios de *F. oxysporum*. Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS System Versión 9, las medias fueron comparadas con la prueba Tukey al 0.05 de significancia.

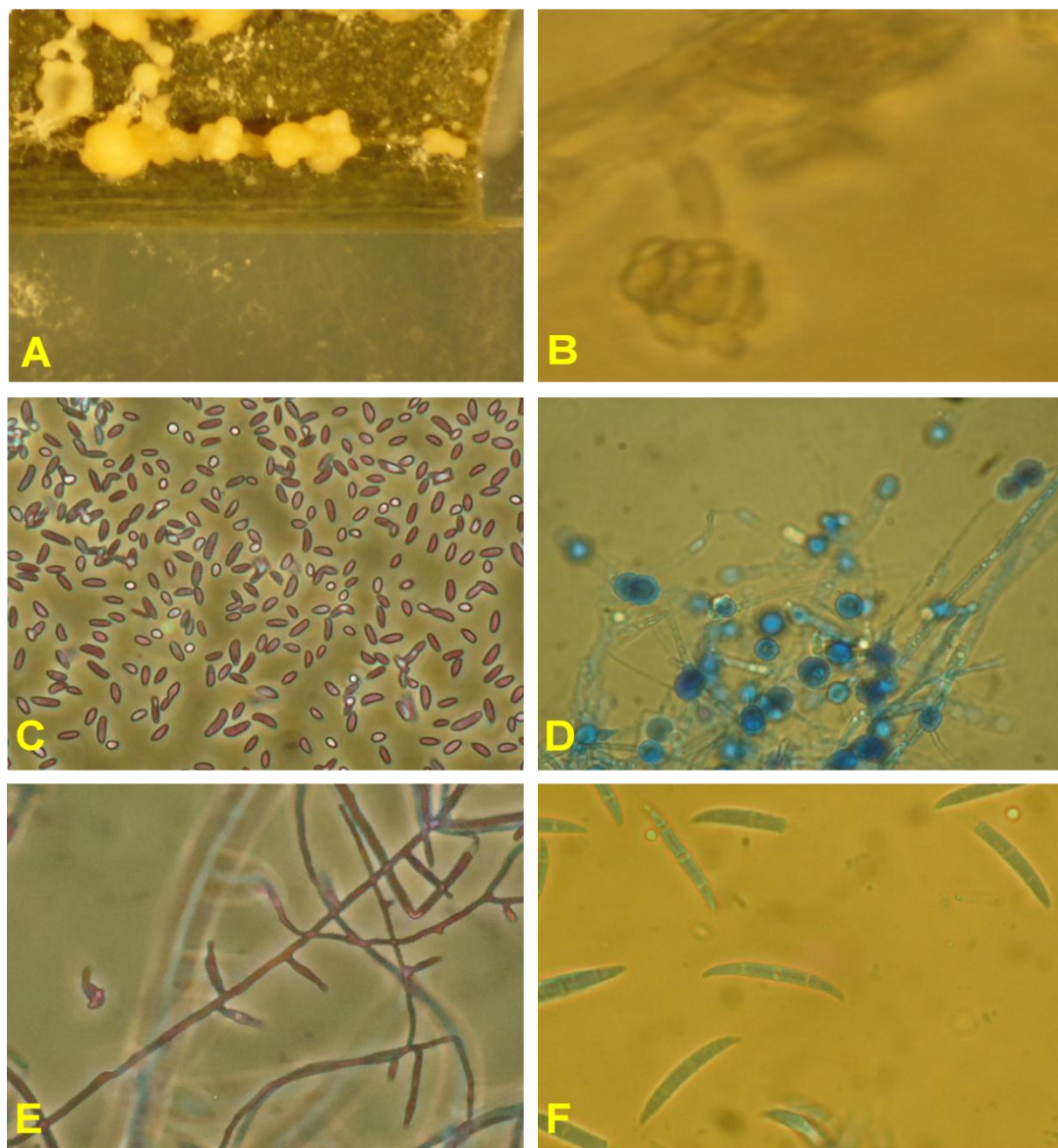


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento e Identificación de *Fusarium oxysporum*

**Características en PDA.** Se observó que la colonia de *Fusarium* presento un micelio algodonoso, el color vario de acuerdo a la edad, al principio el micelio presentó un tono rosado posteriormente a los quince días de edad el micelio se transformó en color violeta pálido. Las características fenotípicas observadas a nivel de microscopio invertido a 40 X muestran que el conidióforo crecía en forma irregular e individual, este no presentaba crecimiento agrupado formando esporodoquios y carecía de macroconidios. Las microconidias no tenían septos, la forma variaba de oval, elíptica a reniforme (con forma de riñón), estas se formaban en abundancia en monofialides cortas en forma de botella llamadas “falsas cabezas”, esta es la característica con la cual *F. oxysporum* se diferencia de *F. solani* quien forma las microconidios en falsas cabezas en monofialides largas. Las clamidosporas se encontraban en el micelio en una posición intercalar o terminal, solas o en pares, la forma de estas era circular con una doble pared de apariencia lisa (Figura 1).

**Características en clavel agar (CLA).** En este medio de cultivo se observó un micelio hialino, con un crecimiento adherido a la superficie del medio de cultivo. A los 12 días se pudo observar que los pequeños trozos de hojas de clavel presentaban gran cantidad de esporodoquios de color naranja palidó, al hacerse una preparación microscopica, se pudieron observar los macroconidios, cuya forma era fusoide y alantoide, con tres a cinco septos, la célula basal era apenas curva y la apical en forma de gancho. También se pudo observar la presencia de microconidios y clamidosporas (Figura 1), las características coinciden con lo descrito por Leslie *et al.*, (2006).



**Figura 1.** Características fenotípicas de *F. oxysporum*. (A) Esporodocio en CLA. (B) Microconidios en monofialides cortos (Falsas cabezas) en PDA. (C) Microconidios en PDA. (D) Clamidosporas en PDA. (E) Monofialides en PDA. (F) Macroconidios en CLA.

## Antagonismo de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum* en Cultivos Duales

Los resultados obtenidos muestran que las dos cepas de *Trichoderma* poseen capacidad para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, logrando detener el crecimiento al hacer contacto. A los 14 días de confrontamiento, la cepa T2-31 de *T. asperellum* inhibió el crecimiento radial en un 86.5%, mientras que la cepa T2-11 de *Trichoderma* sp. inhibió 69.8% (Figura 2). El análisis de varianza, detectó diferencia altamente significativa entre los dos tratamientos ( $P < .0001$ ); la prueba de medias (Tukey al 0.05) indica que la cepa de *Trichoderma* que mejor inhibe el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, es la cepa T2-31 de *T. asperellum* (cuadro 3).

Los días a contacto entre las dos especies de *Trichoderma* y *F. oxysporum* se presentó a los tres días. De acuerdo a la clasificación de Bell *et al.*, (1982), podemos ubicar a las dos especies en la escala 2, donde T2-31 y T2-11 cubrieron dos tercios de la superficie del medio (Cuadro 3 y Figura 2).

Osorio *et al.*, (2011) reportan que los días a contacto entre la cepa T2-31 de *T. asperellum* sobre *Phytophthora capsici* en cultivos duales, se hizo a los dos días y se clasificó en la clase 1 de la escala de Bell, de igual manera determinaron que la cepa T2-11 de *Trichoderma* sp. hizo contacto a los dos días con el patógeno y se clasificó en la clase 2 de Bell. Los datos obtenidos en esta investigación no concuerdan con los obtenidos por Osorio *et al.* (2011), esto puede deberse a la diferencia en la dinámica de crecimiento que presentan *F. oxysporum* y *P. capsici*, siendo menor en *Fusarium*, así como a la posibilidad de detoxificación del ácido fusárico (FA) producido por *Fusarium* spp. este hecho es demostrado por Sharma *et al.*, (2010), quienes señalan que *Tichoderma harzianum* S17TH es capaz de desintoxicar esta fitotoxina a 400 ppm por un tiempo de 7 días, pero la actividad de producción de quitinasas se reduce significativamente, esto puede ser una explicación del porqué *T. asperellum* T2-31 tarda más tiempo en hacer contacto con *F. oxysporum* que contra *Phytophthora capsici*, el nivel de antagonismo puede también ser afectado por esta sustancia.

Guigón *et al.*, (2010) reportan que las cepas de *T. asperellum* (TC74, T341 y T359) mostraron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *R. solani* y *B. cinerea* que *T. longibrachiatum*, pero no lograron reducir el crecimiento de *Fusarium* spp. El grado de inhibición ejercido sobre el crecimiento de los diferentes hongos fitopatógenos varió de 44 a 64%, estos resultados indican que solo ciertas especies y cepas de *Trichoderma* son capaces de inhibir el crecimiento en mayor manera a determinados hongos fitopatógenos.

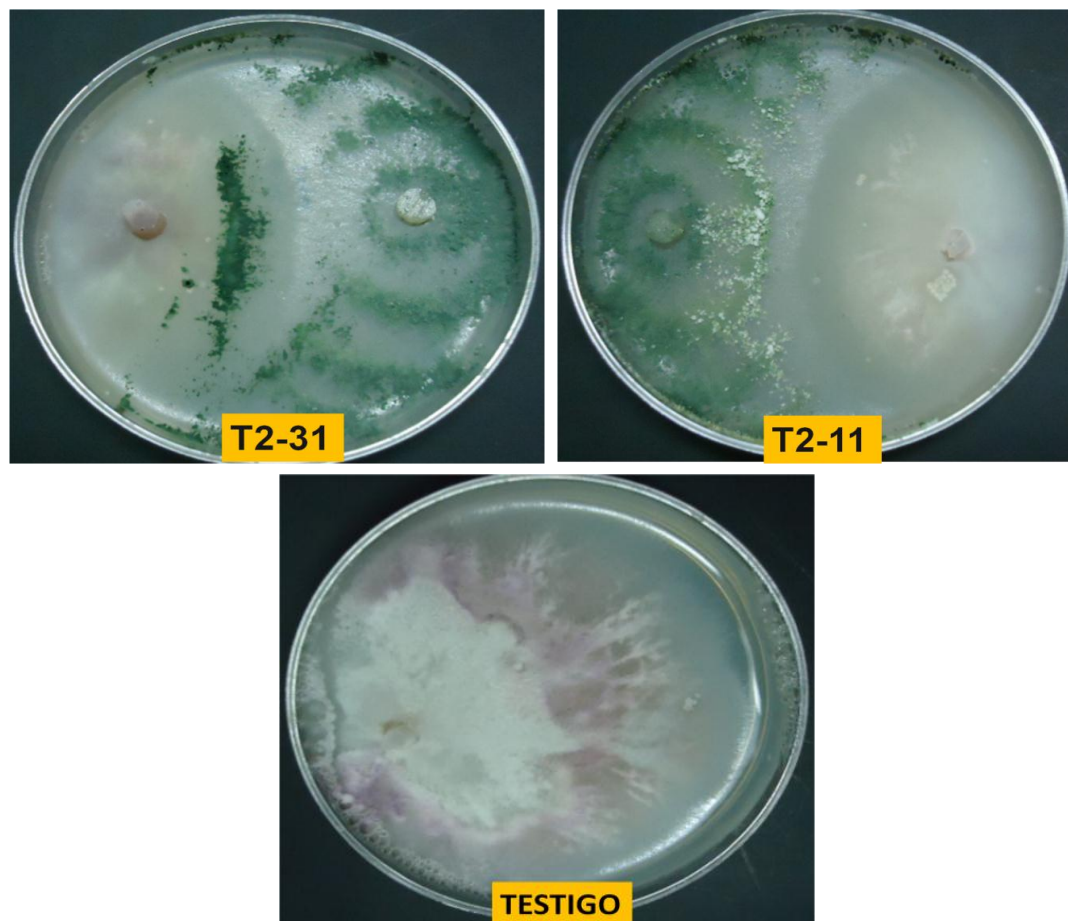
Ramos (2008), en un trabajo de confrontamiento entre cepas de *Trichoderma* y *F. oxysporum* en cultivos duales, determinó que los porcentajes de sobrecrecimiento de *Trichoderma* spp. sobre cepas de *Fusarium oxysporum* oscilaron entre 2.75% y 56.25 a los 12 días de incubación, los resultados obtenidos en este trabajo son más altos a los obtenidos por este autor, ya que el porcentaje de sobrecrecimiento de las cepas evaluadas osciló entre 69.8% y 86.5%, pero esto fue a los 14 días de incubación.

**Cuadro 3.** Traslape (cm) del crecimiento micelial de las cepas T2-31 y T2-11 sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, días al primer contacto entre los microorganismos y clases de antagonismo.

<b>Tratamiento</b>	<b>No. de cepa</b>	<b>Traslape en cm</b>	<b>Días al contacto</b>	<b>Clase de antagonismo**</b>
T1	T2-11	3.4 A*	3	2
T2	T2-31	4.1 B	3	2

\*Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de medias Tukey al 0.05 de nivel de significancia.

\*\*Clase de antagonismo según Bell *et al.* (1982).



**Figura 2.** Comparación del crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de los antagonistas *T. asperellum* T2-31 y *Trichoderma* sp. T2-11, con respecto al testigo.

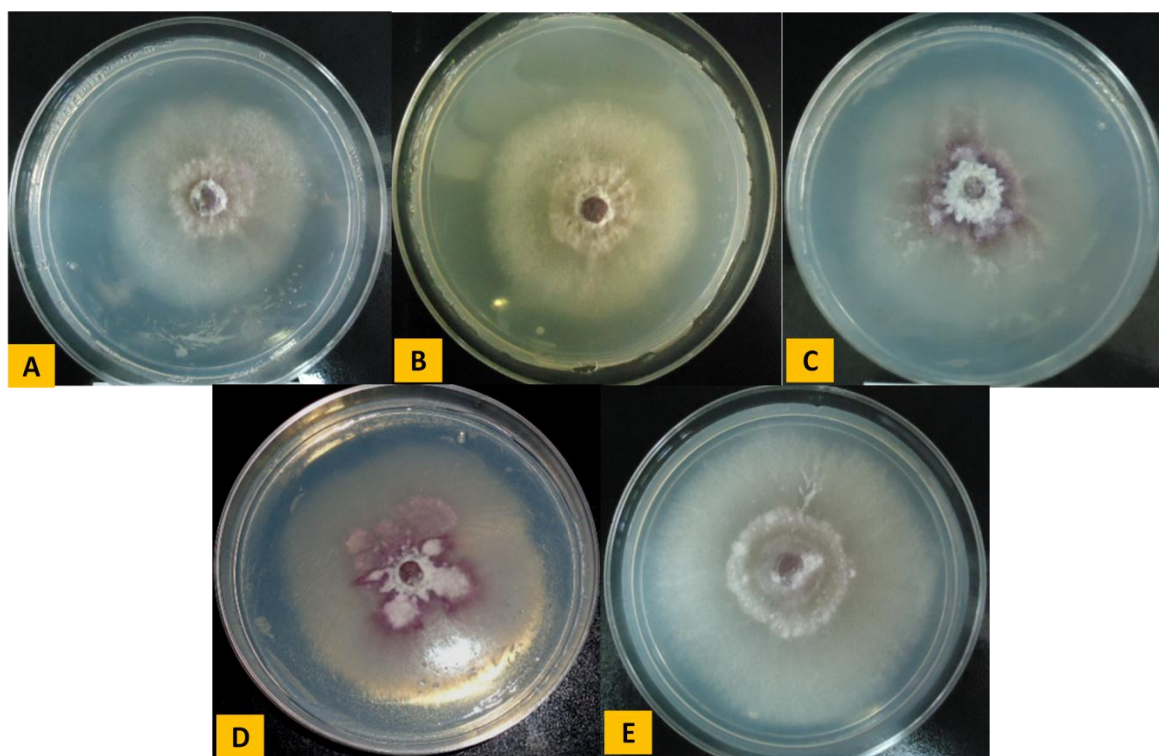
## **Efecto del Extracto Metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre el Crecimiento Micelial de *F. oxysporum***

Los resultados obtenidos muestran que todas las concentraciones de extracto afectan el crecimiento micelial de *F. oxysporum* (Figura 3), el análisis de varianza para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) arrojó una diferencia altamente significativa entre las diferentes concentraciones de extracto ( $P < .0001$ ).

El cuadro 4 nos muestra el PICM para cada concentración, este osciló entre 17.39% y 29.76%, se puede observar que hay una correlación entre la concentración del extracto y el crecimiento micelial, es decir entre más concentrado este el extracto mayor es el PICM. Las concentraciones que mostraron ser mejores de acuerdo a la comparación de medias Tukey (0.05) fueron las de 75 y 100%, no habiendo diferencia estadística entre estos dos tratamientos (Cuadro 4), a 75% se logró inhibir el crecimiento micelial en un 26.08% mientras que a 100% fue de 29.76%. Ramos (2008) encontró porcentajes de inhibición similares, reportando que los extractos de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento micelial de cepas de *F. oxysporum*, en un rango de 0 a 43.07%, los porcentajes de inhibición obtenidos en esta investigación están dentro del rango de los obtenidos por este autor. En un trabajo similar, realizado por Sharfuddin y Mohanka (2012) donde se probaron diferentes concentraciones (10, 25 y 50%) de extractos de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum*, de lo cual los autores observaron que al 50% de concentración, se muestra una inhibición más fuerte, el porcentaje de inhibición osciló entre 66.7% y 83.3%. *T. harzianum* Th5 mostró la mayor inhibición radial que fue 83.3%.

Por otra parte Castro (2011) en un estudio sobre antibiosis, usando filtrados de *T. asperellum* sobre *F. verticillioides*, reporta que las dosis ensayadas no mostraron ninguna diferencia, solo logró observar que a 500 $\mu$ L inhiben 28.86%, mientras que a 1000 $\mu$ L inhibió 28.72%, estos resultados son muy cercanos a los obtenidos en esta investigación ya que a 1000 $\mu$ L (100%) se logró inhibir el crecimiento en un 29.76%. Estudiando la misma especie Ayodeji *et al.*, (2009) encontraron que el filtrado de cultivo de *T. asperellum* NG-T161 redujo el crecimiento micelial de *F. oxysporum* en un 49.7% y *T. asperellum* NG-T158 lo en un

8.6%. Perveen y Bokhari (2012) reportan que los filtrados de cultivo de cepas de *Trichoderma* incubados a 25°C muestran una mayor inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*. *T. viride* (TvDPs) inhibió 25.57%, seguido de la cepa TDP (*T. harzianum*) con 20.59% y T1 (*T. harzianum*) con 17.43%. Estos tres estudios demuestran que los extractos o filtrados de *Trichoderma* spp. inhiben en gran medida el crecimiento de *Fusarium* spp., coincidiendo con los resultados obtenidos en esta investigación.



**Figura 3.** Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* por el extracto metabólico de *Trichoderma aspellum* T2-31 a las concentraciones 100% (A), 75% (B), 50% (C), 25% (D) y testigo (E).

**Cuadro 4.** Inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* con extracto de *Trichoderma asperellum* T2-31, a diferentes concentraciones, en 15 días de incubación.

Concentración	ICM (%) **
100%	29.76 A*
75%	26.08 A
50%	19.06 B
25%	17.39 B
Testigo	00.00 C

\*\* Inhibición de Crecimiento Micelial.

\*Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de medias Tukey al 0.05 de nivel de significancia.

Las curvas de crecimiento obtenidas de *F. oxysporum* a diferentes concentraciones de extracto, muestran apenas la forma sigmoideal típica de las poblaciones que se encuentran en ambientes con limitaciones (Weir y Gil, 1999), estos autores señalan una fase uno de crecimiento retardado, donde el hongo se adapta al medio de cultivo, sintetizando enzimas para degradarlo; una fase dos de crecimiento exponencial, donde la división celular se acelera, y la fase tres de tendencia asintótica, en esta última fase la división celular disminuye debido a la menor nutrición y a la acumulación de desechos tóxicos. La fase tres no se observa en los tratamientos con extracto y en el testigo apenas se observó de una manera inicial, requiriendo más tiempo y espacio para observar esta tendencia más claramente (Figura 4). La dinámica de crecimiento de *F. oxysporum* se ve afectada en diferentes niveles, siendo el crecimiento promedio diario más lento a concentraciones de 75 y 100% (3.68 mm/día y 3.5 mm/día) esto en comparación con el testigo (4.98 mm/día) (cuadro 5). Al parecer los extractos de *T. asperellum* T2-31, contienen ciertos antibióticos que solo retardan el crecimiento de *F. oxysporum*, sin mostrar acción fungicida; uno de estos antibióticos puede ser la 6-pentil- $\alpha$ -pirona, el cual presenta un efecto fungistático a partir de 525 ppm en *F. oxysporum* y no fungicida (Scarselletti y Faull, 1994; Michel *et al.*, 2004).

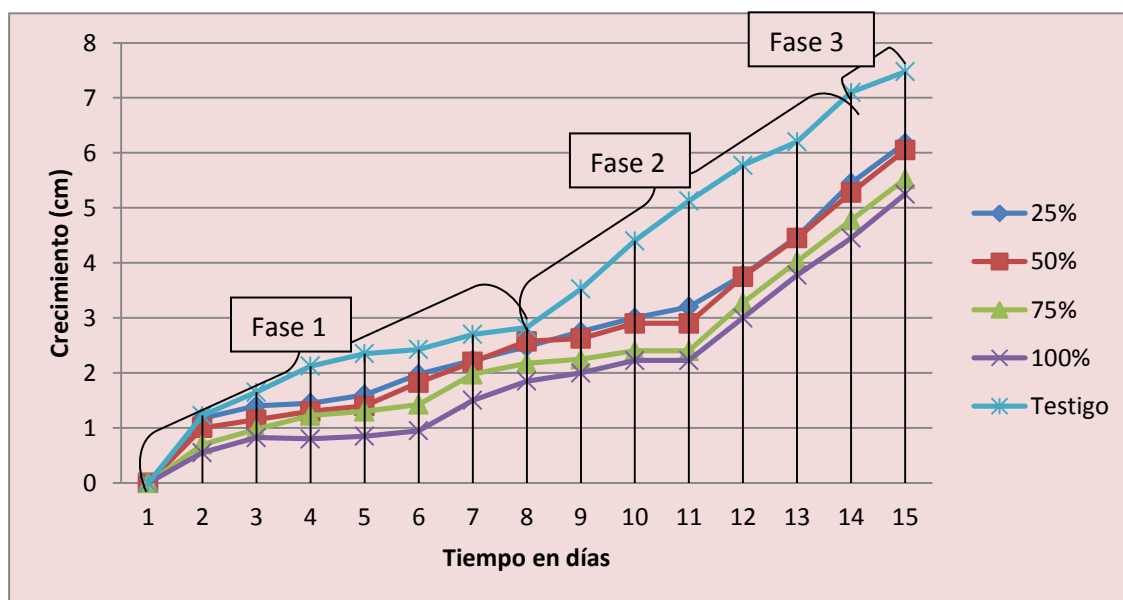
En la figura 5 se observa que la tendencia de las curvas de inhibición es similar en todas las concentraciones del extracto. Sin embargo se observa que al 5<sup>to</sup> y 11<sup>vo</sup> día hay un decremento en el crecimiento de *F. oxysporum*, posiblemente este comportamiento sea atribuido a la actividad de ciertas enzimas y antibióticos que le impiden el crecimiento normal sobre el medio cultivo, y en respuesta el fitopatógeno reacciona de tal manera que detoxifica a



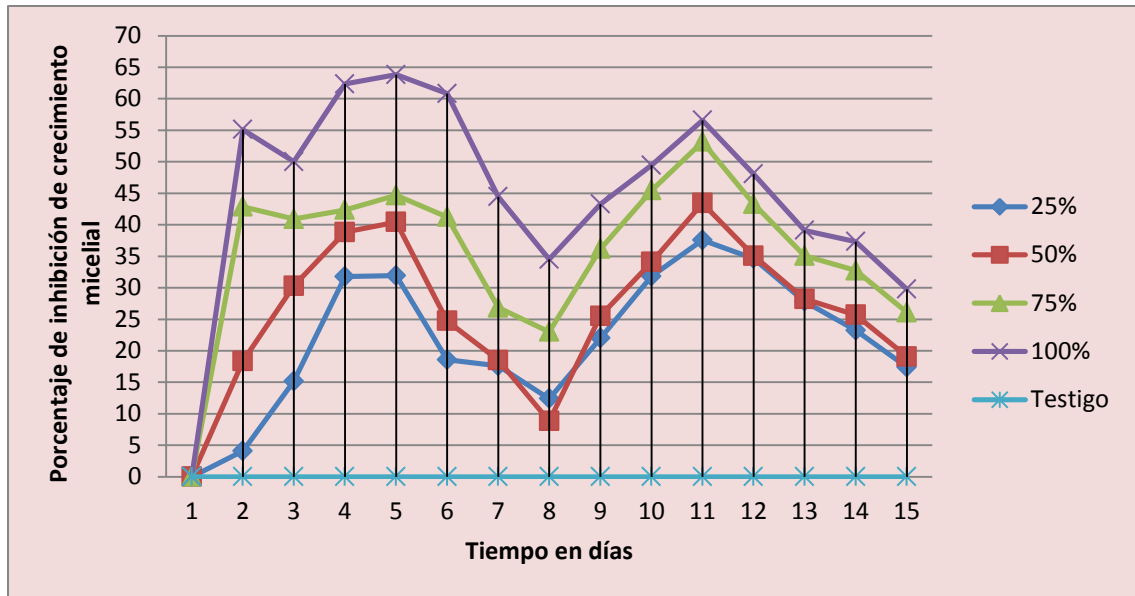
estas sustancias, generándose así un crecimiento inicial acelerado a partir del 6<sup>to</sup> y 12<sup>vo</sup> día , posteriormente al encontrarse con más sustancias fungistáticas, se inicia una nueva fase de detoxificación.

**Cuadro 5.** Efecto de las concentraciones de extracto de *Trichoderma asperellum* T2-31, sobre el crecimiento promedio diario de *F. oxysporum*.

Concentración	Crecimiento radial (mm)/día
25%	4.12
50%	4.03
75%	3.68
100%	3.50
Testigo	4.98



**Figura 4.** Dinámica de crecimiento de *F. oxysporum*, expuesto a diferentes concentraciones de extracto de *Trichoderma asperellum* T2-31.



**Figura 5.** Porcentaje de inhibición de crecimiento promedio/día de *F. oxysporum*, a diferentes concentraciones de extracto.

### **Efecto del Extracto Metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la Conidiogénesis de *F. oxysporum***

La prueba de medias Tukey (0.05) arrojó que los tratamientos no son significativamente diferentes (Cuadro 6), sin embargo se puede notar que al 100% de concentración se logra reducir la formación de conidios de  $3.0 \times 10^7$  a  $1.2 \times 10^7$ , que representa el 59.82% de reducción de la conidiogénesis, en tanto que al 25% de concentración solo se redujo el 27.87%, siendo este el valor más bajo (Cuadro 6); al parecer la reducción de conidios va correlacionada con la inhibición micelial; es de esperarse que al haber menor cantidad de micelio la producción de conidios también sea menor.

En los extractos usados en esta investigación, se tienen hipotéticamente mezcladas enzimas y antibióticos (no caracterizados) producidos por *T. asperellum* T2-31 en medio líquido, dichos extractos tuvieron un efecto negativo en la conidiogénesis de *F. oxysporum*, esto coincide con lo reportado por Michel *et al.*, (2005), mencionan que las quitinasas producidas por *Trichoderma* spp. logran reducir la formación de conidios de *F. oxysporum* en un 94.5%. El antibiótico 6 pentil- $\alpha$ -pirona producido por *Trichoderma* spp. reduce la formación de conidios de *F. oxysporum* hasta en un 44.4% (Michel *et al.*, 2004).

**Cuadro 6.** Efecto de la concentración de extracto de *Trichoderma asperellum* T2-31, sobre la conidiogénesis de *F. oxysporum*.

Concentración	No. de conidios/ml	Inhibición de la Conidiogénesis (%)
25%	2.0 x10 <sup>7</sup> A*	27.87
50%	1.5 x10 <sup>7</sup> A	51.12
75%	1.5 x10 <sup>7</sup> A	49.43
100%	1.2 x10 <sup>7</sup> A	59.82
Testigo	3.0 x10 <sup>7</sup> A	00.00

\*Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de medias Tukey al 0.05 de nivel de significancia.

### **Efecto del Extracto Metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la Viabilidad de Conidios de *F. oxysporum***

La germinación de los conidios se ve reducida de forma gradual por las diferentes concentraciones del extracto, el porcentaje de germinación de los conidios osciló entre 55 y 82.5%, habiendo diferencia significativa entre los tratamientos (P<0.0004). El menor porcentaje de germinación se presentó a la concentración de 100% del extracto, esto coincide con lo reportado por Ubalua y Oti (2007), quienes encontraron que a la concentración de 100% del filtrado de *Trichoderma viride*, hay un menor porcentaje de germinación de los conidios de *Fusarium solani* (0% de germinación).

En este ensayo se observó que a la más alta concentración del extracto (100%), se reduce la viabilidad de los conidios en un 45%, resultado similar a lo encontrado por Michel *et al.*, (2004), quienes evaluaron la 6 pentil- $\alpha$ -pirona producido por *Trichoderma* spp. sobre la viabilidad de conidios de *F. oxysporum*, la 6PAP redujo la viabilidad de los conidios en un 45.9%. Se ha reportado que las quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* spp., inhiben la viabilidad de conidios de *F. oxysporum* en un 66.3 y 74.2% respectivamente, estos datos coinciden con lo obtenido en este trabajo (Michel *et al.*, 2005).

También se han realizado estudios contra otros géneros de hongos fitopatógenos, tal y como lo reportan Aneja *et al.*, (2005), quienes evaluaron el ácido nonanoico producido por *Trichoderma harzianum*, este inhibe la germinación de esporas de *Moniliophthora roreri* en un 70% y a *Crinipellis pernicioso* en un 75%. Por otra parte Reshu y Mohd (2012), indican que los filtrados de *Trichoderma viride*, inhiben la germinación de conidios de *Alternaria brassicae* y *Alternaria brassicicola*, en un 71 y 69%, respectivamente. Así queda demostrado que los extractos metabólicos de *Trichoderma* spp. inhiben la germinación de las esporas de varios géneros de hongos.

**Cuadro 7.** Efecto de la concentración del extracto de *Trichoderma asperellum* T2-31, sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum*, a las 24 horas.

Concentración	Germinación Normal (#)	No Germinado (#)	Total (#)	Germinación de conidios (%)
TESTIGO	38	2	40	95.0A*
25%	33	7	40	82.5AB
75%	31	9	40	77.5AB
50%	28	12	40	70.0BC
100%	22	18	40	55.0C

\*Valores con la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba de medias Tukey al 0.05 de nivel de significancia.

## CONCLUSIONES

1. Las dos especies de *Trichoderma* ensayadas en cultivos duales, poseen actividad antagónica contra *F. oxysporum*.
2. *T. asperellum* T2-31 mostró un mayor efecto de antagonismo.
3. *Trichoderma asperellum* T2-31 produjo enzimas y metabolitos secundarios en fermentación de medio líquido, que tienen la facultad de reducir la capacidad reproductiva de *F. oxysporum*, disminuyendo la esporulación e inhibiendo la germinación de los conidios.
4. Todas las concentraciones de extracto de *Trichoderma asperellum* T2-31, inhiben el crecimiento micelial de *F. oxysporum* en diferentes grados.

## LITERATURA CITADA

- Abeyesinghe, S. 2009. Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* RU01 against *Uromyces appendiculatus* on *Phaseolus vulgaris*. Journal National Science. Foundation Sri Lanka, 3: 203-207.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Ed. Elsevier Academic Press. 5<sup>a</sup> ed. California, EUA, p. 523.
- Ahmad, J. S., and Baker, R. 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. Journal Phytopathology, 77:358-362.
- Ajith, P.S. and Lakshmidivi, N. 2010. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on Bell peppers. Journal of Nature and Science, 8:265-260.
- Aneja, M., Gianfagna, T. J. and Hebbar, P. K. 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology, 67:304–307.
- Anita, S., Ponmurugan, P. and Ganesh Babu, R. 2012. Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of *Phomopsis* canker disease. African Journal of Biotechnology. 11:10350-10357.
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta, M. E., Osada, K. S., García, E. R. y Valenzuela, U. J. G. 2004. Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa. Revista Mexicana de Fitopatología, 22:22-29.
- Aquino, M., Vázquez, G. y Reyes, R. 2007. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología, 26: 127-137.
- Ayodeji, A. A., Adegboyega, O. C. and Maria, A. A. 2009. Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. Journal of Plant Protection Research, 49:302-308.
- Belgrove, A. 2007. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cúbense* using non-pathogenic *F. oxysporum* endophytes. Thesis of Magister Scientiae. Faculty of Natural and Agricultural Science University of Pretoria. Pretoria, Sudafrica, P. 2.

- Bell, D. K., Well, H. D. and Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Journal of Phytopathology*, 73 : 379-382.
- Brotman, Y., Lisec, J., Willmitzer, L., Chet, I. and Viterbo, A. 2010. Analyzing the transcriptome and metabolome of *Arabidopsis* inoculated with *Trichoderma* and the pathogen *Pseudomonas syringae*, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, P. 24
- Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito M., Zeilinger, S. and Kubicek, C.P. 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Journal Current Genetic*, 43:289-295.
- Castro, del A. E. 2011. Interacción de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Sin. *F. moniliforme* Sheld.) en diferentes materiales de maíz y evaluación *in vitro* con *Trichoderma* spp. como biocontrol. Tesis profesional. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México, P.31.
- Cerkauskas, R. 2005. *Fusarium* wilt. AVRDC – The world vegetable center. Shanhua, Taiwan, P. 1.
- Chaverri, P. and Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48. Centraalbureau Boor Schimmelcultures (CBS): Utrecht, P.116.
- Chen, J. and Li, Y. 2010. Construction and function analysis of *Trichoderma* transformant with *Metarhizium* genes against insects, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, P. 27.
- Dashtban, M., Kepka, G. and Qin, W. 2013. Xylitol Production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. *Journal Applied Biochemistry Biotechnology*, 169:554–569.
- Davet, P. 1983. Introduction et conservation des *Trichoderma* dans le sol. In les antagonismes microbiens, 24 eme colloque SFP, Bordeaux, Pp. 26-28, Ed. INR.
- De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín N. L, P. 116.
- Di pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado, J. J. and Roncero, M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of vascular wilt fungus. *Journal Molecular Plant Pathology*, 4:315-325.
- Druzhinina, I. and Kubicek, C. P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University Science*, 6:100-102.

- Druzhinina, I. S., Seidl, S. V., Herrera, E. A., Horwitz, B., Kenerley, C. M., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. and Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Journal Microbiology, Nature Reviews*, 9:749-759.
- Elad, Y. Chet, I. Boyle, P. and Henis, Y. 1982. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Journal Phytopathology*, 73:85-88.
- Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Sid, A. A., Emilia, R. A. y Maria, E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, 26: 35-45.
- Fadel Abed Al-Fattah Abed Al-Aziz Al-Mahareeq. 2005. Biological Control of *Rhizoctonia Solani* and *Sclerotium Rolfsii* by Using Local Isolates of *Trichoderma* Spp. Thesis of Master on Environmental Science. An-Najah National University, Nablus, Palestin, P. 3.
- Fermino, S. A. C., Da Silva, S. C. and Da Silva, G. M. 2009. *Streptomyces* antagonism against *Cladosporium fulvum* Cooke and *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*. *Revista Ciencia Rural, Santa Maria*, 39:1897-1900.
- Fernández, B. y Suárez, M. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 62: 4743-4748.
- Gams W. and Bissett J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*, in: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London, Pp 6-7
- Garcés, de G. E., Orozco, de A. M., Rocío, B. G. y Valencia., H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6:7-25.
- Gruper, S. and Seidl, S. V. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Journal Microbiology*, 158:26-34.
- Guazzone, N., Hill, R., Steyaert, J., Harman, G.E. and Stewart, A. 2010. Distribution of rhizosphere competence within the genus *Trichoderma*, in: *Books of Abstracts, Trichoderma Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture*. Technion, Haifa, Israel, P. 33
- Guigón, L. C., Guerrero, P.V., Vargas, A. F., Carvajal, M. E., Ávila, Q. G.D., Bravo, L. L., Ruocco, M. L., S., Woo, S. y Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28: 87-96.



- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Symposium, the nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp. Journal of Phytopathology, 96: 190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. Nature reviews, *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Journal Microbiology, 2:43-56.
- Hernández, C. F.D., Berlanga, P. A. M., Gallegos, M. G., Cepeda, S. M., Rodríguez, H. R., Castillo, F. 2011<sup>b</sup>. *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6: 410-417.
- Hernández, C. F.D., Castillo, R. F., Hernández, S., Jasso, de R. D., Gallegos, M. G. Rodríguez, H. R., and Aguilar, G. C. N. 2012. Antifungal activity of microencapsulated *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* against soil pathogens on pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings. II International Conference on Antimicrobial Research, P. 544.
- Hernández, C. F.D., Díaz, G. J. D., Hernández, S. M. y Castillo, F. 2011<sup>a</sup>. Micro-encapsulación de *Trichoderma asperellum* y su efecto antagónico sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, en plantas de chile (*Capsicum annum*). XI simposio internacional y VI Congreso Nacional de Agricultura Sostenible, 7:S.N.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Tichoderma* Species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Journal of Plant Disease, 87: 1-10.
- Hung, R., Lee, S. and Bennet, J. W. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. Journal of Fungal Ecology, 6:19-26.
- Inbar, J. and Chet, I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Journal of Microbiology, 141:2823-2829.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente hongos fitopatógenos. Revista Protección Vegetal, 1: 14-21.
- ISTH, 2006. *Hypocrea/Trichoderma* diversity. List of known species described by 2006. International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* taxonomy (Consultado en marzo del 2013).
- Khokhar, M. K., Gupta, R. and Sharma, R. 2012. Biological control of plant pathogens using biotechnological aspects: A Review, 1:277.
- Klein, D. and Eveleigh, D.E.1998. Ecology of *Trichoderma*. in: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London. P.57

- Kubicek, C. P. and Harman, G. E. 1998. Basic *Trichoderma* and *Gliocladium*. biology, taxonomy and genetics. Vol. 1. eds. Taylor & Francis, London, P. 9.
- Kubicek, C.P., Herrera, E. A., Seidl, S. V., Martinez A. D., Druzhinina, S. I., Thon M., Zeilinger, S., Casas, F. S., Horwitz, A. B., Mukherjee, K. P., Mukherjee, M., Kredics L., Alcaraz, D. L., Aerts, A., Zsuzsanna., Atanasova, L., Cervantes, B. M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Coulpier, F., Deshpande, N., Döhren, H. V., Ebbole, D. J., Esquivel, N. E. U., Fekete, E., Flippi, M., Glaser, F., Gómez, R. E. Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández, O. M., Karaffa, L., Kosti, I., Le Crom S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, S. P., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti, R. E. E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo, R. J. A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H. H., Zhang, M., Coutinho, P. M., Kenerley, M. C., Monte, E., Baker, S. E. and Grigoriev V.I. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Journal Genome Biology, 12:40.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. and Bullock, S. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ed. Blackwell Publishing. 1<sup>a</sup> Ed. Iowa. EUA, P. 212.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., and Muthumeenakshi, S. 1998. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs, in: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London, P. 35
- Mach, L.R., Peterbauer, K. C., Payer K., Jaksits, S., Sheridan., Woo., Zeilinger, S., Kullnig C. M., Lorito, M. and Kubicek, C. P. 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. Journal Applied and Environmental Microbiology. 65:1858-1863.
- Macías, V. L. M., Gonzales, G. E., Serrano, G. C., Galindo, R. M. A., Maciel, P. L. H. y Robles, E. F. J. 2010. Nueva tecnología de manejo para el control de la marchitez del chile en Aguascalientes. Publicación especial No 38. CIRNE. Campo Experimental Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México.
- Malmierca, M. G., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Hermosa, R., Monte, E. and Gutiérrez, S. Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. Journal Applied and Environmental Microbiology, 78:4856–4868.
- Michel, A., Otero, S., Rebolledo, D. y Lezama, G. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentil- $\alpha$ -pirona de *Trichoderma* spp., sobre especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología, 22: 14-21.
- Michel, A., Otero, S., Rebolledo, D., Lezama, G. y Ochoa, M. M. E. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* in vitro. Revista Chapingo, 11:273-278.

- Michielse, C. B. and Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Journal Molecular Plant Pathology, 10:311-24.
- Mohiddin, F.A., Khan, M.R., Khan, S.M., Bhat, B.H. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. Journal Plant Pathology, 9: 92-102.
- Mukherjee, P. K. and Kenerley, C. M. 2010. Secondary metabolism and its regulation in *Trichoderma virens*, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, P. 15
- Mukherjee, P.K., Nautiyal, C.S. and Mukhopadhyay, A.N. 2008. Molecular mechanisms of biocontrol by *Trichoderma* spp. in: Nautiyal, C.S. and Dion, P. 2008. Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Ed. Springer. Québec, Canada, P. 250
- Odum, P.E. y Barret, W. G. 2008. Fundamentos de ecología. Ed. Cengage learning. 5ª. Ed. México D.F. México, P. 283.
- Orietta, F. y Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Revista Manejo Integrado de Plagas, 62:96-100.
- Osorio, H. E., Hernandez, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodriguez, H. R. y Castillo, R. F. 2011. *In vitro* Behavior of *Trichoderma* spp. Against *Phytophthora capsici* Leonian. African Journal of Agricultural Research, 6:4594-4600.
- Pal, K. K. and B. McSpadden Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, 10:1094.
- Paredes, J. E. Paredes, E. J. E., Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Allende, M. R., Sañudo, B. J. A. y Valdez, T. B. 2008. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 27: 27-35.
- Perveen, K. Bokhari, N. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. African Journal of Microbiology Research, 6:3348-3353.
- Prasad, A. S., Varatharaju, G., Anushri, C. and Dhivyasree1, S. 2013. Biosorption of Lead by *Pleurotus florida* and *Trichoderma viride*. Journal British Biotechnology, 3:66-78.
- Quiroz, S. V. F., Ferrera, C. R., Alarcon, A., Lara, H. M. E. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Fitopatología, 26:27-34.
- Ramos, H. M. M. 2008. Efecto antagonico *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum*. Tesis profesional. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. P.28.

- Reshu and Mohd, M. K. 2012. Role of different microbial-origin bioactive antifungal compounds against *Alternaria* spp. causing leaf blight of mustard. *Plant Pathology Journal*, 11:1-9.
- Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Journal Phytopathology*, 96:195-206.
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F. and McCray, E.B. 2013. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. (Revisado en Febrero del 2013).
- SAS System Copyright. 2002. Version 9.1 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. All Rights Reserved.
- Scarselletti, R., and Faull, J.L. 1994. *In vitro* activity of 6- Pentil- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research*, 98:1207-1209.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac I., Scala, F., Harman G. E. and Kubicek C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against Phytopathogenic Fungi. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 60:4364-4370.
- Sharfuddin, C. and Mohanka, R. *In vitro* antagonism of indigenous *Trichoderma* isolates against phytopathogen causing wilt of lentil. 2012. *International Journal of Life Science & Pharma Research*, 2:195-202.
- Sharma, V., Bhandari, P., Singh, B., Bhattacharya, A. and Shanmugan, V. 2010. Fusaric acid detoxification and chitinase expression in an antagonistic *Trichoderma harzianum* S17TH, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, P. 18
- SIAP 2011. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. México.
- Singh, G., Nema, R., Khare, S., Singh, D., Jain, P., Pradhan A., and Gupta A. 2012. Tolerance and biodegradation capacity of *Trichoderma viride* with special reference to heavy metals (Cr, Cd). *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2:1007-1014.
- Singh, T., Saikia, R., and Arora, D. 2005. Partial purification of lectin from mycoparasitic species of *Trichoderma*. *Journal Plant Pathology*, 21:301-309.
- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti E.L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*, in: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London, P. 141

- SNITT, 2003. Caracterización e identificación de las demandas de investigación y transferencia de tecnología del sistema producto chile verde. Sistema nacional de investigación y transferencia tecnológica para el desarrollo rural sustentable. B. C. S. México, P.19.
- Spiegel and Sharon, E. 2010. *Trichoderma* as a biocontrol agent against plant-parasitic nematodes: Veni, vidi...vici?, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, P. 26
- Sriram, S., Savitha, M.J., Rajeshwari, R., and Ramanujam, B. 2010. Comparison of solid state and liquid fermentation derived formulations of *Trichoderma harzianum* with special reference to shelf-life, in: Books of Abstracts, *Trichoderma* Molecular Mechanisms and Applications of Biocontrol in Agriculture. Technion, Haifa, Israel, P. 61
- Stefanova, M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad Agronomía Luz, 16:509-516.
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., y Heydrich, M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Revista Protección Vegetal, 22: 41-46.
- Ubalua, A. O. and Oti, E. 2007. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. African Journal of Biotechnology, 6: 2447-2450.
- Velásquez, V.R. y Medina, M.M.M. 2003. La pudrición de la raíz del chile (*Capsicum annum* L.) en el norte centro de México. I. estudios básicos. Folleto para productores No 14. Campo Experimental Calera-INIFAP-SAGARPA-CIRNE.
- Velásquez, V.R., Medina, M.M.M. y Luna, R.J. de J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annum* L.) en el Norte-Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología, 19: 175- 181.
- Velásquez, V.R., Medina, M.M.M. y Mena, C. J. 2002. Guía para identificar y manejar las principales enfermedades parasitarias del chile en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para productores No 20. Campo Experimental Calera-INIFAP-SAGARPA-CIRNE.
- Velásquez, V.R., Rincón, V.F., y López, F.L.C.2000. Guía para controlar la pudrición de la raíz del chile en Zacatecas y Aguascalientes. Folleto para productores No 25. Campo Experimental Calera-INIFAP-SAGARPA-CIRNE.
- Vera, D. F., Pérez, H. y Valencia, H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera de arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta Biológica Colombiana, 7: 33-40.

- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., and Sivasithamparam K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Journal compilation, The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology, 43:143–148.
- Viterbo, A., Montero M., Ramot O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A. and Chet, I. 2002. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). Journal Current Genetics, 42:114-122.
- Weir, L. E. H. y Gil, W. K. 1999. Competencia interespecífica entre *Penicillium citrinum* y *Fusarium oxysporum* en medio de agar con dextrosa. Centro de Investigaciones Biológicas, 3:83-92.
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Journal Phytopathology, 96:181-185.

## APENDICE

**Cuadro 1A.** Análisis de varianza para evaluar el antagonismo de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum* en cultivos duales.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	2	16852.07796	8426.03898	139.99	<.0001
ERROR	9	541.70184	60.18909		
TOTAL	11	17393.77980			

C.V. = 14.89 %

**Cuadro 2A.** Radios de crecimiento del patógeno y radios de crecimiento de antagonistas (cm), correspondientes a cultivos duales evaluados a los 14 días de incubación.

Repetición	<i>Trichoderma asperellum</i> T2-31	<i>F. oxysporum</i>	<i>Trichoderma</i> sp. T2-11	<i>F. oxysporum</i>	Testigo <i>F. oxysporum</i>
R1	3.3	1.1	3.9	1.8	6.2
R2	4.5	0	4.2	1.1	6.4
R3	4.8	1.2	3	2.1	6.3
R4	4.1	1.1	2.8	2.6	6.3

**Cuadro 3A.** Análisis de varianza para medir el efecto del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la viabilidad de conidios de *F. oxysporum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	4	3530.0	882.5	9.81	<0.0004
ERROR	15	1350.0	90.0		
TOTAL	19	4880.0			

C.V. = 12.48 %

**Cuadro 4A.** Análisis de varianza para medir efecto del extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre la conidiogénesis de *F. oxysporum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	4	8.4934269E14	2.1233567E14	1.77	0.1866
ERROR	15	1.7955314E15	1.1970209E14		
TOTAL	19	2.6448741E15			

C.V. = 58.01469%

**Cuadro 5A.** Análisis de varianza para evaluar el extracto metabólico de *T. asperellum* T2-31 sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	4	2112.994297	528.248574	58.66	<.0001
ERROR	15	135.069149			
TOTAL	19	2248.063446			

C.V. = 16.26 %



**Cuadro 5A.** Crecimiento diario acumulado de *F. oxysporum* tratado con extracto de *T. aspellum* T2-31, respecto a las concentraciones.

<b>Concentración</b>					
<b>Día</b>	25%	50%	75%	100%	Testigo
<b>Crecimiento (cm)*</b>					
1	0	0	0	0	0
2	1.175	1	0.7	0.55	1.225
3	1.4	1.15	0.975	0.825	1.65
4	1.45	1.3	1.225	0.83	2.125
5	1.6	1.4	1.3	0.85	2.35
6	1.975	1.825	1.425	0.95	2.425
7	2.225	2.2	1.975	1.5	2.7
8	2.475	2.575	2.175	1.85	2.825
9	2.75	2.625	2.25	2	3.525
10	3	2.9	2.4	2.225	4.4
11	3.2	2.9	2.4	2.225	5.125
12	3.775	3.75	3.275	3	5.775
13	4.475	4.45	4.025	3.775	6.2
14	5.45	5.275	4.775	4.45	7.1
15	6.175	6.05	5.525	5.25	7.475

\*Media del crecimiento micelial diario experimental (Cuatro repeticiones)