



*Por un desarrollo agrario
integral y sostenible*

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Maestría en Sanidad Vegetal

Trabajo de Tesis

**Caracterización de aislados nativos de
Trichoderma spp para el control de hongos de
suelo, Olancho Honduras, 2019**

Autor

Ing. Porfirio Bismar Hernández

Asesor

Dr. Arnulfo José Monzón Centeno

Managua, Nicaragua

Abril, 2022



Por un desarrollo agrario
integral y sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría Sanidad Vegetal

Trabajo de Tesis

Caracterización de aislados nativos de *Trichoderma* spp para el control de hongos de suelo, Olancho Honduras, 2019

Autor

Ing. Porfirio Bismar Hernández

Asesor

Dr. Arnulfo José Monzón Centeno

Presentado a la consideración del Honorable comité
evaluador como requisito final para optar al grado de:

Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal

Managua, Nicaragua

Abril, 2022

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Agronomía, como requisito parcial para optar al título profesional de:

Maestro en ciencias en sanidad vegetal

Miembros del Comité evaluador

Ing. MSc. María del Rosario Chavarría Sánchez
Presidente

Ing. MSc. Markelyn Rodríguez Zamora
Secretario

Lic. MSc. Isaias Sánchez Gómez
Vocal

Lugar y fecha: Managua, Nicaragua; 28 de abril de 2022

DEDICATORIA

A DIOS todo poderoso por darnos el privilegio de vivir, y encaminarme en cada momento brindándome sabiduría y fortaleza, siendo la luz que ilumina mi camino, de esta forma logre cumplir mi meta. ¡Gracias DIOS!

A mis padres Ana María Hernández y German Ávila, que me han apoyado siempre, y mis demás familiares que me brindaron mucho cariño y consejos sabios, ofreciéndome todo el apoyo económico y moral y su gran deseo de superación para mí, siempre estarán en mi corazón.

A mis hermanos por ser impulsores y motivadores en todo el recorrido en esta lucha que ya ha terminado.

A mi hija Eliza María Hernández Cerrato Wendy María Hernández Cerrato y Bismarck María Hernández Cerrato por ser la fuente de inspiración y gran motivo de superación y salir adelante para ofrecerles un mejor futuro.

A mi esposa Wendy Elizabeth Cerrato Altamirano por acompañarnos siempre en todo momento, brindándonos su apoyo incondicional aceptándome tal cual soy.

A todos nuestros amigos y demás familia que han estado con nosotros y nos han acompañado por este arduo y largo camino que emprendí.

AGRADECIMIENTO

A DIOS gracias por ser mi fortaleza y darme la oportunidad de culminar esta meta y estar conmigo en los momentos que más lo necesite.

A mis padres por apoyarnos en las buenas y en las malas por su amor, su comprensión y por el gran sacrificio que realizaron para que cumpliera cada una de las metas que me he trazado en mi vida. son los mejores padres del mundo.

A mis hermanos, por apoyarnos, comprendernos, querernos y contribuir de la mejor manera para nuestra formación profesional, los queremos mucho.

A mi esposa, por todo el amor y cada palabra que me ha dado fuerza para seguir siempre adelante.

A mi asesor Dr. Arnulfo Monzón por tener siempre la disponibilidad de apoyarme con mi investigación, y ser una motivación para terminar con este proyecto de vida para mí y mi familia.

Ing. Porfirio Bismar Hernández

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Generalidades del cultivo de tomate	4
3.2. Enfermedades en el Cultivo del tomate	4
3.2.1 Mal del talluelo (<i>Damping off</i>)	4
3.3 Medidas de manejo	5
3.3.1 Control cultural	5
3.3.2 Control biológico	6
3.4 <i>Trichoderma</i> spp	7
3.5 Compatibilidad de <i>Trichoderma</i> con productos agroquímicos	12
IV. METODOLOGIA	14
4.1 Ubicación del experimento	14
4.2 Descripción del experimento	14
4.3. Colecta de muestras de suelo	14
4.4 Procesamiento de muestras de suelo	14
4.5 Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp	15
4.6 Caracterización de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp	15
4.6.1 Evaluación macroscópica de <i>Trichoderma</i> spp	15
4.6.2 Caracterización morfométrica de <i>Trichoderma</i> spp.	15
4.6.3 Ritmo de crecimiento	16
4.6.4 Competencia y antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium</i> sp.	16
4.6.5 Evaluación de <i>Trichoderma</i> spp sobre mal del talluelo en tomate en invernadero	17
4.7 Variables de estudio	19

4.8. Análisis de los datos	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1 Obtención de Aislamientos	20
5.2. Características macroscópicas de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp	20
5.3 Caracterización morfométrica de aislados de <i>Trichoderma</i> spp	22
5.3.1. Descripción de las estructuras reproductivas de <i>Trichoderma</i> spp	22
5.4. Ritmo de crecimiento	23
5.5 Competencia y Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium</i> sp	26
5.6. Grados de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium</i> spp	29
5.7. Porcentaje de incidencia de mal de talluelo en tomate	29
VI. CONCLUSIONES	31
VII. RECOMENDACIONES	32
VIII. LITERATURA CITADA	33
IX. ANEXOS	38

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Escala para evaluación del antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp	17
2. Aislados obtenidos e información sobre el origen de las muestras	20
3. Características macroscópicas de colonias de <i>Trichoderma</i> spp	21
4. Caracterización morfológica de aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp en PDA	23
5. Crecimiento radial (mm día ⁻¹) de <i>Trichoderma</i> sp en PDA y en SDA a las 60 horas después de la inoculación	24
6. Crecimiento radial (mm día ⁻¹) de <i>Trichoderma</i> sp en PDA en diferentes momentos después de la inoculación	25
7. Crecimiento radial (mm día ⁻¹) de <i>Trichoderma</i> sp en SDA en diferentes momentos de evaluación	26
8. Radio de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp y <i>Fusarium</i> spp en pruebas de competencia	27

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Crecimiento de testigo de <i>Trichoderma</i> spp	28
2. Crecimiento de testigo de <i>Fusarium</i> spp	28
3. Niveles de parasitismo de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Fusarium</i> spp	29
4. Porcentaje de incidencia de mal de talluelo en cultivo de tomate	30

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Esquema de medición del radio de crecimiento de aislados de <i>Trichoderma</i> spp	38
2. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en PDA a las 12 horas después de la inoculación	38
3. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en PDA a las 24 horas después de la inoculación	38
4. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en PDA a las 36 horas después de la inoculación	39
5. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en PDA a las 48 horas después de la inoculación	39
6. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en PDA a las 60 horas después de la inoculación	39
7. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en SDA a las 12 horas después de la inoculación	39
8. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en SDA a las 24 horas después de la inoculación	40
9. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en SDA a las 36 horas después de la inoculación	40
10. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en SDA a las 48 horas después de la inoculación	40
11. Análisis de varianza del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp en SDA a las 60 horas después de la inoculación	40
12. Análisis de varianza y separación de medias del efecto de <i>Trichoderma</i> spp sobre el mal de talluelo	41

RESUMEN

Los agentes causales del mal de talluelo representan una amenaza para los cultivos, principalmente las hortalizas, por lo que su manejo es fundamental para la producción exitosa de estos cultivos. Tradicionalmente se manejan con fungicidas, pero también existe evidencia de control a través de biocontroladores; por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar y seleccionar aislados nativos de *Trichoderma* spp, promisorios para el control de hongos fitopatógenos. Se colectaron muestras de suelo en las diferentes secciones de la Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas Olancho Honduras, de las que se seleccionaron 10 aislados de *Trichoderma* spp los cuales fueron incluidos en el estudio. Los aislados obtenidos fueron caracterizados morfométricamente, se evaluó el ritmo de crecimiento radial, se evaluó la competencia y antagonismo de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp en cultivo dual y se evaluó la eficacia de los aislados en el control de mal de talluelo en plántulas de tomate en invernadero. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y pruebas de Tukey. La caracterización macroscópica incluyó aspectos como tipo de crecimiento, producción de burbujas, consistencia de las colonias. En las evaluaciones de ritmo de crecimiento se encontró que los aislados F3M2, F1M2 presentan un crecimiento acelerado de 12 a 48 horas llegando a su crecimiento óptimo de 35 mm en cultivo de Papa Dextrosa Agar en medio de Sabouraud Dextrosa agar los aislados que presentaron un crecimiento acelerado fue F1M2, F4M3 alcanzando un crecimiento de 32 mm en su radio de crecimiento en la evaluación se logró observar que el tiempo de crecimiento de los aislados fue de 24 a 48 horas. En cuanto a la caracterización morfométrica de los aislados se obtuvo que las conidias presentaron dimensiones de 2.6 y 2.8 μm de largo y 1.8 a 3 μm de ancho, los conidióforos presentan una medición de 96 a 118 μm de largo y las fiálides con 4 a 4.5 μm de largo y 2.3 a 2.5 μm de ancho formando grupos de 2 a 3 fiálides; para el grado de parasitismo el aislado F4M3 presenta el mejor grado alcanzando el 100% los aislados F2M1 y F5M1 presentaron grado 2 cubriendo el 75% del fitopatógeno. Los aislados F4M3 F3M2 presentaron la menor incidencia de mal de talluelo en las plántulas de tomate.

Palabras clave: Antagonista, micoparasitismo, conidio.

ABSTRACT

The contribution of this research work leads us to demonstrate different control alternatives using entomopathogenic fungi such as *Trichoderma* spp for the control of phytopathogenic fungi. It was possible to evaluate 10 different isolates of *Trichoderma* spp from the Catacamas Olancho Honduras area in the different sections of the National University of Agriculture and they were transferred to the phytopathology laboratory to be subjected to studies. The samples extracted from the different sections were subjected to different processes such as serial solutions to then be sown in potato dextrose agar (PDA) culture medium, once sown, their identification began in terms of their characteristic coloration from dark green to pale green. were extracted and seeded in a medium to obtain pure cultures. Among the evaluations that were carried out in this research are the macroscopic and microscopic characterization, radial growth rate, competition and antagonism of *Trichoderma* spp on *fusarium* sp in dual culture and an experiment was carried out under a greenhouse to see the efficacy of the isolates in the control of stem disease in tomato seedlings. Very relevant data were obtained which were analyzed by analysis of variance and subjected to tukey tests. For the evaluation of 10 native isolates were obtained from farms of the National University of Agriculture in which they were coded in F is the farm from where it was extracted M is the sample number where the isolate was found. In the macroscopic evaluation, different aspects were evaluated, finding aspects of *Trichoderma* spp of different circular growths and bubble production and with a consistency of dusty ones, in the growth rate evaluations it was found that the isolates F3M2, F1M2 present an accelerated growth of 12 after 48 hours reaching its optimal growth of 35 mm in potato dextrose agar culture in Sabouraud Dextrose agar medium, the isolates that presented an accelerated growth were F1M2, F4M3 reaching a growth of 32 mm in its growth radius in the evaluation was achieved observe that the growth time of the isolates was 24 to 48 hours. In the morphometric characterization of the isolates, they were measured obtaining that the conidia have a measurement of 2.6 and 2.8 μm in length and 1.8 to 3 μm in width, the conidiophores have a measurement of 96 to 118 μm in length and the phialides with a measurement of 4 to 4.5 μm long and 2.3 to 2.5 μm wide, forming groups of 2 to 3 phialides for the degree of parasitism after measuring the growth radii, the isolate F4M3 presents the best grade reaching 100%, the isolates F2M1 and F5M1 presented grade 2 covering 75 % of the phytopathogen in terms of the incidence% test, the isolates F4M3 F3M2 are the ones that present the best in terms of the incidence percentages of stem disease in tomato seedlings.

Key words: Antagonist, mycoparasitism, conidio

I. INTRODUCCION

El tomate (*Solanum lycopersicum* L. o *Lycopersicon esculentum* Mill) es la hortaliza más cultivada en el mundo con 4.7 millones de hectáreas y una producción de 164 millones de toneladas en el año 2013. En la última década se ha incrementado la superficie en un 11 % y la producción en 28 %, evidenciando mejora del rendimiento promedio. Esta alza gradual coincide con un aumento en la demanda mundial de tomate, debido en parte al crecimiento en 12 % de la población entre 2004 y 2011 y al aumento del consumo en 13 % en el período, alcanzando 55 g por persona al día en el 2011. Los principales países productores son China, India y Estados Unidos, con el 31%, 11 % y el 8 % de la producción mundial, respectivamente FHIA (2018).

El tomate es la hortaliza que más se siembra y consume en el ámbito nacional. Se caracteriza por ser un cultivo intensivo, realizado durante todo el año por pequeños y medianos productores. En el periodo 2015-2016 se registraron 1014 productores, con un área de siembra de 1171,9 ha y una producción de 69 040,45 t López y Quirós (2016).

El mal del talluelo es una enfermedad ocasionada por un complejo de hongos del suelo tales como *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp, y *Fusarium* spp. Estos patógenos, son habitantes naturales del suelo. Atacan las plantas en sus primeras etapas de desarrollo. Las plantas son afectadas cuando el tallo aún no ha lignificado o sea que todavía no tiene corteza dura ni tallo verdadero, esto sucede en semilleros y en el campo, desde la germinación o trasplante hasta los 15-20 días después (González *et al.*, 2005).

El hongo presenta hospedantes alternativos entre las Solanáceas y malezas de la misma familia botánica. Sobrevive en el suelo, en rastrojos y en la semilla. El patógeno penetra directamente por la cutícula y a través de heridas. La propagación se realiza a través de corrientes de aire, agua de riego, herramientas o ropa de los operarios de campo cuando realizan las labores culturales, insectos y por salpicaduras de agua. El rango de temperatura óptimo para desarrollo de la enfermedad es de 24 a 29 °C y que exista la presencia de una película de agua en la hoja por 24 horas. Los síntomas o predisposición a la enfermedad de agravan en deficiencia de nitrógeno y ataque de nematodos (Brenes y Gamboa, 2015).

La enfermedad puede aparecer en las plántulas en las bandejas o en macetas individuales. Sus agentes causales son un complejo de hongos como: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. y *Phytophthora* spp (FAO, 2003).

Según Sánchez (2012), el mal del talluelo se disemina por el viento, el agua (salpique por lluvia, riego por aspersión o escorrentías), organismos pequeños como insectos y ácaros, y a través del movimiento de la gente, maquinaria o animales.

Las condiciones favorables para que la enfermedad aparezca son climas cálidos, y en suelos cálidos y arenosos de las regiones templadas. Cuando las plantas son infectadas en la etapa de plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso de que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno (Agrios, 2009)

Para lograr un control efectivo del mal del talluelo se debe proteger el cuello de las plántulas durante toda la fase de vivero o semillero y después del trasplante con un fungicida de contacto aplicado al pie de la planta. Se debe procurar que el fungicida cubra el cuello de la plántula y el suelo alrededor de la base del tallo (Picardo F. y Oliva F. 2012). El manejo preventivo mediante el uso del control biológico con *Trichoderma* es una alternativa importante para el control de diferentes patógenos tales como *Fusarium oxysporum*, ya que una vez se hayan manifestado los síntomas de esta enfermedad ni el control químico es eficiente (González *et al.*, 2005).

Trichoderma spp es un hongo que se encuentra frecuentemente sobre tejidos vegetales en descomposición. Es un organismo dominante en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con otros microorganismos (Rosero, 2008). Además, *Trichoderma* spp tiene la capacidad de parasitar a otros hongos lo que se conoce como hiperparasitismo o micoparasitismo (Rosero, 2008).

La baja eficacia de productos químicos para el control del mal del talluelo promueve la búsqueda de otras alternativas como el control biológico. Una respuesta positiva es la utilización de microorganismos antagónicos competitivos para proteger los cultivos, de los patógenos del suelo; en particular especies del género *Trichoderma* spp han merecido la atención máxima como agente de biocontrol (Rosero, 2008). Por lo anterior, este trabajo tiene el propósito de caracterizar aislados nativos de *Trichoderma* spp y evaluar su potencial como agentes de control de hongos fitopatógenos causantes del mal del talluelo.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterización de aislados nativos de *Trichoderma* spp para el control de hongos de suelo Olancho Honduras 2019

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfométricamente aislados nativos de *Trichoderma* spp, como potenciales agentes de control biológico de hongos causantes del mal del tallueló en tomate.
- Determinar el grado de micoparasitismo mediante competencia de aislados nativos de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* spp en condiciones de laboratorio.
- Seleccionar cepas de *Trichoderma* spp promisorias para el control de patógenos fungosos causantes del mal del talluelo en tomate.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Generalidades del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más consumidas en el mundo, su producción en el año 2014 fue de 170.750.767 t (FAOSTAT, 2014). Se cultiva en más de 100 países para consumo fresco e industrial; el 76% de la producción, se concentra en China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México (FAOSTAT, 2014).

3.2. Enfermedades en el Cultivo del tomate

El cultivo de tomate es afectado por enfermedades, fungosas, bacterianas y virales. Durante la época de lluvias, es necesario hacer aplicaciones de fungidas y bactericidas frecuentemente, para evitar la diseminación rápida de las enfermedades en el cultivo; por regla general se recomienda que las plantas vengan protegidas desde el semillero y cuando estas son puestas en el terreno definitivo, la aplicación de fungidas para el control del mal del talluelo es indispensable, ya que *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Sclerotium* sp. y *Rhizoctonia* sp., son el grupo principal de hongos que afectan esta etapa y están presentes en la mayoría de nuestros suelos (Monardes, 2009).

3.2.1 Mal del talluelo (*Damping off*)

El Mal de talluelo es una de las principales enfermedades que ocurre en la etapa de almácigo, pudiendo atacar a las semillas durante la germinación, a las plántulas (pre y/o post-emergencia), y plántulas después del trasplante. Las plantas recién emergidas son más sensibles, pero a medida que estas crecen, la cutícula se engrosa adquiriendo mayor resistencia al ataque del complejo de patógenos de suelo que causan esta enfermedad. La enfermedad puede aparecer en las plántulas en las bandejas o en macetas individuales. Sus agentes causales son un complejo de hongos como: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. y *Phytophthora* spp (FAO, 2003).

El mal del talluelo se manifiesta como lesiones necróticas profundas de coloración parda oscura, de aspecto acuoso o secas en el cuello a nivel del suelo, con la peculiaridad que el síntoma progresa hacia abajo comprometiendo la radícula de la plántula. Por la interrupción del sistema vascular la plántula vuelca repentinamente doblándose hacia la zona lesionada. Esta enfermedad se distribuye en forma de parches. La enfermedad es causada por un

complejo de hongos con amplio rango de hospedantes que sobreviven en el suelo. Pueden colonizar la mayoría de los sustratos orgánicos del suelo como rastrojos. La enfermedad se disemina a través de corrientes de aire y de salpicaduras de agua (FAO, 2003).

Según Sánchez (2012), el mal del talluelo se disemina por el viento, el agua (salpique por lluvia, riego por aspersión o escorrentías), organismos pequeños como insectos y ácaros, y a través del movimiento de la gente, maquinaria o animales.

Se necesitan condiciones relativamente húmedas para que esta enfermedad ataque a las plantas. La temperatura no juega un papel tan crucial, ya que puede aparecer en climas cálidos o frescos. El patógeno que infectará depende de la temperatura. Por ejemplo, *Pythium* se desarrolla en suelos cálidos y mojados. Por el contrario, *Thelaviopsis* prefiere suelos fríos. Finalmente, *Rhizoctonia* puede desarrollarse tanto en suelos fríos como cálidos. Esta enfermedad se puede dar tanto en campo (siembra directa) como en semilleros. Las estructuras reproductivas de estos patógenos pueden permanecer en el suelo por varios ciclos o en materia orgánica (Seminis, 2005).

3.3 Medidas de manejo

Plantar las semillas en semillero o campo cuando las condiciones son óptimas para su desarrollo. Esto dependerá de la especie de planta, además se debe cuidar los niveles de humedad en el semillero o en campo, ya que esta enfermedad se propicia por suelos húmedos. Se debe utilizar semilla de alta calidad y sana, ya que tendrá más vigor y uniformidad procurar que el drenaje en la parcela sea el adecuado (Sánchez, 2012).

3.3.1 Control cultural

Desinfectar el suelo o sustrato de siembra antes de llenar las bolsas, utilizando agua hirviendo. Se extiende el suelo en un piso impermeable y se le aplica agua caliente lo suficiente para que quede bien mojado, se cubre con un plástico y se deja enfriar. También se puede utilizar ceniza o cal, en dosis de una libra de cal o tres libras de ceniza por metro cuadrado. Una vez aplicada, se revuelve la cal o la ceniza al suelo o sustrato y se hace el banco de germinación. También se puede utilizar solarización. Se pica el suelo y se dispersa, formando un banco de 10 o 20 centímetros de alto, y se cubre con un plástico negro durante dos meses, es útil cuando el banco de germinación es pequeño (Dimas, 2009).

3.3.2 Control biológico.

El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. Este control debe mantenerse en el marco de un manejo integrado de plagas (MIP). El manejo integrado de plagas consiste en la toma de decisiones para seleccionar y utilizar tácticas de control de manera coordinadas con estrategias de manejo y análisis de costos/beneficio para evaluar el impacto en el ámbito productivo, así como social y ambiental. El control biológico aparece entonces como una posible estrategia sostenible de control que considera factores sociales, de producción y ecológicos (Carreón, 2007).

El uso de microorganismos para el control de fitopatógenos que atacan en el suelo, , en un principio recibió más atención que los que atacan parte aérea (foliares y florales). Esto se debió a la falta de variedades resistentes a patógenos, escasos productos químicos efectivos, alto costo de tratamiento químico en campo, dificultad de proteger con el químico alrededor de la infección, facilidad de usar agentes de biocontrol inoculando a la semilla y la gran información de la ecología de patógenos del suelo comparado con la de las partes aéreas (Wilson y Backman, 1998).

Entre los patógenos estudiados en sistemas que involucran patógenos del suelo, , se ha evaluado con éxito a: *Trichoderma*, *Gliocladia*, *Penicillium*, *Pseudomona*, *Bacillus*, *Pythium*, *Laetisaria*, *Spodidesmium*, *Coniothyum*, *Verticillium* y *Talaromyces* (Nelson, 1991).

Básicamente hay tres tipos de control biológico: Conservativo, Clásico y Aumentativo. El control biológico conservativo establece prácticas y estrategias para mejorar el establecimiento y la proliferación de organismos benéficos propios del lugar, limitando el uso de prácticas que los desfavorezcan e implementando aquellas estrategias que los favorezcan. El control biológico clásico se refiere a la importación al sitio requerido, de agentes de control biológico (ACB) específicos para el combate de un agente exótico que se presenta como plaga; esta necesidad surge a raíz de la ausencia de ACB para una plaga introducida que no cuenta *in situ*, con sus propios controladores y el control biológico aumentativo consiste en incrementar la población de enemigos naturales mediante crías en laboratorio, para luego liberarlos en gran cantidad varias veces al año (Corbana, 2010).

Los microorganismos (hongos o bacterias) empleados en el biocontrol de fitopatógenos son generalmente aislados a partir del suelo o de la planta. Sin embargo, no todos los aislamientos presentan características óptimas para ser usados en biocontrol. De manera general, la estrategia utilizada para el aislamiento de cepas con potencial para control biológico es la recolección de muestras de plantas sanas (raíces, tallo u hojas) provenientes de campos infectados con el fitopatógeno que se desea controlar. La lógica de esta estrategia reside en que aquellas plantas que resisten en cierta medida el ataque de la enfermedad en un campo donde la productividad se vio sensiblemente disminuida pueden deber su resistencia a la presencia de microorganismos antagonistas de la misma (Serrano, 2007).

Dada la insostenibilidad a consecuencia de los altos costos económicos, ecológicos y sociales provocados por el uso de fungicidas en el control fitosanitario, se hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos endógenos con calidad y cantidad suficiente para su aplicación en áreas de cultivo. Dado lo anterior, el control biológico surge en respuesta como nuevas tecnologías para el control y manejo de plagas y enfermedades; entre los agentes más importantes para el control de hongos fitopatógenos se encuentran los hongos del género *Trichoderma*, que son capaces de controlar un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola (Amaro, 2015).

3.4 *Trichoderma* spp

Trichoderma spp ha sido ampliamente estudiado; es un hongo anaerobio facultativo microscópico, que se encuentra de manera natural en muchos suelos agrícolas y otros tipos de medios. Integran el género más de 30 especies ampliamente distribuidas en el mundo, en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos, principalmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente (FIA, 2008).

Trichoderma rifai como un controlador biológico y antagonista natural de fitopatógenos muestra una amplia gama de hospedantes y dentro de ellos están los hongos fitopatógenos de importancia, tales como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F Smith) Snyder y Hans, *Fusarium roseum* Link, *Botrytis cinerea* Pers, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp. *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp, entre otros (Cervantes, 2007).

La Taxonomía de este género es complicada. En 1794, Persoon describió el género *Trichoderma* y aún en la actualidad se continúa profundizando en este aspecto. Según Villegas, el género *Trichoderma* se ubica en la clase Hyphomycetes, orden Moniliales, familia: Moniliaceae. Su fase sexual (estado Teleomorfo) se encuentra ubicado en la clase Ascomycetes, serie Pyrenomycetes, orden Hypocreales, género *Hypocrea*. Las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual (Villegas M. 2005).

De acuerdo con Kuhls *et al.* (1997), Lieckfeldt *et al.* (1999), Samuels y Chaverri (2003), Samuels (2005) y Jaklitsch *et al.* (2006), el género *Trichoderma* pertenece a la familia Hypocreaceae. Orden Hypocreales, Clase Euascomycetes, Sub división Ascomycotina, División Eumycota y Reino Mycetozoa (Fungi).

Determinar cuántas especies hay realmente, dependerá de la definición de la especie, si se considera que la mayoría de las especies del género *Trichoderma*, representan especies de *Trichoderma* spp, habrá más de 100 especies (Samuels, GJ. 1996); sin embargo, al utilizar técnicas moleculares la frontera morfológica que define las especies con análisis ribosomal del ADN desaparecerá muchas de ellas y quedarán un pequeño número de especies reales que formen el género (Kuhls y Lieckfeldt, 1997).

Con la taxonomía establecida sobre caracteres morfológicos no se diferencian satisfactoriamente las especies en el género. En la actualidad el desarrollo de técnicas moleculares resulta decisivo en la identificación y clasificación de los organismos. En este sentido se utiliza la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específica de las regiones ITS1 e ITS2 y del factor de elongación, así como la secuenciación de estas para su comparación con las secuencias depositadas en GenBank TrichoBlast y en otras bases de datos, lo que facilita la identificación del aislamiento (Druzhinina, y Kopchinskii, 2006).

El género *Trichoderma* spp en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, filiales simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de rápido desarrollo en medios sintéticos. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, las que son unicelulares, pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género

en el suelo bajo condiciones adversas. El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10 μm de ancho (Harman, 2001).

Para depurar ambigüedades taxonómicas que aún persisten, se propusieron claves adicionales que condujeron a la redefinición de la especie *T. harzianum* y de su neotipo y la neotipificación de *T. koningii*. En la actualidad, la taxonomía basada en caracteres morfológicos no permite una identificación adecuada de las especies del género. Es por ello que la introducción de técnicas moleculares tiene una función decisiva en la identificación y clasificación de las especies de *Trichoderma*. El uso de estas herramientas por Samuels et al. en 1999 trajo como consecuencia la nueva caracterización de *T. viride* y la descripción de *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y, en 2010, de *T. asperelloides* Samuels como nueva especie (Samuels G, Ismaniel A, Bon M, 2010).

Trichoderma es un hongo anaeróbico, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas, así, por ejemplo, McBeath, J. y Adelman, M. (1991), aislaron una cepa en suelo de Alaska, con crecimiento a 4 °C y que toleró hasta 33 °C. La relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma* spp al parecer depende de la especie y del propio aislamiento.

Se conoce que *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* Hammill toleran de 40 a 41 °C, las especies *T. koningii* y *T. hamatum* 35 °C y *T. viride* y *T. polysporum* 31 °C, mientras *T. harzianum* hasta 38 °C. Para esta última, en algunos aislamientos la temperatura óptima para el crecimiento fue de 20 °C, aunque de manera general esta varía entre 25 y 30 °C. Sin embargo, a 30 °C, la actividad antagónica de esta especie fue casi nula. Todo lo cual constituyen evidencias de que la temperatura óptima para el crecimiento no necesariamente coincide con la de su actividad antagónica, y que existe estrecha relación entre aislamiento, antagonismo y temperatura (Rodríguez y Arcia, 1993).

La luz y su espectro influyen en el desarrollo de *Trichoderma* spp, fundamentalmente sobre la esporulación. Las colonias del hongo que se desarrollaron bajo condiciones de luz alterna fueron blancas y algodonosas al inicio y después con zonas concéntricas, alternando una banda delgada hialina con otra ancha de color verde oscuro, mientras que bajo la luz continua fueron uniformemente de color verde oscuro. La luz influye, además, en la producción de metabolitos secundarios (Knudse y Bin, 1990).

Las especies de *Trichoderma* no son exigentes con relación al pH del sustrato. Pueden crecer en suelos con pH desde 5.5 a 8.5, aunque los valores óptimos se encuentran entre 5.5 y 6.5,

es decir en un ambiente ligeramente ácido. El desarrollo de *Trichoderma* se activa con la presencia de humedad, con óptimo de 60% de la capacidad de retención de humedad del suelo. A porcentajes mayores de saturación, la colonización y sobrevivencia disminuyen por baja disponibilidad de oxígeno. Los aislamientos de *Trichoderma* ayudan a la descomposición de materia orgánica, además de los hongos a los cuales degrada. Se encuentran en suelos con abundante materia orgánica y por su relación con esta, es ubicado en el grupo de hongos hipogeos, lignolícolas y predadores (Anarias, 2004).

La capacidad de *Trichoderma* spp como antagonista es altamente variable. Mihuta-Grimm y Rowe (1986) demostraron que, de 255 aislamientos obtenidos de diferentes lugares, solo el 15% fue efectivo en el control de *Rhizoctonia*, y que las cepas nativas de un lugar son más efectivas que las importadas. Esta capacidad depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción; es decir pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno que de otro; por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada. Esto indica, que es imprescindible la selección de aislamientos promisorios para el control de un agente plaga, que incluye el estudio de los mecanismos relacionados con dicho control (Arcia, A. 1995).

Entre los mecanismos de acción de *Trichoderma* se encuentran: antibiosis, competencia (por espacio y nutrientes), micoparasitismo, desactivación de enzimas de los patógenos y otros. Harman (2000), afirma otros mecanismos con los cuales *Trichoderma* spp ejerce su acción como antagonista y colonizador de las raíces, como son: Aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta. Solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos. Estimulación del crecimiento vegetal. Inducción de resistencia. Estos actúan indirectamente sobre los patógenos, ya que su acción es elicitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta.

El estudio de estos modos de acción en condiciones de campo es complejo, pues *Trichoderma* spp es un hongo cuyo hábitat es el suelo y la mayoría de estos procesos ocurren en la rizosfera (Harman, 2000).

Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un requerimiento (espacio y/o nutrientes), por lo que competencia puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la

utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás (Infante *et al.*, 2009).

La presencia de *Trichoderma* spp en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, y de su plasticidad ecológica. La competencia por nutrientes de *Trichoderma* spp es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentran, la alta velocidad de crecimiento y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en «bloquear el paso» al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Infante *et al.*, 2009).

La competencia evaluada bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual), se ejerce principalmente por espacio y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros. En cultivo dual se manifestó competencia por el espacio en un grupo de aislamientos de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia solani*, potenciado por la alta velocidad de crecimiento y reconocimiento del patógeno por los mismos (Reyes y Martínez, 2008).

El micoparasitismo es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas de crecimiento quimiotrófico donde *Trichoderma* spp puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes. Estas etapas son: a) reconocimiento: Se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato, b) adhesión y enrollamiento: Ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lecitina presente en la pared del patógeno, c) actividad lítica: Producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y d) penetración de las hifas de *Trichoderma* que es posible debido a la actividad lítica. El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación. (Hoyos y Chaparros, 2008).

Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislamiento de *Trichoderma* spp del patógeno y de las condiciones del ambiente (Hoyos y Chaparros, 2008).

Las enzimas desempeñan una función esencial en el micoparasitismo, ya que la penetración de la hifa de *Trichoderma* en su hospedante está regida por la maquinaria enzimática de este antagonista, y depende más del aislamiento y del hospedante, que de la propia especie del biorregulador (Nicol, Mónaco, y Del Bello, 2005).

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* spp constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diversos en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias son consideradas antibióticos. (Dennis, 1971).

Se ha identificado compuestos del tipo de las alquilpironas (6-pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (*trichodermina* atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina). Se ha caracterizado un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil-á-pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, koninginina, ácido heptelídico, trichoviridina, ácido harziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) obtenidos de la interacción entre *R. solani* y dos cepas comerciales (T22 y T39) de *T. harzianum* (Dennis, 1971).

Algunas especies de *Trichoderma* producen compuestos antifúngicos que actúan sobre *R. solani* y *S. rolfii* ocasionando la degradación de sus hifas, y otras, la inhibición *in vitro* de la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Con relación al efecto de *Trichoderma* sobre nematodos se sabe que las quitinasas y proteasas de *Trichoderma* spp. que son muy similares a las de los hongos nematófagos, poseen potencial para atacar estos invertebrados. El proceso parasítico y el efecto de las enzimas y metabolitos de *Trichoderma* sobre nematodos pueden ocurrir en el suelo, en el interior de las raíces o sobre la superficie de estas (Cook y Beker, 1989).

3.5 Compatibilidad de *Trichoderma* con productos agroquímicos

Para incorporar productos biológicos en el manejo de un cultivo, es imprescindible conocer la sensibilidad de los agentes biológicos a los agroquímicos que se emplearán en dicho manejo, con el fin de conservar su capacidad controladora y establecer medidas para su uso

eficiente. En este aspecto la respuesta de *Trichoderma* spp varía en dependencia de las combinaciones especie/cepa de microorganismos y productos fitosanitarios evaluados.

Según Duran y Romero (2007) el fungicida fludioxonil+metalaxil en dosis letal media inferior a la recomendada para campo inhibe el crecimiento micelial de *Trichoderma* . Sin embargo, en pruebas in vitro los fungicidas oxiclóruo de cobre, metalaxil y dimetomorf fueron compatibles con diferentes especies de *Trichoderma*, mientras zineb, mancozeb y tiram mostraron ligera toxicidad y benomil se comportó como tóxico (Duran y Romero, 2007).

De igual modo, en ensayos *in vitro*, los fungicidas propiconazol+piroquilon, carbendazim y tebuconazol+triadimenol, afectaron totalmente el crecimiento de dos cepas de *T. asperellum*, mientras que azoxistrobina solo produjo ligera afectación, aunque disminuyó de forma significativa la esporulación de las cepas evaluadas. De estos productos, propiconazol+piroquilon y tebuconazol+triadimenol afectaron la geminación de conidios de *T. asperellum* en más de 90%, y carbendazim y azoxistrobina en alrededor de 60% (Muños y Sáenz, 2006).

IV. METODOLOGIA

4.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional de Agricultura, Catacamas, Olancho Honduras, ubicada a 6 kilómetros de la ciudad de Catacamas a una altitud de 350 msnm, con una temperatura promedio de 24 a 30 °C y una precipitación anual de aproximadamente 1300 mm.

4.2 Descripción del experimento

El estudio consistió en coleccionar muestras de suelo para el aislamiento y evaluación de aislados de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol de patógenos causantes del mal de talluelo en los cultivos de tomate.

El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la colecta de muestras de suelo para el aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp y la segunda en la evaluación de los aislados de *Trichoderma* spp para el manejo de mal del talluelo en invernadero.

Para el aislamiento de aislados de *Trichoderma* spp se coleccionaron muestras de suelo, en fincas de importancia agrícola de la Universidad Nacional de Agricultura, dedicadas a diferentes cultivos y manejo, así como en áreas forestales, en Catacamas Olancho (cuadro 2).

4.3. Recolección de muestras de suelo

En cada finca en estudio, se obtuvieron tres muestras compuestas de 1 kg de suelo, recolectadas de forma aleatoria dentro de cada finca muestreada. Las muestras se recolectaron con un palín a una profundidad de 15 cm y 30 cm de ancho, desinfectando el palín cada vez que se utilizaba por cada muestra colectada; una vez colectada la muestra se etiquetó con información de la finca y cultivos que hay en la finca luego se trasladó al laboratorio de fitopatología.

4.4 Procesamiento de muestras de suelo

Las muestras recolectadas fueron tamizadas, inicialmente en una malla de 2 cm de diámetro para eliminar materia vegetal posteriormente en una malla de 1mm, con el objetivo de obtener partículas pequeñas.

Una vez tamizadas las muestras, se homogenizaron y se obtuvo una submuestra de 10 g de suelo, a partir de la cual se obtuvo 1 g, el cual fue depositado en un matraz conteniendo 99

ml de agua destilada estéril. Luego de preparar todos los matraces, se sometieron a un agitador magnético por 24 horas.

4.5 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de las muestras se realizaron diluciones seriadas (Lecuona, 1996), 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Con una micropipeta se depositó 1ml de la solución de suelo en un tubo de ensayo conteniendo nueve ml de agua destilada para obtener la solución madre, a partir de la cual se realizaron las diluciones seriadas. De la disolución 10^{-4} , se tomó 0.50 ml y se depositó en platos Petri con medio de cultivo PDA (Papa dextrosa agar). Después de ser inoculados, los medios de cultivo se incubaron a una temperatura ambiente de 24 a 28 °C, revisándolos cada 12 horas hasta llegar a siete días.

Mediante observación visual se realizó un reconocimiento de las colonias que presentaron características típicas de *Trichoderma* spp y con una espátula de 5mm se extrajo partes de las colonias y se re-aislaron en un medio de cultivo de PDA, a partir de estos medios se obtuvieron cultivos puros de *Trichoderma* spp, de los que se realizaron montajes temporales para la observación en el microscopio con el fin de identificar las estructuras a nivel de género. La identificación de los aislados se realizó utilizando las claves descritas por Samuels *et al.* (2007).

4.6 Caracterización de los aislados de *Trichoderma* spp

La evaluación de los aislados de *Trichoderma* spp se realizó en base a sus características macroscópicas y microscópicas.

4.6.1 Evaluación macroscópica de *Trichoderma* spp.

Para la evaluación macroscópica de *Trichoderma* spp se utilizaron dos medios de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) y SDA (Sabouraud Dextrosa Agar). Para cada aislado y por cada medio de cultivo se prepararon 10 platos Petri. A las 24 horas se sembró los aislamientos de *Trichoderma* en los medios de cultivos y fueron incubados a temperatura de 24°C a 28°C. A partir de 2 días de incubación se realizaron observaciones visuales. Aspecto de la colonia (esporulante, polvoriento, producción de burbujas), crecimiento vertical, crecimiento circular, color de la colonia al iniciar y finalizar el crecimiento, color de la colonia por la parte superior del plato Petri y por la parte inferior.

4.6.2 Caracterización morfométrica de *Trichoderma* spp.

La caracterización morfométrica de *Trichoderma* spp se realizó a través de la medición de estructuras reproductivas (conidios, fiálides conidióforos) y Ritmo de crecimiento radial

Se realizaron mediciones de conidias, fiálides y conidióforos. Para realizar las mediciones se utilizó un micrómetro ocular y un micrómetro objetivo el cual es adaptado al binocular del microscopio el cual fue calibrado hasta encontrar el valor micrométrico. Para determinar el valor micrométrico a partir del micrómetro ocular, para determinar tamaño de las estructuras de los conidios y las otras estructuras, se utilizó la fórmula por French y Hebert (1982).

$$VM = \frac{\text{Medida micrómetro de platina en micras}}{\text{Unidades micrómetro ocular}}$$

Donde VM es la medida en micras o valor micrométrico que corresponde a cada unidad del micrómetro ocular.

Las observaciones se hicieron utilizando un microscopio LABOMED CXL con el objetivo de 40X

4.6.3 Ritmo de crecimiento.

Se midió el ritmo de crecimiento de *Trichoderma* spp en los medios de cultivo PDA y SDA en platos Petri. Las mediciones se realizaron siguiendo la metodología descrita por French y Hebert (1982), que consiste en dibujar una cruz en la cara posterior del plato Petri, marcando cuatro radios de 45 grados, los que fueron identificados con letras, siendo el centro de la cruz, el punto de inoculación del hongo (Anexo 1).

En el centro del plato Petri se colocó el inóculo de *Trichoderma* spp, posteriormente los platos inoculados se colocaron en incubación a temperatura de 24°C a 25°C. Las observaciones se realizaron cada 12 horas, en cada observación se marcó el punto de avance del hongo sobre los cuatro radios, y se midió con una regla milimétrica. Las mediciones se realizaron en cada plato hasta, cuando en uno de los cuatro radios, el hongo alcanzó el crecimiento hasta el borde del plato. La variable evaluada fue ritmo de crecimiento promedio de *Trichoderma* spp en mm día⁻¹ y se calculó a partir de las mediciones de crecimiento del hongo en mm realizadas cada 12 horas.

4.6.4 Competencia y antagonismo de aislados de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp.

Se evaluó el antagonismo de los aislados de *Trichoderma* spp contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp, utilizando la técnica de cultivo dual en medio PDA (Howell, 2003) inoculando 3 platos por cada aislado de *Trichoderma* spp. Primero se colocó en un extremo del plato Petri un fragmento de cuatro mm de diámetro de cultivo de *Fusarium* spp a las 72 horas después se colocó en el extremo opuesto un disco de cultivo de *Trichoderma* spp de cuatro mm, a una distancia de cinco cm aproximadamente del fragmento de cultivo de

Fusarium spp. A la par de cada aislado se establecieron cultivos individuales de *Trichoderma* spp y de *Fusarium* sp, los cuales corresponden a los testigos. La evaluación se realizó haciendo mediciones del radio de crecimiento de ambos hongos cada 24 horas.

El antagonismo o capacidad antagonista de los aislados de *Trichoderma* spp, se evaluó primero midiendo el grado de mico parasitismo, conforme a la escala propuesta por Royse y Ries (1978) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala para evaluación del antagonismo o capacidad antagónica de *Trichoderma* spp (Royse y Ries, 1978).

Grado	Descripción del micoparasitismo	Cubrimiento de la superficie del medio por el antagonista (%)
1	El antagonista cubre totalmente el micelio del fitopatógeno	100%
2	El antagonista cubre 75% del micelio del fitopatógeno	75%
3	El Antagonista cubre 50% el micelio del fitopatógeno	50%
4	El Antagonista cubre 25% el micelio del fitopatógeno	25%

4.6.5 Evaluación de aislados de *Trichoderma* spp sobre mal del talluelo en tomate en condiciones de invernadero.

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de la UNA. Cada aislado de *Trichoderma* spp fue inoculado en un sustrato a base de Promix® que es una mezcla de fibras, esterilizado a 1bar de presión y 121°C por 20 minutos.

Aislamiento del patógeno mal de talluelo

Para el aislamiento del patógeno *Fusarium* sp se realizó una recolección de plántulas de café que presentaban sintomatología de la enfermedad como ser estrangulamiento del tallo, después que las plántulas fueron recolectadas se llevaron al laboratorio de fitopatología para ser inoculadas en medio de cultivo PDA, una vez realizado la inoculación se procedió a realizar montajes temporales y observándolos en el microscopio para hacer comparaciones con manuales de identificación según Barnett y Hunter (1998)

Rea-aislamiento del patógeno mal de talluelo

Después que se observó y se identificó el patógeno este fue re-aislado en medios de cultivo PDA para obtener cultivos puros que iban a ser utilizados en la aplicación al sustrato donde se siembran las plántulas de tomate.

Preparación de suspensión de conidias de *Trichoderma* spp.

Para cada aislado se preparó una suspensión de conidias en un litro de agua a una concentración de 2.3×10^{-6} de *Trichoderma* spp, concentración de conidias que fue determinada utilizando una cámara de conteo con rayado Neubauer y un microscopio de luz (40x).

Para preparar la suspensión de conidias se utilizaron cultivos puros de *Trichoderma* spp de 12 a 15 días de siembra, mantenidos en platos petri en medios de cultivo PDA. Se realizó un conteo de conidias con la cámara Neubauer para medir la concentración de conidias a utilizar en el campo, se utilizarán 2 litros de agua y 2.3×10^{-6} UFC de *Trichoderma* spp.

Preparación del sustrato para siembra de semillas de tomate.

Se midió la cantidad de sustrato/suelo a utilizar por cada uno de los tratamientos, se depositó por separado sobre una lámina plástica después de haber medido el sustrato este fue inoculado con los medios de cultivos que contienen *Fusarium* spp utilizando 1 litro de agua y se inocularon 10 platos Petri que contiene el patógeno este se inoculo y a los 3 días después se aplicó la suspensión de conidias de cada aislado, el cual fue aplicado con una bomba de mochila por cada tratamiento se lavó y se desinfecto la bomba de mochila este para evitar que se puedan mezclar los aislamientos.

Se utilizaron bandejas plásticas de 100 depósitos, con dimensiones de 30 cm de largo por 30 cm de ancho y 10 cm de profundidad, en los que se depositó el sustrato inoculado con *Trichoderma* spp y el patógeno *Fusarium* sp y se sembró la variedad de tomate Poni, sembrando siete surcos de tomate en cada bandeja, a una distancia de cinco cm entre línea, conforme al diseño de la bandeja, depositando dos semillas en cada depósito. Se utilizó un diseño completamente al azar 3 repeticiones.

El ensayo se estableció en el área de horticultura de la universidad nacional de agricultura. Se evaluaron 10 tratamientos para el manejo del mal de talluelo en tomate en condiciones de invernadero, correspondiente a ocho aislados nativos de *Trichoderma* spp, un tratamiento con el fungicida Mancozeb y el testigo absoluto que consistió en aplicación de agua.

Porcentaje de incidencia de mal de talluelo

La incidencia de mal de talluelo se inició a los ocho días después de la emergencia de las plántulas y se realizaron muestreos de la incidencia de la enfermedad a los 8, 15, 24 y 36 días después de la siembra. El muestreo se hizo observando todas las plantas de la bandeja,

registrando el número de plantas que presentaban los síntomas característicos de la enfermedad, Para obtener el porcentaje de incidencia de la enfermedad se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Total de plantas enfermas}}{\text{Número de plantas evaluadas}} \times 100$$

4.7 Variables de estudio

- Aspecto macroscópico de *Trichoderma* spp
- Dimensiones (μ) de estructuras reproductivas (conidióforos, fiálides y conidias)
- Ritmo de crecimiento radial (mm día⁻¹)
- Radio de crecimiento (mm) de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp.
- Radio de crecimiento (mm) de *Fusarium* sp.
- Porcentaje de incidencia de Mal de talluelo en tomate

4.8. Análisis de los datos

Se realizaron análisis descriptivos de las características macroscópicas y morfométricas de tamaño y forma de estructuras reproductivas de los aislados de *Trichoderma* spp utilizando las claves taxonómicas de Samuels *et al.* (2007).

Las variables, ritmo de crecimiento, Ritmo de crecimiento del antagonista (RCA), Ritmo de crecimiento del patógeno (RCP), Número de plantas germinadas, porcentaje de plantas germinadas, número de plantas enfermas e incidencia de mal del talluelo fueron analizadas mediante análisis de varianza.

Para el análisis estadístico se utilizó el software de análisis estadísticos InfoStat versión 2020 (Di Rienzo, *et al.*, 2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>. El Análisis de Varianza se realizó considerando un arreglo de parcela dividida y separación de medias según Tukey (α : 0.05).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de Aislamientos

En todas las muestras obtenidas en las 10 fincas en estudio se obtuvo aislamientos de *Trichoderma* spp. De acuerdo con la información obtenida, en ninguna de las fincas muestreadas se habían realizado previamente aplicaciones de *Trichoderma* spp, por lo que se considera que este hongo obtenido a partir de las muestras es nativo de cada una de las zonas. En total se obtuvieron 10 aislamientos, correspondiente a un aislamiento por cada una de las fincas muestreadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aislados obtenidos e información sobre el origen de las muestras de suelo para la extracción de aislamientos de *Trichoderma* spp.

Finca	Uso del suelo	Cultivo	Coordenadas		Altitud (msnm)	Aislado
			Norte	Oeste		
1	Cultivos industriales	Cacao	14°49'09.429"	85°50'32.154"	344.0	F1M2
2	Cultivos industriales	Cacao + café	14°49'15.754"	85°50'37.78"	338.0	F2M1
3	Frutales	Marañón	14°49'30.867"	85°50'41.593"	365.0	F3M2
4	Cultivos industriales	Palma aceitera	14°50'19.82"	85°50'48.019"	382.0	F4M3
5	Recursos naturales	Forestales	14°49'40.965"	85°50'24.136"	348.0	F5M1
6	Cultivos industriales	Café	14°50'15.021"	85°50'24.136"	340.0	F6M2
7	Montañita	Forestal	14°48'48.834"	85°50'17.433"	357.0	F7M3
8	Cultivos industriales	Caña	14°49'18.152"	85°50'52.839"	369.0	F8M1
9	Hortalizas	Hortalizas	14°50'15.021"	85°50'47.094"	365.0	F9M3
10	Finca agroecológica	Forestal	14°50'20.738"	85°50'37.582"	374.0	F10M2

5.2. Características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* spp

Las características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* spp, en los medios de cultivo PDA y SDA, se describen en el cuadro 3. Los resultados indican que, en cuanto a los aspectos de la colonización del hongo y crecimiento de la colonia, se logró determinar que hubo diferencias en cada uno de los aislados en los medios de cultivo. En el medio de cultivo PDA se encontró mayor predominancia de aislados de apariencia esporulante y en segundo lugar de aspecto polvoriento. Los aislados polvorientos mediante observación tuvieron mayor velocidad de crecimiento en cuanto al llenado del medio de cultivo. En el medio de cultivo SDA se encontró

mayor predominancia en aislados polvorientos y una baja dominancia en aislados con producción de burbujas.

El crecimiento de la colonia en el medio PDA se caracterizó por presentar un crecimiento circular, excepto el aislado F5M1 que presentó crecimiento vertical. En el medio SDA, los aislados F1M2, F3M2, F6M2, F7M3 y F9M3 presentaron crecimiento circular de las colonias, mientras que los otros aislados se caracterizaron por un crecimiento vertical (cuadro 3); estas características presentan similitud con lo descrito por Rodríguez (2002).

Cuadro 3. Características macroscópicas de *Trichoderma* spp, aspecto de la colonia y crecimiento de la colonia.

Aislado	Descripción de colonia en PDA			Descripción de colonia en SDA		
	Aspecto	Anverso	Reverso	Aspecto	Anverso	Reverso
F1M2	Esporulante	Verde intenso	Verde	Esporulante	Verde	Verde y amarillo
F2M1	Esporulante	Verde pálido	Verde	Formación de burbujas	Verde blanco y	Verde intenso
F3M2	Esporulante	Verde pálido verde intenso	Verde	Esporulante	Verde	Verde intenso
F4M3	Polvoriento	Verde	Verde intenso	Polvoriento	Verde amarillo y	Verde y amarillo
F5M1	Esporulante	Verde pálido	Verde intenso	Polvoriento	Verde	Verde
F6M2	Esporulante	verde y amarillo	verde intenso	Esporulante	verde blanco y	Verde y amarillo
F7M3	Polvoriento	verde y blanco	verde y blanco	Polvoriento	Verde	Verde intenso
F8M1	Polvoriento	Verde	Verde intenso	Polvoriento	verde pálido	Verde intenso
F9M3	Formación de burbujas	Verde	Verde intenso	Esporulante	verde	Verde intenso
F10M2	Esporulante	Verde con blanco	Verde y blanco	Polvoriento	verde intenso	verde intenso

Las características macroscópicas de las colonias de *Trichoderma* spp en medios de cultivo PDA, coinciden con las descrita por Rodríguez (2002) y Leon (2012) quienes observaron en sus aislados, colonias con bordes circulares, verticales, de crecimiento rápido, inicialmente de color blanco, posteriormente tornándose en colores verde pálido, verde intenso, verde con blanco, verde con amarillo, hasta finalmente volverse verde oscuro con micelios con halos de color blanco (cuadro 3).

Para completar la caracterización macroscópica se concluyó con la característica color de la colonia, considerando el color al iniciar la colonización del hongo, por el anverso y reverso del cultivo en el plato Petri en cada uno de los aislados en los dos medios de cultivo, observando que en la etapa inicial en los dos medios de cultivo (PDA y SDA), todos los aislados presentaron color blanco.

Para la observación realizada sobre el color de las colonias de los hongos, se observó diversidad de colores en los dos medios de cultivo (PDA y SDA), tanto por el anverso como por el reverso de las colonias. Los colores variaron entre blanco, amarillo, verde pálido a verde intenso. Las colonias de los aislados que crecimiento circular, presentaron color verde pálido en el centro y amarillo hacia los bordes. En algunas colonias que presentaron crecimiento circular y vertical, se observó un color verde intenso en el centro con bordes de color blanco cabe mencionar que estas características se asemejan a trabajo de investigación realizado por Páez (2006).

5.3 Caracterización morfométrica de aislados de *Trichoderma spp*

5.3.1. Descripción de las estructuras reproductivas de *Trichoderma spp*

Todos los aislados presentaron características similares en cuanto al tamaño y forma de las conidias, conidióforos y las fiálides.

Las conidias presentaron formas ovoides a globosas y de color verde, con un tamaño entre 2.6 y 2.8 μm de largo y de 1.8 a 3 μm de ancho, ubicadas en la punta de la fiálides solas o agrupadas.

Los conidióforos son hialinos, con paredes lisas, rectos o doblados, muy ramificados, las principales ramificaciones nacen formando ángulos rectos o doblados un poco hacia el ápice. Típicamente en forma de ramas alternas o paralelas, los conidióforos tienen entre 96 a 118 μm de largo.

Las fiálides fueron sub globosas, delgadas en la base, hinchadas en la parte media y estrecha en el ápice. Las dimensiones oscilaron entre 4 y 4.5 μm de largo de 2.3 a 2.5 μm en el ancho de base, formando grupos de 2 a 3 fiálides, aunque también se encontraron solitarias y en la parte terminal sosteniendo un grupo de conidias, o pegadas en la base, de la hifa estas mediciones presentan semejanza con otras investigaciones que se realizaron según Romero-Arenas (2009) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Caracterización morfológica de aislados nativos de *Trichoderma* spp en PDA, obtenidos de suelo de diferentes regiones.

Aislado	Tiempo de crecimiento (Hrs)	Tamaño de estructuras (μm)		
		Conidios (Largo x ancho)	Fiálides (Largo x ancho de base)	Conidióforo (Largo)
F1M2	70	2.6 X 1.8	4.0 X 2.3	110
F2M1		2.7 X 2.5	5.0 X 2.5	108
F3M2		2.6 X 2.0	4.8 X 2.7	110
F4M3	94	2.7 X 2.0	4.8 X 2.7	104
F5M1		2.7 X 2.0	4.6 X 2.5	112
F6M2		2.8 X 2.5	4.4 X 2.4	118
F7M3		2.7 X 2.0	6.0 X 2.5	96
F8M1	120	2.6 X 2.7	4.5 X 2.5	112
F9M3		2.6 X 3.0	4.9 X 2.4	110
F10M2		2.8 X 3.0	5.5 X 2.5	118

5.4. Ritmo de crecimiento

El mayor ritmo de crecimiento de los aislados de *Trichoderma*, fue 16.3 mm día^{-1} y se observó en el aislado F7M3 a las 60 horas después de la inoculación, en el medio de cultivo PDA. En ambos medios de cultivo, el menor ritmo de crecimiento se observó en el aislado F3M2 a las 60 horas después de la inoculación. Aunque no se hizo una comparación entre medios de cultivo, se observa que el crecimiento radial fue similar en ambos medios de cultivo.

El análisis de varianza indica que en el medio PDA hubo diferencias significativas entre el promedio de crecimiento radial de los aislados de *Trichoderma*, el menor crecimiento promedio se registró en el aislado F8M1 con 12.5 mm día^{-1} y el mayor en el aislado F7M3 con 16.3 mm día^{-1} (cuadro 5).

En el medio SDA, el menor crecimiento radial promedio fue de 11 mm día^{-1} y se registró en el aislado F3M2. Los aislados con mayor crecimiento radial fueron F6M2 y F4M3 con 14.7 y 14.6 mm día^{-1} (Cuadro 5). Chavarría Sánchez (2016) encontró aislados que alcanzaron su crecimiento entre las 60 y 72 horas, con un radio de 35 mm.

Cuadro 5. Promedio de crecimiento radial (mm día⁻¹) de aislamientos de *Trichoderma* spp en PDA y en SDA a las 60 horas después de la inoculación

Aislado	Crecimiento radial (mm día ⁻¹)	
	PDA	SDA
F7M3	16.3 a	F6M2 14.7 a
F1M2	14.8 ab	F4M3 14.6 a
F9M3	14.6 ab	F5M1 14.2 a
F5M1	14.2 ab	F8M1 14.0 a
F6M2	14.1 ab	F1M2 13.8 a
F2M1	13.9 ab	F7M3 13.8 ab
F3M2	13.7 ab	F2M1 13.6 ab
F10M2	13.6 ab	F9M3 13.5 ab
F4M3	13.5 ab	F10M2 13.2 ab
F8M1	12.5 b	F3M2 11.0 b

Promedios seguidos con la misma letra en una misma columna, no son significativamente diferentes según Tukey (0.05).

A las 12 horas después de inoculación en el medio de cultivo PDA (Anexo 2), el mayor ritmo de crecimiento radial fue de 5.5 y 5.2 mm día⁻¹ observado en los aislados F1M2, F2M1 y F5M1, los que fueron significativamente superiores ($p < 0.0001$) a los aislados F6M2, F3M2 y F8M1 que registraron el menor crecimiento radial (cuadro 6).

A las 24 horas después de la inoculación, los aislados con mayor ritmo de crecimiento fueron F2M1 y F3M2. Los aislados con ritmo de crecimiento significativamente ($p < 0.0001$) menor en este período fueron F8M1, F10M2 y F9M3, con 7.1, 12.3 y 12.7 mm día⁻¹ (Anexo 3).

A las 36 horas después de la inoculación, los aislados con mayor ritmo de crecimiento fueron F7M3, F6M2 y F9M3. El menor ritmo de crecimiento fue 12.3 y se registró en el aislado F2M1 que fue significativamente ($p < 0.007$) menor que el del aislado F7M3 con 23.8 mm día⁻¹ (Anexo 4). El resto de aislados fueron similares estadísticamente. En general, a partir de las 48 HDDI (Anexo 5), el ritmo de crecimiento comenzó a descender con respecto a las dos lecturas anteriores. El aislado F7M3 fue el que registró el mayor ritmo de crecimiento con 22 mm día⁻¹. A las 60 HDDI el ritmo de crecimiento fue estadísticamente similar en todos los aislados (Anexo 6) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Crecimiento radial (mm día⁻¹) de aislamientos de *Trichoderma* sp en PDA en diferentes momentos después de la inoculación).

Horas después de la inoculación										
	12		24		36		48		60	
Cepa	Media (0.05)	Tukey Cepa	Media (0.05)	Tukey Cepa	Media (0.05)	Tukey Cepa	Media (0.05)	Tukey Cepa	Media (0.05)	Tukey
F1M2	5.5 a		F2M1	18.0 a	F7M3	23.8 a	F7M3	22.0 a	F1M2	19.2 a
F2M1	5.2 ab		F3M2	17.5 ab	F6M2	22.2 a	F9M3	18.1 ab	F7M3	18.7 a
F5M1	5.2 ab		F1M2	14.4 abc	F9M3	20.8 ab	F5M1	18.0 ab	F9M3	18.6 a
F7M3	3.8 abc		F9M3	14.0 abc	F10M2	19.0 ab	F3M2	17.9 ab	F10M2	18.4 a
F4M3	3.4 abc		F7M3	13.9 abc	F1M2	18.0 ab	F8M1	17.8 ab	F8M1	18.1 a
F9M3	3.0 abc		F4M3	13.4 abc	F8M1	17.9 ab	F6M2	17.4 ab	F2M1	17.8 a
F10M2	2.0 bc		F6M2	13.2 bc	F4M3	17.0 ab	F1M2	17.0 ab	F5M1	17.3 a
F8M1	1.7 c		F10M2	12.7 c	F5M1	16.8 ab	F4M3	16.4 b	F3M2	17.2 a
F3M2	1.1 c		F8M1	12.3 c	F3M2	14.8 ab	F10M2	16.4 b	F6M2	17.2 a
F6M2	0.5 c		F3M2	7.1 d	F2M1	12.3 b	F2M1	16.2 b	F4M3	16.7 a

En SDA, los aislados F1M2, F5M1 y F2M1 a las 12 horas registraron un crecimiento radial significativamente ($p < 0.0001$) superior a los demás aislados, siendo los aislados F6M2, F3M2 y F8M1 los que presentaron el menor crecimiento (Anexo 7). El mayor ritmo de crecimiento registrado en este período fue de 3.2 mm día⁻¹, observado en el aislado F1M2. A las 24 horas después de la inoculación, los aislados con mayor ritmo de crecimiento fueron F2M1, F1M2 y F4M3 con 14.9, 14.8 y 14.6 mm día⁻¹ (Anexo 8). A las 36 horas después de la inoculación, los aislados con mayor ritmo de crecimiento fueron F6M2, F9M3 y F10M2. El aislado F3M2 registró un ritmo de crecimiento de 11.5 mm día⁻¹, siendo significativamente ($p < 0.0001$) menor al resto de los aislados (Anexo 9).

A las 48 y 60 horas después de la inoculación, no se encontró diferencia significativa entre los aislados, sin embargo, a las 48 horas se observó mayor ritmo de crecimiento en los aislados F4M3, F5M1; mientras que, a las 60 horas, los aislados F8M1 y F7M3 presentaron un mayor ritmo de crecimiento ((Anexos 10 y 11).

En general, el ritmo de crecimiento radial presentó un crecimiento ascendente hasta las 36 horas después de la inoculación, período en el que se observó el mayor crecimiento. A partir de ese momento el crecimiento fue un poco más lento (Cuadro 7).

Cuadro 7. Crecimiento radial (mm día⁻¹) de aislamientos de *Trichoderma* sp en SDA en diferentes momentos de evaluación (HDDI)

Horas después de la inoculación									
12		24		36		48		60	
Cepa	Tukey Media (0.05)	Cepa	Tukey Media (0.05)	Cepa	Tukey Media (0.05)	Cepa	Tukey Media (0.05)	Cepa	Tukey Media (0.05)
F1M2	3.2 a	F2M1	15 a	F8M1	22.4 a	F4M3	20.1 a	F8M1	21.2 a
F5M1	3.2 a	F1M2	15 a	F6M2	22.2 a	F5M1	20 a	F7M3	20.2 a
F2M1	3.1 a	F4M3	15 ab	F9M3	22 a	F6M2	19.9 a	F2M1	19.6 a
F7M3	1.8 b	F5M1	13 abc	F10M2	20.4 ab	F7M3	18.2 a	F1M2	19.3 a
F9M3	1.6 b	F6M2	12 abc	F4M3	18.7 abc	F9M3	17.5 a	F9M3	19.2 a
F4M3	1.3 b	F7M3	10 abc	F7M3	18.3 abc	F8M1	17.2 a	F6M2	19 a
F10M2	1 b	F10M2	9.6 abc	F5M1	16.3 abc	F3M2	16.8 a	F5M1	18.8 a
F6M2	0.5 b	F8M1	9.3 abc	F1M2	15.6 abc	F2M1	16.3 a	F4M3	18.4 a
F3M2	0.2 b	F3M2	8.3 bc	F2M1	14.1 bc	F1M2	16.2 a	F10M2	18.4 a
F8M1	0 b	F9M3	7.1 c	F3M2	11.5 c	F10M2	16.1 a	F3M2	18.4 a

5.5 Competencia y Antagonismo de aislados de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium* sp.

En el estudio de competencia mediante la técnica de cultivos dual para uno de los aislados no presentaron diferencia significativa. se observó que el crecimiento del hongo de *Trichoderma* spp en los aislados para las 24 y 48 horas tiene un margen de crecimiento similar para cada uno de los aislados (cuadro 8). Todos los aislados de *Trichoderma* spp. presentaron radios de crecimiento mayores a los de *Fusarium* spp a las 24, 48 y 72 horas, pero solo se observó diferencia en las disminuciones de los radios de crecimiento de *Fusarium* spp a las 72 horas, siendo en este periodo la mayor inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp obteniendo una acción de competencia lo que provocó la reducción del crecimiento del patógeno, en cambio el testigo *Fusarium* spp mantuvo el ritmo de crecimiento total de 45 mm hasta los 9 días.

Cuadro 8. Radio de crecimiento de aislados de *Trichoderma spp* y *Fusarium spp* en pruebas de competencia.

Aislados	Radio de crecimiento (mm/h)			
	<i>Trichoderma spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>	Testigo de <i>Trichoderma spp.</i>	Testigo de <i>Fusarium spp.</i>
F1M2	0.88 a	0.13 a	1.10 a	0.10 a
F2M1	0.90 a	0.15 a	1.23 a	0.10 a
F3M2	0.93 a	0.18 a	1.28 a	0.28 a
F4M3	0.95 a	0.18 a	1.40 a	0.28 a
F5M1	1.03 a	0.18 a	1.43 a	0.30 a
F6M2	1.05 a	0.20 a	1.43 a	0.33 a
F7M3	1.05 a	0.20 a	1.60 a	0.33 a
F8M1	1.08 a	0.20 a	1.60 a	0.33 a
F9M3	1.13 a	0.20 a	1.68 a	0.33 a
F10M2	1.18 a	0.25 a	1.75 a	0.38 a

Medias con igual letras en la misma columna no difieren significativamente, según Tukey ($\alpha = 0.05$).

Con respecto al tiempo de crecimiento de los aislados de *Trichoderma spp* podemos observar que, los aislados comenzaron a crecer con variabilidad desde las 12 horas en este periodo de tiempo crecían con mayor rapidez lo fueron los aislados F4M3 y F6M2, se mantuvieron en observación y para las 48 horas los aislados que presentaron la mayor característica de crecimiento fueron F3M2, F4M3, y F7M3, destacando que el aislado F4M3 siempre se encuentra entre los mejores, y finalmente a las 72 horas de observación los aislados que sobresalieron en primer lugar fue el F6M2 seguidos por F3M2 y F7M3 (figura 1).

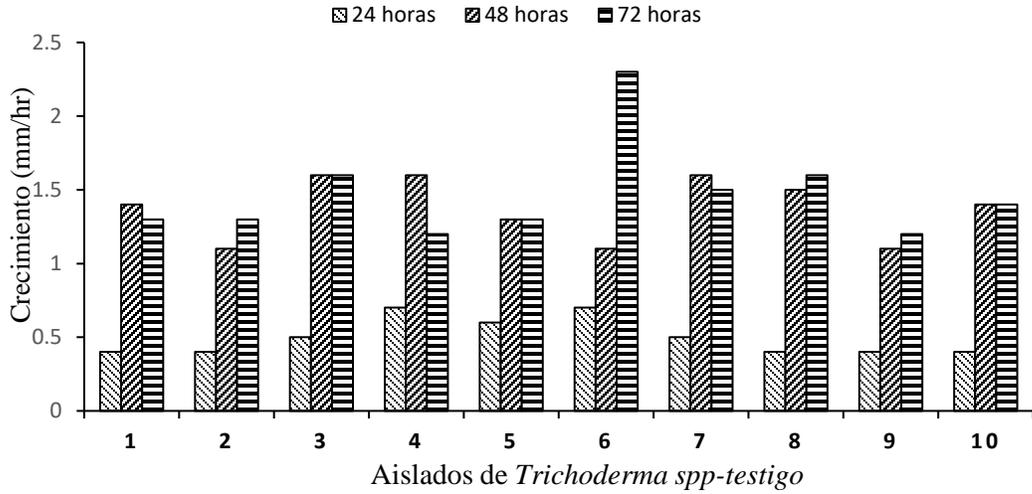


Figura 1. Crecimiento de testigo de *Trichoderma spp.*

Al hacer la comparación entre el testigo de *Trichoderma spp* y *Fusarium spp* se observó con claridad que el *Trichoderma* sobresale en crecimiento sobre el *Trichoderma*, al ver la escala de medición en los dos graficas el *Trichoderma spp* alcanza un 2.5 mm de crecimiento y el *Fusarium spp* el mejor de los aislados creció hasta 0.45 mm.

Los ensayos de *Fusarium spp* en todos los periodos de tiempo mantuvieron un crecimiento a las 24 horas de haber sembrado el ensayo los mejores aislados habían alcanzado un crecimiento de 0.3 ellos fueron F2M1 y F4M3, a las 48 horas mantuvieron su crecimiento, y a las 72 horas el mejor fue F4M3 con un crecimiento de 0.4 mm (Figura 2).

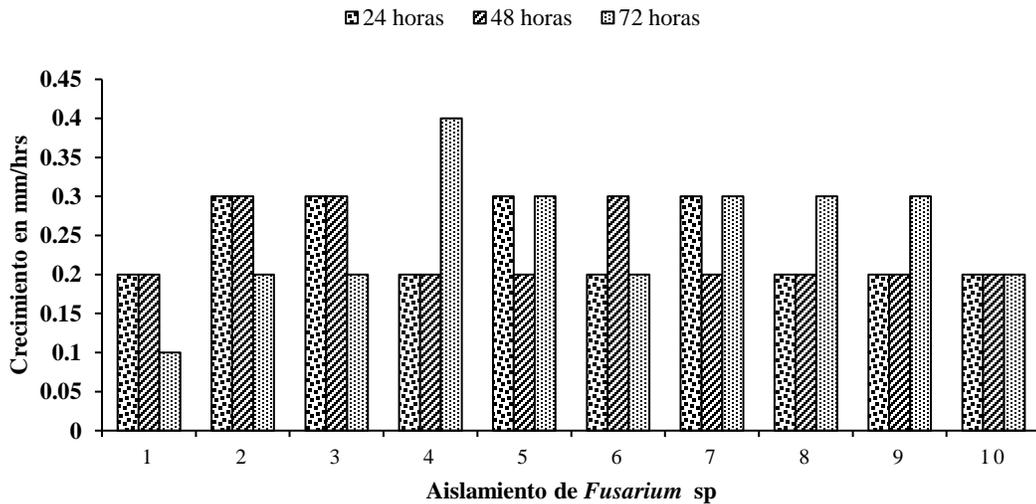


Figura 2. Crecimiento del testigo de *Fusarium spp.*

5.6. Grados de micoparasitismo de aislados de *Trichoderma spp* sobre *Fusarium spp*.

Después de medir los radios de crecimiento de los aislados de *Trichoderma spp* y radios de crecimiento del fitopatógeno *Fusarium spp* se determinó que el mejor grado de parasitismo lo presentó el aislado F4M3 con grado 1 en la escala descrita por (Royse y Reis (1978) de 100 % siendo este aislado uno de los mejores en casi todos los ensayos con un promedio de antagonismo de duración para sobrecubrir el *Fusarium spp* en 10 días de crecimiento (figura 3)

Los aislados F2M1 y F5M1 según la escala de micoparasitismo presentaron grado 2, cubriendo el 75 % del fitopatógeno *Fusarium spp*, estos aislados de *Trichoderma spp* recubrieron el fitopatógeno en más tiempo, a los 11 días de crecimiento. Seguidos de los diferentes aislados mostrados en este ensayo se observó que si existe un control de *Trichoderma spp* sobre *Fusarium spp* mostrando menor grados de micoparasitismo (Cuadro 1).

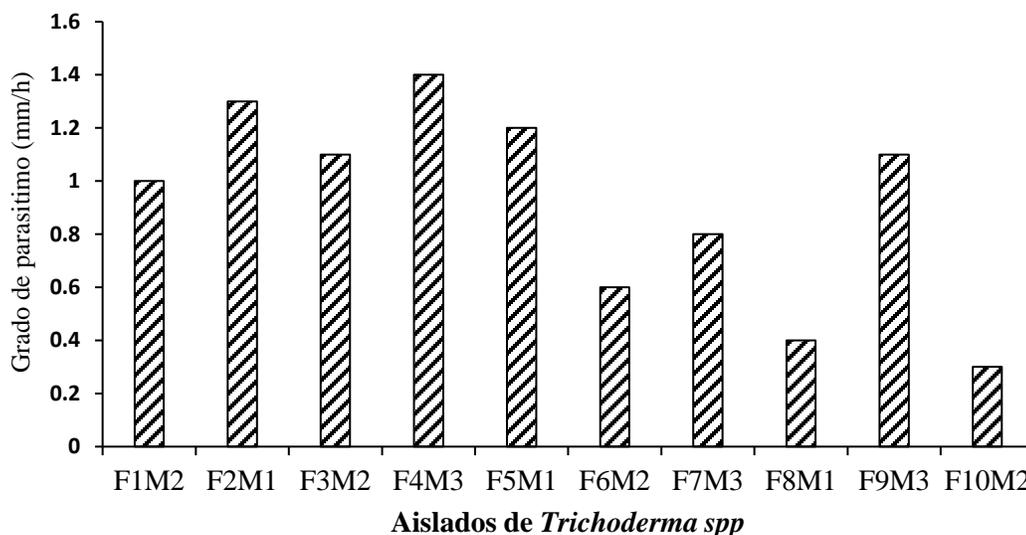


Figura 3. Niveles de parasitismo de los aislados de *Trichoderma spp* sobre *Fusarium spp*.

5.7. Porcentaje de incidencia de mal de talluelo en tomate

Para la variable porcentaje de incidencia de mal de talluelo en el cultivo de tomate presentó una diferencia significativa ($P=0.05$) (Anexo 12) entre los tratamientos que lograron un buen control del patógeno mostrando la más baja incidencia este aislado F4M3 el cual fue extraído del cultivo de palma africana aceitera este aislado ha mostrado diferencia ya que se le dio bastante seguimiento en la apariencia de aspecto de la colonia presento fue en forma de polvo la cual la

hizo muy importante al aplicarla al sustrato este mostro el más bajo porcentaje de incidencia del fitopatógeno (figura 4).

Si los comparamos con los otros aislados tal como F3M2, F1M2 y F6M2 estos muestran una similitud en su efecto en las plántulas evaluadas los muestreos comparativos como se muestran en la figura 3 al principio de cada muestreo a los 15 días después de la siembra no se mostraron muchas plantas con la enfermedad de mal de talluelo queda explicado que el sustrato utilizado se mezcló con sustrato que contenían plántulas con estrangulamiento, síntoma característico de mal de talluelo

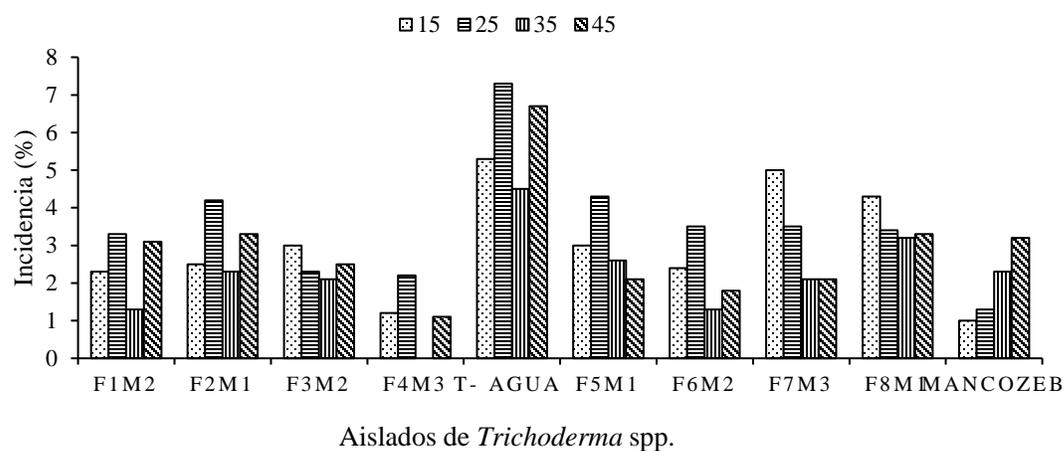


Figura 4. Porcentaje de incidencia de mal de talluelo en cultivo de tomate.

VI. CONCLUSIONES

Se lograron aislar y caracterizar 10 aislados de *Trichoderma* spp los cuales se sometieron a diferentes procedimientos encontrando diferencias en los aspectos como ser producción de burbuja polvorientos y circulares. Para aislados de *Trichoderma spp* F4M3 y F2M1 presentaron el mayor ritmo de crecimiento radial en el medio de cultivo de PDA

Se encontró que el aislado F4M3 cubriendo el 100% del patógeno y el aislado F2M1 alcanzando un nivel de parasitismo de un 75% del patógeno

Una de las cepas con mayor capacidad en casi todas las variables se encontró en la finca F4 que pertenece a los cultivos de palma africana mostro un mejor desarrollo y crecimiento en los medios de cultivo y una baja incidencia de mal de talluelo en el ensayo en vivero.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda la reproducción masiva de los aislados F4M3 y F2M1 ya que obtuvieron el mejor comportamiento en casi todas las pruebas de ensayo.

Realizar un análisis molecular a estas dos cepas de hongos de *Trichoderma* spp para saber que especies son y así seguir estudiándolas

Se recomienda seguir investigando el hongo *Trichoderma* spp en otros tipos de hongos de suelo.

VIII. LITERATURA CITADA

- Anaria M. 2004. Hongos o micopatógenos en: insumos biológicos para manejo integrado de plagas, corporación para desarrollo de insumos. Armania. P 59-62.
- Amaro Leal, JL. 2015. Vio preparadores de cepas nativas de *Tricoderma* spp, para el control biológico en el cultivo de tomate. Tesis para optar por el título de maestro en ciencias en manejos sostenibles de agroecosistemas, institutos de ciencias de la Benemérita universidad autónoma de puebla, México. 112P
- Arcia, A. 1995. Uso se antagonista en el control de fitopatógenos del suelo. En curso sobre el control microbion de insectos plagas y enfermedades en cultivos. Seminarios en la universidad centro y occidental (UCLA). Barquisimetro. Valenzuela. P .20
- Brenes, L y Gamboa, M.N. 2015. Informe final de proyecto F04-14: desarrollo de productos saludables con valores agregados a partir de tomate para brindar alternativas de comercialización de los excedentes de producción primaria a los productores nacionales y pre-factibilidad de mercado de dicho producto. Cartago Costa rica. 88. P.
- CENTA. 1998. (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria Forestal). Guía técnica del cultivo de tomate. (Santa Ana, ciudad arce, la Libertad). San Salvador, El Salvador.
- Carreón, S. y Leobarda. 2007. Control biológico de organismos Fito patógenos un reto multidisciplinario. Control biológico y retos para el desarrollo tecnológico y comercialización de agentes de control biológico de Fito patógenos. Puerto Vallarta, Jalisco. 78P
- Corbana. 2010. Proyecto demostrativo con implementación de buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de banano ¿Qué tipo de control bilógico existen? Costa rica. P.2
- Cervantes, A. 2007. Microorganismos del suelo benéficos para los cultivos. Universidad de costa rica. Costa Rica. 32P
- Cook, R y Beker, K. 1989. The nature of practice of biological control of plant pathogens. Secod edition. USA. P. 539.
- Dimas, S. 2009. Mal del talluelo en café. Donde se desarrolla el mal de talluelo y las principales formas de manejo de la enfermedad. Colombia. 9P
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- Druzhinina I. y kopchinshiy A. 2006. The first 100 *Trichoderma* species Characterized by molecular data. Mycoscience. P47:55-64
- Dennis, C. 1971. Antagonistic properties of species groups on Trichoderma. I. Reduction of nonvolatile antibiotias. Transaction of the British Mycological Society. P. 25-39.
- Duran, E. y Romero, M. 2007. sensibilidad *in vitro* de cepas de *Trichoderma* aislada de semillas de soja frente al fungicida. MAXIMO XL. Boletín Micológica. 2007. P. 51-54.
- FAO. 2007. (Organización de las naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, Italia). Manual de manejo de postcosecha de frutos tropicales. Técnicas mejoradas de postcosecha del cultivo de tomate y comercialización de la fruta. (Roma, Italia). Roma, Italia.136P
- FAOSTAT. 2014. Statistical Databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. Italia. Disponible desde Internet en: <http://www.fao.org/Faostat/es/#data/QC> (con acceso 27/06/2017)
- FAO. 2003. (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbanas. Importancia económica del cultivo de tomate. (Santiago, chile. 12p).
- Felipe Picardo y Francisco Oliva (2012)., Manejo Integrado del mal del talluelo. Managua, Nicaragua, http://a4n.alianzacacao.org/uploaded/mod_documentos/Manejo%20Integrado%20del%20mal%20del%20talluelo.pdf.2012
- FIA. 2008. (Fundación para la innovación agropecuaria ministerio de agricultura). Resultados y lecciones en biocontrol de enfermedades fungosas con Trichoderma. Proyecto de innovación en regiones de OHiggins y del Maule. Chile. 6P
- French, ER y Hebert, TT. 1982. Metodología de investigación fitopatología. ed. M de la Cruz. Sn José, CR. IICA. 290p
- Harman, G. 2000. Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease P 377-393
- Halman, G. 2001. *Trichoderma* spp, including *T. harzianum*, *T. koningii* , *T. hammatum* and other species. Deuteromycetes. Monoliales (asexual classification system). Disponible en: <http://wwkl.Biocontrol.entomology.Cornell.edu/pathogens/Trichoderma.html>

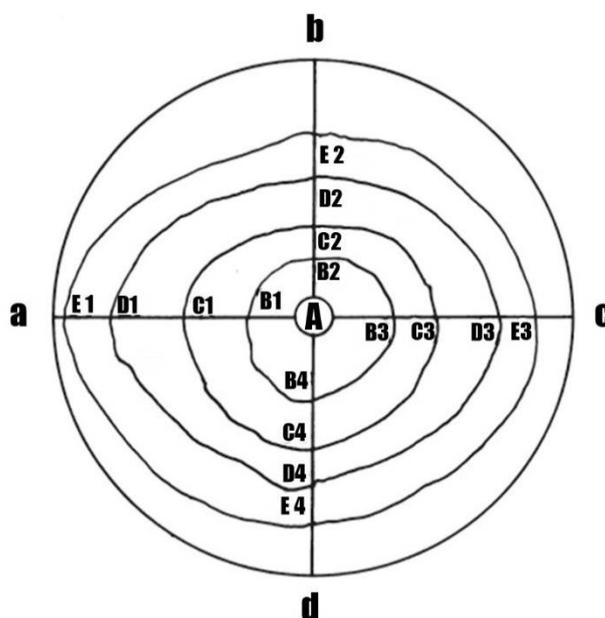
- Hoyos Carvajal, L. y Chaparros, P. 2008. Evaluación de aislamiento de *Trichoderma* spp. Control de *Rhizotonia Solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agronomía. Colombia. P 451-458.
- INTA. 1999 (Instituto Nacional de Tecnología Alimentaria). Cultivo de tomate. Guía tecnológica de tomate. Ed. Henner Obregón N 22 Managua, Nicaragua. 55. P.
- Infante, D. Martínez, B. Gonzales, N. y Reyes. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista científica protección vegetal .24(1). p.14-21.
- Jaramillo, J. 2004. Manual técnico, de buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas de Antioquia. Enfermedades producidas por hongos en el cultivo de tomate. Antioquia, Colombia. 22. P.
- Jones, J.P. 1991. Fusarium wilt. p. 15-16. In: Compendium of Tomato Diseases. J. B. Jones et al. (Eds.). APS PRESS. The American Phytopathological Society. 73p
- Kuhsly K. Lieckfeldt, E. 1997. Revision of *Trichoderma* sect *longibrachiatum* including related teleomorphs on analysis of ribosomal DNA internal transcribe 2 pacer sewenses micologia. pp. 89.-442-460
- Kuhls, Lieckfeldt, Samuels, Chaverri, Samuels y Jaklitsch (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Colegio de postgraduado, México.
- Knudsen G. Bin, L. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat born on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. Phytopathology. P 80. 724-727.
- Lecuona, R. 1996. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. In Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas. Buenos Aires, Talleres gráfico. p. 143-150.
- López, L. 2014. Evaluación del comportamiento agronómico de seis cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) En San Francisco, Cartago. Región central de costa rica. Informe final. San José de Costa rica, proyecto TRICA-INTA. Cartago, costa rica. 2P.
- Lieckfeldt. E. Samuel, G. y Nirenberg, H. A (1997) Morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two specie. Applied And environmental microbiology. p.2418-2428.

- Monardes, H. 2009. Manual técnico del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* mil) Características botánicas, origen. Programa regional de investigación e innovación por cadenas de valores agrícolas (UE/IICA). Universidad de Chile. Chile. 13P.
- Molina, E. 2001. Fertilización del tomate. Centro de investigación agronómica. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 51. P.
- Monzón, A. 2000. Producción y uso de hongos Entomopatógenos. Managua, NI. 63p.
- Mcbeath J. y Adelman M, 1991. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. *Phytopathology*. P. 81.
- Muñoz, B. Sáenz, M. 2016. Compatibilidad de *Trichoderma* Spp. Con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo de tabaco (*N. tabacum* L.) fitosanidad. P 153.
- Nelson, EB. 1991. *Handbook of applied mycology*. Volumen 1. Soil and plants. end arora. DECA Rair. B. Mukesi. KG. Kanutce. G.R. (eds). Current limits to biological control of fungal phytopathogens (pp. 327-355) New York. (Cooperación bananera nacional)
- NESHEV, G. 2008. Major soil-borne phytopathogens on tomato and cucumber in Bulgaria, and methods for their management. In: Labrada, R. (ed). Alternatives to replace methyl bromide for soil-borne pest control in east and central Europe. FAO. p.1-22.
- Nicol, I. Monaco. I. Del Bello, G. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rizotonia solani*: II Micoflora Asociada y Antagonismo invitro de los aislados más frecuentes. RIA. 2002. p 29-44.
- Red SICTA (2008) Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades de frijol en América central p-4
- Ramírez-Villapudua, J. y Sáinz-Rodríguez, R. A. 2010. Manejo Integrado de las Enfermedades del Tomate. "da Edición, Imprenta 11 Ríos. Agrobiológica, S.A. de C.V. Culiacán, Sinaloa, México. 391 páginas
- Rodriguez I. y Arcia, A. 1993. Efecto de doce aislamientos de *Trichoderma* spp sobre el número, tiempo de formulación y porcentaje de parasitismo de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*, en cuatro temperaturas diferentes. P54.
- Reyes, Y. Martínez, B. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de tres aislamientos de *Trichoderma* Spp. Sobre *Rhizoctonia* Sp. Revista científica de protección vegetal. 23(2): p.112-117.

- Royse, DJ; Ries, SM. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathol.* 68, 603-607.
- Samuel GJ. 1996. *Trichoderma* a review of biology and systematic of the genus. *Mycological reeseearch*.pp. 923-935.
- Samuels, GJ. Chaverri, P. Farr, DF. y McCray, EB. 2007. *Trichoderma* (en línea). *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. ARS, USDA. Consultado 02 sep. 2009. Disponible en [http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/Trichoderma Index.cfm](http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm)
- Sánchez, M. 2002. Manejo de enfermedad de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Manejo integrado plagas y enfermedades en tomate y papa. Veracruz, México. 18P.
- Samuels G, Ismaniel A, Bon M (2010). De Respinis S, Petrini O. *Trichoderma asperellum sensu lato* consists of two cryptic species. *Mycologia*.2010;102:944-966.
- Seminis Vegetable Sedes. 2005. Manejo y control de la enfermedad mal del talluelo en hortalizas sintomatología de la enfermedad. Texas, México. Nota#. 540.
- Villegas M. *Trichoderma* (2005). Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/tecnica/128-Trichoderma-pers-caracteristicas-y-supotencialbiologico-en-la-agricultura-sostenible> [Consultado: 11 de marzo 2010].
- Wilson, M. y Bateman, PA. 1998. Handbook of pest management en J.R Rubosan. (ed). *Biological control of plants pathogens* (pp.309-335). New York.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Esquema de medición del radio de crecimiento de aislados de *Trichoderma* spp. Siguiendo la metodología descrita por (French y Hebert 1982).



Anexo 2. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en PDA a las 12 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	145.42	16.1577	6.06	<0.0001
Error	40	106.6	2.665		
Total	49	252.02			

R²: 0.57; CV: 51.98

Anexo 3. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en PDA a las 24 horas después de inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	401.925	44.658	9.37	<0.0001
Error	40	190.70	4.767		
Total	49	592.625			

R²: 0.68; CV: 15.99

Anexo 4. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en PDA a las 36 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	523.12	58.124	3.05	<0.0071
Error	40	762.00	19.05		
Total	49	1285.12			

R²: 0.41; CV: 23.9

Anexo 5. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en PDA a las 48 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	124.98	13.886	2.23	<0.04
Error	40	249.10	6.227		
Total	49	374.08			

R²: 0.33; CV: 14.08

Anexo 6. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en PDA a las 60 horas después de inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	29.48	3.275	1.22	<0.309
Error	40	107.20	2.680		
Total	49	136.68			

R²: 0.21; CV: 9.13

Anexo 7. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en SDA a las 12 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	67.945	7.549	5.08	<0.0001
Error	40	59.4	1.485		
Total	49	127.345			

R²: 0.53; CV: 76.64

Anexo 8. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en SDA a las 24 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	362.325	40.258	4.45	<0.0004
Error	40	9.045	9.045		
Total	49	724.125			

R²: 0.50; CV: 26.49

Anexo 9. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en SDA a las 36 horas después de la inoculación,

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	625.112	69.456	5.88	<0.0001
Error	40	472.792	11.819		
Total	49	1097.904			

R²: 0.57; CV: 18.93

Anexo 10. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en SDA a las 48 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	119.205	13.245	1.49	<0.185
Error	40	355.60	8.890		
Total	49	474.805			

R²: 0.25; CV: 16.72

Anexo 11. Análisis de varianza del crecimiento radial de *Trichoderma* spp en SDA a las 60 horas después de la inoculación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Aislados	9	36.325	4.036	1.14	<0.359
Error	40	141.80	3.545		
Total	49	178.125			

R²: 0.20; CV: 9.78

Anexo 12. Análisis de varianza y comparación de medias (Tukey 0.05) para la evaluación de aislados de *Trichoderma* spp para el control de mal de talluelo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Modelo	9	186.67	20.74	12.26	0.0001
Tratamiento	9	186.67	20.74	12.26	0.0001
Error	30	50.76	1.69		
Total	39	237.43			

($R^2 = 0.79$ CV= 39)

Aislado	Media	Categoría	n	EE
F4M3	1.13	A	4	0.65
F7M3	2.25	A	4	0.65
F10M2	2.38	A	4	0.65
F3M2	2.48	A	4	0.65
F1M2	2.50	A	4	0.65
F6M2	3.00	A	4	0.65
F2M1	3.08	A	4	0.65
F8M1	3.18	A	4	0.65
F9M3	3.55	A	4	0.65
F5M1	9.5	B	4	0.65

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)