



UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
CARRERA DE AGRONOMÍA

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO.

**Título: Evaluación de dos cepas de *Trichoderma spp.* para el tratamiento de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L).**

Autor: Roberto Falcón González

Tutor: MSc. Roberto León Aguilar

Tutora: MSc. Marialys Trujillo Arbelo

Curso: 2017-2018

Matanzas

## **Frase**

“La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza”

Albert Einstein.

## **DECLARACIÓN DE AUTORIDAD**

Declaro que yo Roberto Falcón González soy el único autor de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo con la finalidad que estime conveniente.

---

Firma

## **AGRADECIMIENTO**

A mis padres por todo su apoyo, dedicación y ejemplo durante toda la vida.

A mi tutor Roberto por su paciencia, entrega y dedicación.

A todos los profesores de la facultad por su entrega, de esta manera transmiten a los estudiantes su amor hacia la carrera.

A todos mis compañeros de aula por las experiencias compartidas durante cinco años.

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que de una forma u otra ayudaron en la confección de este trabajo.

## **OPINIÓN DEL TUTOR**

La producción de granos crece aceleradamente en el país, y es el frijol uno de los cultivos fundamentales en esta estrategia del estado cubano, constituyendo en la actualidad, junto al arroz dos de los principales alimentos priorizados por el Ministerio de la Agricultura. Cuba pretende producir más del 70 % de sus necesidades para el consumo y el mayor aporte de estas producciones será realizado por los campesinos, los que desconocen muchas de las técnicas que son necesarias introducir, para lograr producciones sostenibles y más sanas, de aquí la relevancia de la necesidad de la ejecución de investigaciones en las condiciones productivas de sus fincas, con la finalidad de seleccionar las mejores variedades, conservación y tratamientos de las semillas con productos biológicos, disminuyendo la incidencia de plagas y logrando producciones más limpias y sostenibles, sin contaminación del medio ambiente. Por todas estas razones la tesis presentada por el estudiante Roberto Falcón. Posee un gran valor científico, por el aporte dado al tratamiento de las semillas, utilizando un producto biológico, el que puede ser empleado por los campesinos para proteger sus simientes, en ese inicio de su desarrollo en que son afectadas por diferentes fitopatógenos presentes en el suelo y la propia semilla y con ello conseguir un mayor porcentaje de germinación y desarrollo saludable de las plantas. El estudiante mostró independencia, dedicación y esfuerzo en la ejecución de su tesis, por lo que solicito al tribunal la máxima calificación.

Profesor: Roberto León Aguilar

## RESUMEN

El trabajo de investigación se desarrolló en condiciones de Laboratorio y semi-controladas en el Área de Fitopatología del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, de la Provincia de Matanzas. Para la investigación se utilizaron cuatro variedades de frijol (Tomeguín 93, BAT-58, BAT-93 y Delicia 365), cultivadas por los campesinos. De cada lote se analizaron 100 semillas mediante el método de ensayo biológico de crecimiento en cámara húmeda (*blotter test*) (ISTA, 2016). Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl 1%) por 1 min. Se usó para la siembra el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), en el caso de *Aspergillus*, cultivos monoconidiales de los diferentes aislados fueron inoculados en placas de Petri con Agar Czapek Extracto de Levadura y en Agar Extracto de Malta. Las cepas de ***Trichoderma*** procedían de la Planta de Bioplaguicidas de Matanzas. Se realizaron ensayos para detectar posibles efectos antagónicos entre tres las cepas de ***Trichoderma spp*** y hongos fitopatógenos aislados de las semillas de frijol. En las pruebas de crecimiento, *A. flavus* alcanzaba los 8,5 cm de crecimiento radial hifal, muy próximo al borde de la placa Petri, el menor crecimiento en este momento fue para *A. niger*. La cepa A-53 mostró los mejores resultados en sus enfrentamientos sobre los diferentes aislamientos de semillas de frijol. Los análisis de varianza se realizaron utilizando el paquete estadístico Stargraphic versión 5,0. Las medias fueron comparadas por el test de rangos múltiples de Duncan con 5 % de error.

## INDICE

### Tabla de contenido

<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivos específicos .....	6
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b> .....	7
<b>2.1 Características del Cultivo</b> .....	7
<b>2.2. Origen</b> .....	8
<b>2.3. Incidencia de fitopatógenos en el frijol</b> .....	9
<b>2.4- <i>Trichoderma</i>. Clasificación Taxonómica</b> .....	16
<b>2.5- Mecanismo de acción de <i>Trichoderma</i> frente a hongos fitopatógenos</b> .....	19
<b>2.4.1. Antibiosis</b> .....	21
<b>2.4.2. Micoparasitismo</b> .....	22
<b>2.4.3. Competencia</b> .....	24
<b>2.6. Importancia de <i>Trichoderma spp.</i> Como alternativa de lucha en la agricultura.</b> .....	25
<b>2.7. Uso de <i>Trichoderma spp</i> en lucha biológica de fitopatógenos en el suelo.</b> .....	31
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
<b>3.1. Incidencia, aislamiento e identificación de hongos filamentosos</b> ... 34	
<b>3.2. Determinación de la eficiencia biológica de cepas de <i>Trichoderma spp</i> sobre la germinación y protección de las semillas de frijol común.</b> .....	38
<b>3. 3. Compatibilidad de <i>Trichoderma spp</i> en aplicación con TMTD.</b> .....	39
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>4.1. Comportamiento del crecimiento hifal las cepas de <i>Trichoderma spp</i> TS-3, A-53 y A-34 en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Y los fitopatógenos aislados de las semillas.</b> .....	40
<b>4.2 Eficiencia biológica de cepas de <i>Trichoderma spp</i> como antagonista frente a fitopatógenos aislados de las semillas de frijol <i>S. rolfsii</i> y <i>F. solani</i>.</b> .....	43
<b>4.2.1 Eficiencia biológica de cepas de <i>Trichoderma spp</i> como antagonista frente a fitopatógenos aislados de las semillas de frijol <i>A. flavus</i>, <i>A. niger</i> y <i>Rh. solani</i>.</b> .....	48



<b>4.3. Determinación de la eficiencia biológica de cepas de <i>Trichoderma spp</i> sobre la germinación y protección de las semillas de frijol común.</b>	56
<b>4. 4. Compatibilidad de <i>Trichoderma spp</i> en aplicación con TMTD</b>	56
V.CONCLUSIONES	58
VI.RECOMENDACIONES	59
VII.BIBLIOGRAFIA	60

## I. INTRODUCCIÓN

Las semillas durante su germinación pueden ser atacadas por hongos y otros patógenos habitantes del suelo o por los que son llevados por la semilla.

Muchos productores al recoger la cosecha, guardan semillas para la próxima siembra, y no les dan la suficiente cobertura de conservación, para que éstas conserven su potencial germinativo y productivo. Esto trae como consecuencia que varias especies de hongos fitopatógenos ataquen dichas semillas con relativa facilidad, logrando una significativa pérdida de sus cualidades botánicas y productivas.

La semilla, por lo tanto, está directamente relacionada en la continuidad del ciclo biológico de los fitopatógenos de una generación a otra del hospedante.

El tratamiento de semillas con fungicidas trata de evitar el ataque de hongos, sin embargo, el precio de estos productos comerciales se ha ido incrementando considerablemente por lo que se busca experimentar en técnicas más ecológicas, económicas y viables.

Existe referencia que cepas de *Trichoderma* capaces de colonizar la superficie de la raíz y de la rizosfera a partir de las semillas tratadas y de las plantas adultas existentes en el suelo, protegiendo a las mismas de enfermedades fungosas. Así las semillas reciben una cobertura protectora cuyo efecto se muestra cuando la misma es plantada en el sustrato correspondiente.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es la especie de fabácea más importante para Cuba, durante el 2018 se cosecharon en el país 118 410 ha para una producción de 132 174 toneladas del grano, (FAOSTAT, 2018). y la provincia de Matanzas fue una de las que más contribuyó a este resultado, fundamentalmente a partir de las producciones de los campesinos, muchos de los cuales no adquieren una semilla certificada.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es uno de los cultivos más antiguos cosechados en el mundo, con una gran importancia desde el punto de vista social, económico y alimenticio en muchos países, principalmente en Centro y Suramérica (Torres *et al.*, 2009). Es dentro del grupo de las fabáceas comestibles, la especie más importante para Cuba y junto con el arroz (*Oryza sativa* L.) conforma la base de la dieta diaria del cubano (Nerey *et al.*, 2010).

Además, para el país es uno de sus principales cultivos; el tercero con mayor área sembrada después del arroz y el maíz (*Zea mays* L.).

La mayoría de los hongos fitopatógenos asociados al frijol emplean las semillas como vehículos de introducción en nuevas áreas donde bajo condiciones favorables pueden causar pérdidas considerables en el cultivo.

Los hongos asociados a las semillas provocan la pérdida de su calidad, ya que afectan la viabilidad y reducen su germinación (Ghangaokar y Kshirsagar, 2013). Estos hongos inciden principalmente en el campo (fitopatógenos) o durante su almacenamiento o conservación (de almacén). Los hongos que contaminan las semillas en el campo usualmente permanecen inactivos durante su almacenamiento. Sin embargo, los que inciden en almacén, producen afectaciones debido a su capacidad de crecer en condiciones de baja humedad en la cuales la mayoría de los hongos no consiguen desarrollarse.

La mayor parte de los hongos fitopatógenos que afectan al frijol emplean las semillas como vía de introducción en nuevas áreas donde bajo condiciones favorables pueden causar pérdidas considerables en el cultivo. A pesar de que en Cuba se han realizado varios estudios relacionados con la microbiota asociada a semillas de frijol (Nerey *et al.*, 2010), ninguno refleja la incidencia por variedad de las diferentes especies fúngicas asociadas a este tipo de semilla, lo que permitiría la selección de variedades con el objetivo de reducir la incidencia de estos patógenos y disminuir los costos de producción dirigidos al control fitosanitario.

En Cuba, el consumo de frijol goza de una larga tradición y gran demanda. Constituye uno de los granos fundamentales en la alimentación del pueblo, siendo un alimento de preferencia en la dieta diaria, al menos en una de las comidas. Su aceptable contenido de proteínas lo sitúan como un cultivo estratégico del país. Sin embargo, existe la necesidad de explotar todos los recursos posibles para incrementar los niveles de producción actuales si se quiere mantener los índices de consumo establecidos sin incrementar los niveles de importación, Urge entonces aumentar los rendimientos del cultivo, que según Chailloux *et al.* (2006), en América Latina se obtiene solo un 20 % de su rendimiento potencial, motivado por las deficiencias nutricionales unido a la incidencia de plagas, entre las que se destacan los hongos del suelo.

Un factor que incide en los bajos rendimientos y los altos costos de producción es la elevada incidencia de organismos nocivos que se convierten con frecuencia en plagas (Blanco y Leyva, 2010). Lo más importante en estos momentos para lograr el propósito anterior, es que el incremento de la producción se logre con bajos costos, sin afectar el medio ambiente.

Una de las razones por las que se obtienen bajos rendimientos y altos costos de producción para el frijol en Cuba, es la elevada incidencia de organismos nocivos que están presente en el cultivo desde las primeras fases vegetativas, muchas producen daños directos importantes disminuyendo el área fotosintética de la planta.

Con frecuencia, estos organismos se convierten en plagas y causan severos daños; además, para controlarlas se incurren en gastos elevados, que parten principalmente del uso de productos químicos sintéticos, los que en su mayoría son importados por el país.

Una estrategia clave en la agricultura sustentable es la de restaurar la biodiversidad agrícola, perdida con la agricultura moderna, la cual constituye un problema serio en la actualidad, que tiene su máxima expresión en la forma de monocultivos. Los investigadores han advertido en reiteradas ocasiones acerca de la extrema vulnerabilidad que tiene la uniformidad genética. En ninguna parte es más evidente la consecuencia de la reducción de la biodiversidad que en el ámbito del control de plagas de los cultivos.

Durante mucho tiempo se ha ido buscando solución a los problemas fitosanitarios de este cultivo con vistas a elevar su producción. Esto ha incitado a los productores introducirse en la búsqueda de vías sostenibles, que responda de forma eficiente en este empeño. Uno de los métodos que ha tomado auge se basa en la reducción de inóculos o la actividad del fitopatógeno por la presencia natural de uno o más antagonista en la rizosfera (Willer y Kilcher, 2008).

Proteger el medio ambiente, así como intensificar las interacciones biológicas y los procesos naturales beneficiosos, son alternativas que hoy se defienden con el objetivo de disminuir las altas cargas tóxicas que reciben los productos alimenticios, que utilizamos en nuestra dieta familiar por ello, es que frente a una

agricultura basada en subsidios energéticos, ha surgido la corriente de la restauración y conservación de los agroecosistemas, aplicando los principios biológicos que lo generaron (Leyva y Pohlan, 2005).

En la actualidad se trabaja en la búsqueda de cepas de *Trichoderma* que sean eficaces en la lucha biológica de diferentes patógenos de las plantas, se han obtenidos buenos resultados en papa, cebolla, guayaba, tomate y otros. Ello motiva la posibilidad de ser utilizado como antagonista de diferentes fitopatógenos del frijol, desde el tratamiento a las semillas y después dirigidos al suelo y las plantaciones con los que se han obtenidos resultados alentadores. La presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas, forestales y en barbechos), se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, su aplicación en el cultivo del frijol pudiera reforzar su actividad antagónica y disminuir la incidencia de diferentes fitopatógenos.

Según (Cruz-Triana et al., 2018) *Trichoderma spp* 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.

Varias de estas especies de hongos, donde se han obtenido resultados investigativos favorables con la aplicación de diferentes cepas de *Trichoderma*, son reportados para el cultivo de frijol, por lo que, si utilizamos como estrategia, utilizar este antagonista en el tratamiento de las semillas y posteriormente continuamos con las aplicaciones en campo, podremos disminuir la alta carga tóxica que hoy recibe este cultivo.

En Cuba el frijol común (*Ph. vulgaris*) es atacado por un grupo importante de fitopatógenos del suelo, que producen la pudrición de la raíz y la base de la planta de frijol, la que es causada por un complejo de hongos, entre los que se

encuentran *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium*. *Fusarium* es un habitante común del suelo y el más diverso ya que tiene más de 30 especies.

En investigaciones realizadas por (Cruz-Triana *et al.*, 2018) reportan que los primeros síntomas de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. phaseoli (Burk.) Snyder y Hans. se manifestaron en el cultivo de frijol, a partir de 24 días después de germinado; observaron la marchitez y amarillamiento prematura de las plantas, con lesiones longitudinales de color café rojizo en la raíz primaria. A los 54 días después de germinado lo encontraron sobre el haz de las hojas se observaron pústulas de color pardo-rojizo.

*Sclerotium rolfsii* Sacc. es un hongo fitopatógeno habitante del suelo con más de 500 hospederos, donde el frijol en Cuba constituye uno de los principales. Su distribución es mundial, con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Ataca desde plántulas, plantas herbáceas, plantas leñosas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo. Se considera importante en el sureste de Estados Unidos en algodón (*Gossypium hirsutum* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), tomate (*Solanum lycopersicon* Mill.), y remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Johnson *et al.*, 1999).

Otro de los hongos aislados de la semilla de frijol fue *Rhizoctonia solani*, es una enfermedad que se presenta en zonas cálidas y húmedas, cuando las siembras de frijol coinciden con lluvias abundantes. En condiciones favorables este hongo puede destruir completamente el cultivo de frijol en pocos días. La lluvia es necesaria para que los esclerocios y micelios presentes en el suelo sean diseminados por el salpique a la parte inferior de la planta, iniciándose así el ciclo de la enfermedad con la penetración en las hojas de la planta.

La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, confiere a *Trichoderma spp* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica para la obtención de cepas y productos comerciales más eficaces. Así también podrá ser utilizado en el tratamiento de semillas de frijol, con una técnica muy sencilla que sería peletizar las simientes con las cepas más efectivas que se obtengan de esta investigación.

## **Problema científico**

La incidencia de hongos fitopatógenos en las semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L), ocasionan importantes pérdidas en este cultivo, desde el mismo momento en que se produce su siembra, y las aplicaciones de fungidas en su tratamiento, además de encarecer el mismo contaminan el ambiente.

## **Hipótesis**

La búsqueda de cepas de *Trichoderma spp* que tengan efectos antagonistas para el tratamiento de las semillas, resultará una alternativa económicamente viable, con un mínimo impacto ambiental.

## **Objetivo General**

Evaluar la eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma spp* como antagonista frente a diferentes aislamientos de hongos fitopatógenos presentes en las semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L).

## **Objetivos específicos:**

Aislar cepas puras de seis especies de hongos fitopatógenos de un lote de semilla de frijol (***Phaseolus vulgaris* L**), comprado por los campesinos a la Empresa Provincial de semillas de Jovellanos. Matanzas.

Evaluar tres cepas de *Trichoderma* en enfrentamiento *in Vitro* contra hongos fitopatógenos aislados de semillas de frijol común (***Phaseolus vulgaris*L**).

Comprobar el efecto de tres cepas de *Trichoderma* en la germinación y protección de las semillas de frijol común (***Phaseolus vulgaris*L**).

Comprobar la compatibilidad de *Trichoderma* con el fungicida TMTD.

A los resultados de las observaciones se les realizó análisis de varianza simple mediante el uso del paquete estadístico Stargraphic versión 5,0 y se les hizo la prueba de comparaciones múltiples de Duncan con un 95 % de confiabilidad.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Características del Cultivo

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es la especie de fabácea más importante para Cuba, durante el 2018 se cosecharon en el país 118 410 ha para una producción de 132 174 toneladas del grano, (FAOSTAT, 2018) y la provincia de Matanzas fue una de las que más contribuyó a este resultado, fundamentalmente a partir de las producciones de los campesinos, muchos de los cuales no adquieren una semilla certificada, lo que trae como consecuencia disminución en los porcentos de germinación y pérdidas en sus producciones.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es uno de los cultivos más antiguos cosechados en el mundo, con una gran importancia desde el punto de vista social, económico y alimenticio en muchos países, principalmente en Centro y Suramérica (Torres *et al.*, 2009). Es dentro del grupo de las leguminosas comestibles, la especie más importante para Cuba y junto con el arroz (*Oryza sativa* L.) conforma la base de la dieta diaria del cubano (Nerey *et al.*, 2010).

Además, para el país es uno de sus principales cultivos; el tercero con mayor área sembrada después del arroz y el maíz (*Zea mays* L.). Es el frijol común el de mayor importancia debido a su adaptabilidad a los diferentes climas y suelos de nuestro país. Constituye una fuente proteica de alta digestibilidad, constituida por varios aminoácidos esenciales para el metabolismo humano entre ellos isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, triptófano y varía entre 20 y 30%. Además, puede considerarse también como alimento de alto valor energético, ya que contiene de 45 a 70% de carbohidratos totales por aportar cantidades importantes de minerales. En las distintas variedades no existen diferencias notables de estos contenidos.

Este cultivo posee una extraordinaria importancia para la alimentación humana, pues además de constituir una fuente esencial de proteína, forma parte de los hábitos alimentarios de la población. En Cuba, las condiciones edafoclimáticas son favorables para su cultivo, se produce en todo el territorio nacional.

En Cuba, el consumo de frijol goza de una larga tradición y gran demanda. Constituye uno de los granos fundamentales en la alimentación del pueblo, siendo un alimento de preferencia en la dieta diaria, al menos en una de las comidas. Su aceptable contenido de proteínas lo sitúan como un cultivo



estratégico del país. Sin embargo, existe la necesidad de explotar todos los recursos posibles para incrementar los niveles de producción actuales si se quiere mantener los índices de consumo establecidos sin incrementar los niveles de importación, Urge entonces aumentar los rendimientos del cultivo.

Una estrategia clave en la agricultura sostenible es la de restaurar la biodiversidad agrícola, perdida con la agricultura moderna, la cual constituye un problema serio en la actualidad, que tiene su máxima expresión en la forma de monocultivos. Los investigadores han advertido en reiteradas ocasiones acerca de la extrema vulnerabilidad que tiene la uniformidad genética. En ninguna parte es más evidente la consecuencia de la reducción de la biodiversidad que en el ámbito del control de plagas de los cultivos.

## **2.2. Origen**

Los frijoles comunes según plantea la literatura comenzaron a cultivarse hace aproximadamente 7000 años A.C. en el sur de México y Guatemala y es uno de los alimentos más antiguos que el hombre conoce; ha formado parte importante de la dieta humana desde hace miles de años.

En México, los nativos cultivaron los frijoles blancos, negros, y todas las demás variedades de color. También semillas pequeñas y semillas grandes. Puesto que las culturas Mesoamericanas de México cruzaron al continente americano, estos frijoles y las prácticas de cultivo se propagaron poco a poco por toda Suramérica a medida que exploraban y comercializaban con otras tribus.

Cuando los conquistadores de la Península Ibérica llegaron al Nuevo Mundo, florecieron diversas variedades de frijoles. Cristóbal Colón les llamó faxónes y fabas por su parecido a las habas del viejo mundo; los aztecas los llamaron etl, los mayas búul y quinsoncho, los incas purutu, los cumanagotos de Venezuela caraotas, en el Caribe les denominaban cunada y los chibchas jistle o histe. Los primeros exploradores y comerciantes llevaron posteriormente las variedades de frijol americano a todo el mundo, y a principios del siglo XVII, los frijoles ya eran cultivos populares en Europa, África y Asia (Treviño y Rosa, 2013). Estos mismos autores plantean que Independientemente de la variedad, la producción del frijol común se ve comprometida por una serie de factores que se clasifican como

bióticos (seres vivos con los que se relaciona) y abióticos (ambientales, físicos y químicos).

Son numerosas las variedades de frijoles comerciales en Cuba entre las más destacadas están: "GÜIRA 89", "CUBA C 25-9", "Velazco Largo", Tomeguín 93, 'BAT-58', 'BAT-93' y 'Delicia-365 entre otras muchas que se cultivan en Cuba.

Cardona., *et al* (2013) plantean que el conocimiento sobre los procesos y mecanismos de tolerancia a factores de estrés de tipo abiótico (sequía) y los efectos perjudiciales en especies cultivadas, particularmente en aquellas sometidas a condiciones de déficit hídrico, ayudará a mejorar su comportamiento agronómico mediante la incorporación de caracteres relacionados con la tolerancia a la sequía, en los nuevos cultivares.

### **2.3. Incidencia de fitopatógenos en el frijol**

Durante mucho tiempo se ha ido buscando solución a los problemas fitosanitarios de este cultivo con vistas a elevar su producción. Esto ha incitado a los productores introducirse en la búsqueda de vías sostenibles, que responda de forma eficiente en este empeño. Uno de los métodos que ha tomado auge se basa en la reducción de inóculos o la actividad del fitopatógeno por la presencia natural de uno o más antagonista en la rizosfera (Willer y Kilcher, 2008).

Proteger el medio ambiente, así como intensificar las interacciones biológicas y los procesos naturales beneficiosos, son alternativas que hoy se defienden con el objetivo de disminuir las altas cargas tóxicas que reciben los productos alimenticios, que utilizamos en nuestra dieta familiar por ello, es que frente a una agricultura basada en subsidios energéticos, ha surgido la corriente de la restauración y conservación de los agroecosistemas, aplicando los principios biológicos que lo generaron (Leyva y Pohlen, 2005).

Las semillas constituyen para un gran número de cultivos el punto de partida que marca el futuro de la cosecha por lo que su sanidad es cuestión de primer orden. Las semillas infectadas son la vía principal de diseminación de hongos, virus y bacterias, los que pueden ocasionar pérdidas entre 40-60 % en los rendimientos y sobrevivir desde meses hasta más de 25 años en condiciones de almacenamiento.

Entre los principales hongos que afectan las semillas se encuentran *Alternaria solani* (Ell.et Mart.), *Alternaria alternata* Nees, *Alternaria* spp., *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium solani* (Mart), *Fusarium* spp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Estos patógenos pueden localizarse en la parte exterior e interior de la semilla, produciendo diferentes síntomas como enanismo, exudaciones y bajo poder germinativo. En ocasiones, la semilla puede estar infectada y no presentar síntomas.

Existen diferentes métodos para el control de patógenos en semillas y se conoce que la aplicación de *Trichoderma* sp. a las mismas ocasiona la multiplicación del antagonista en el suelo y/o en la zona radical de la planta para inhibir al patógeno por medio de competencia, micoparasitismo y/o antibiosis.

Entre los factores bióticos más desfavorables para alcanzar altos niveles de producción están las plagas, las que en este cultivo son numerosas y producen daños cuantiosos en las diferentes fases fenológicas del cultivo.

En investigaciones realizadas por (Cruz-Triana *et al.*, 2018) reportan que los primeros síntomas de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. phaseoli (Burk.) Snyd. y Hans. se manifestaron en el cultivo de frijol, a partir de 24 días después de germinado; observaron la marchitez y amarillamiento prematura de las plantas, con lesiones longitudinales de color café rojizo en la raíz primaria. A los 54 días después de germinado lo encontraron sobre el haz de las hojas se observaron pústulas de color pardo-rojizo.

En observaciones de campo pudimos comprobar como este fitopatógeno puede destruir la semilla antes y después de la germinación, las partes afectadas presentan lesiones de color café rojizo que cubren todo el grano, los haces vasculares son afectados y cuando la lesión es severa en el interior del tallo aparecen masas de micelio de color amarillo-rosado o café. Las plantas atacadas se marchitan empezando por un amarillamiento de las hojas inferiores para luego secarse y morir.

En Cuba el frijol común (*Ph. vulgaris*) es atacado por un grupo importante de fitopatógenos del suelo, que producen la pudrición de la raíz y la base de la planta de frijol, la que es causada por un complejo de hongos, entre los que se

encuentran *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium*. *Fusarium* es un habitante común del suelo y el más diverso ya que tiene más de 30 especies.

*Sclerotium rolfsii* Sacc. es un hongo fitopatógeno habitante del suelo con más de 500 hospederos, donde el frijol en Cuba constituye uno de los principales. Su distribución es mundial, con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Ataca desde plántulas, plantas herbáceas, plantas leñosas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo. Se considera importante en el sureste de Estados Unidos en algodón (*Gossypium hirsutum* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), tomate (*Solanum lycopersicon* Mill.), y remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Johnson *et al.*, 1999).

En frijol común (*Ph. vulgaris*) este patógeno ocasiona amarillamiento, marchitez, caída de las hojas y finalmente la muerte de la planta. En el cuello de la raíz se observa una lesión necrótica y, sobre los tejidos afectados, un crecimiento micelial blanco conteniendo los esclerocios del hongo, inicialmente blancos que se tornan color marrón oscuro posteriormente (Hernández *et al.*, 2012).

También (Araya *et al.*, 2009) exponen la sintomatología característica de este hongo es: en las hojas: manchas que se originan en el envés y que están delimitadas por las nervaduras, luego evolucionan hasta convertirse en lesiones grisáceas que más tarde se tornan de color marrón y carecen de coloración en los bordes. La ausencia de color en la hoja y la angularidad de las manchas constituyen características inequívocas para un diagnóstico de esta enfermedad. Las lesiones pueden ser tan numerosas como para causar una defoliación prematura.

En los tallos, ramas, pecíolos: las lesiones son elongadas y marrones. En las vainas: las lesiones, que son menos frecuentes que en las hojas, son superficiales al principio y tienen márgenes casi negros con centro marrón-rojizo, siendo ambos netamente definidos.

*Rhizoctonia solani* Frank (Donk), conocida también como Mustia, Telaraña, Quemazón, Hielo Negro, según el país donde se presente, es una enfermedad que se presenta en zonas cálidas y húmedas, cuando las siembras de frijol coinciden con lluvias abundantes. En condiciones favorables este hongo puede destruir completamente el cultivo de frijol en pocos días. La lluvia es necesaria

para que los esclerocios y micelios presentes en el suelo sean diseminados por el salpique a la parte inferior de la planta, iniciándose así el ciclo de la enfermedad con la penetración en las hojas de la planta.

Las lesiones causadas por el micelio aparecen en las hojas primarias como pequeñas áreas necróticas (5 a 10 mm de diámetro) con el centro marrón y bordes verde claro. Posteriormente, se desarrollan y forman lesiones de mayor tamaño en forma irregular, borde definido y líneas oscuras finas en la periferia de la lesión. En condiciones de alta humedad relativa (80%), temperaturas de 25-27° C se desarrolla un micelio marrón a partir de la lesión que avanza sobre la superficie de la hoja, los pecíolos, flores y vainas.

Se puede observar que las hojas se adhieren entre sí por medio del micelio; así mismo, cuando éstas mueren, se mantienen colgando por los hilos del micelio. El avance de la enfermedad llega y seca completamente las flores, las vainas y la planta. Las basidiosporas, que son las esporas producidas por el estado asexual del hongo, producen en las hojas y en las vainas los síntomas conocidos como ojo de gallo. Estos síntomas se caracterizan por ser lesiones pequeñas, casi circulares de color café con un borde rojizo ladrillo.

El patógeno puede sobrevivir sobre residuos de la cosecha o en hospederos alternos y tiene la capacidad de transmitirse por la semilla. Dependiendo del grado de severidad de la enfermedad la planta puede llegar a morir.

En general, las ventajas del control biológico incluyen el nulo o reducido riesgo que representan para el productor y los trabajadores de campo que los aplican, así como la carencia de residuos en el producto vendido y bajo riesgo de contaminación ambiental (Lenteren, 2000). El hecho de que el consumidor demande alimentos libres de plaguicidas también estimula el uso del control biológico (Lenteren, 2000).

Una de las alternativas para superar la incapacidad de la mayoría de agentes de control biológico para ser efectivos bajo diversas condiciones ambientales es aplicarlos en mezcla o en alternación con fungicidas químicos o aplicar más de un agente de biocontrol en un mismo tiempo (Shtienberg y Elad, 2002). Esta integración se puede conseguir considerando los factores bióticos y abióticos en los sistemas agrícolas (Shtienberg y Elad, 2002). Otra propuesta para superar la

variabilidad del control biológico es aplicar agentes de control biológico que presenten diversos modos de acción que sean complementarios (Shtienberg y Elad, 2002).

En la actualidad a nivel internacional se comercializan muchos microorganismos tales como especies de bacterias, levaduras y hongos filamentosos para el control de fitopatógenos del suelo, foliares y de pos cosecha de frutas principalmente. El número de microorganismos comercializados ha crecido en los últimos años y en el mercado se encuentran ahora alrededor de 52 productos biológicos de este tipo, desarrollados y registrados en diferentes países del mundo (EPA).

La rotación de cultivos es un método de control utilizado que sólo proporciona una reducción parcial del inóculo del patógeno. El tratamiento químico de las semillas puede eliminar parcialmente el problema al controlar el inóculo presente en ellas, pero sin ocasionar mayor efecto contra el patógeno en el suelo. La resistencia genética como alternativa de control, a pesar de ser la de más fácil aplicación, es una solución de difícil desarrollo, en especial para hongos vasculares, por la complejidad del medio en que se presenta la interacción patógeno-hospedero y por el tiempo que toma la obtención de variedades resistentes.

Por ello, ante las limitaciones en el manejo de la enfermedad, surge la necesidad de plantear alternativas sustitutivas o complementarias a las existentes, como el control biológico, importante para la recuperación del equilibrio de los agroecosistemas y para el aprovechamiento del potencial antagonista natural de ciertos microorganismos contra fitopatógenos vulnerables.

La mayor parte de los hongos fitopatógenos que afectan al frijol emplean las semillas como vía de introducción en nuevas áreas donde bajo condiciones favorables pueden causar pérdidas considerables en el cultivo. A pesar de que en Cuba se han realizado varios estudios relacionados con la microbiota asociada a semillas de frijol (Sandoval y López, 2000; Díaz *et al.*, 2005; Nerey *et al.*, 2010), ninguno refleja la incidencia por variedad de las diferentes especies fúngicas asociadas a este tipo de semilla, lo que permitiría la selección de variedades con el objetivo de reducir la incidencia de estos patógenos y disminuir los costos de producción dirigidos al control fitosanitario.

Los hongos asociados a las semillas provocan la pérdida de su calidad, ya que afectan la viabilidad y reducen su germinación (Ghangaokar y Kshirsagar, 2013). Estos hongos inciden principalmente en el campo (fitopatógenos) o durante su almacenamiento o conservación (de almacén). Los hongos que contaminan las semillas en el campo usualmente permanecen inactivos durante su almacenamiento. Sin embargo, los que inciden en almacén, producen afectaciones debido a su capacidad de crecer en condiciones de baja humedad en las cuales la mayoría de los hongos no consiguen desarrollarse.

En estudios realizados por (Martínez *et al.*, 2014), donde evaluó 102 lotes de semilla de frijol, de 16 variedades provenientes de las provincias de Pinar del Río, Mayabeque y Artemisa. identificó 679 aislados fúngicos pertenecientes a 34 especies de 20 géneros. Las especies de mayor frecuencia de aparición fueron *Penicillium* sp. (78.4%), *Rhizoctonia solani* (77.5%), *Aspergillus niger* (68.6%) y *Fusarium solani* (51.0%). Además, identificó nueve especies de *Fusarium* y seis de *Aspergillus*. Detectó la presencia de *Sclerotinia sclerotiorum* en las variedades 'BAT-58', 'BAT-93' y 'Delicia-365. De estas 'BAT-93' fue en la que se detectó mayor porcentaje de semillas infectadas (3%). Este trabajo constituyó el primer informe de la incidencia de *S. sclerotiorum* en semillas cubanas de frijol.

En otros resultados (Martínez *et al.*, 2014), reportaron los géneros, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp., los que son considerados hongos de incidencia en almacén (Amadi y Adeniyi, 2009) los cuales no tienen gran importancia durante el ciclo del cultivo, pero afectan negativamente la calidad de la semilla y su germinación. En el estudio realizado *Penicillium* sp. Fue identificado en el 78,4% de las muestras analizadas con porcentajes de infección entre un 1.5-23% y alcanzó el valor máximo en la variedad 'Delicia-364'. Detectaron dos especies de *Alternaria* (*A.alternata* y *A. tenuissima*) y seis de *Aspergillus*. A pesar de que *A.alternata* puede ser considerado un hongo de almacén, tiene incidencia en campos de frijol y ocasiona manchas foliares (Sandoval y López, 2000).

También reportan seis especies de *Aspergillus*, la de mayor incidencia fue *A. niger* (68.6%) seguida por *A. ochraceus* (37.3%), *Aspergillus fumigatus* (33.3%), *A. candidus* (17.6%), *Aspergillus flavus*(10.8%), y *A. terreus* (7.8%),

respectivamente. Estos resultados coinciden con lo informado por Marino y Mesquita (2009) quienes plantearon que *Aspergillus* y *Penicillium* son los hongos de almacén de mayor incidencia en semillas de frijol. Al igual que con (Ghangaokar y Kshirsagar, 2013) quienes afirmaron que, de las especies asociadas a semillas de frijol, *A. niger*, *A. fumigatus* y *A. flavus* fueron de las más comúnmente detectadas. Los valores más elevados de semillas infectadas por variedad correspondieron a *A. candidus* en 'Delicia 364', *A. fumigatus* en 'Velazco Largo', *A. flavus* en 'Bountiful', *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. terreus* en 'BAT-304'. En Cuba el frijol común (*Ph. vulgaris*) es atacado por un grupo importante de fitopatógenos del suelo, que producen la pudrición de la raíz y la base de la planta de frijol, la que es causada por un complejo de hongos, entre los que se encuentran *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium*. *Fusarium* es un habitante común del suelo y el más diverso ya que tiene más de 30 especies.

*Sclerotium rolfsii* Sacc. es un hongo fitopatógeno habitante del suelo con más de 500 hospederos, donde el frijol en Cuba constituye uno de los principales. Su distribución es mundial, con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Ataca desde plántulas, plantas herbáceas, plantas leñosas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo. Se considera importante en el sureste de Estados Unidos en algodón (*Gossypium hirsutum* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), y remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Johnson *et al.*, 1999).

La supervivencia del patógeno en el suelo es de extrema importancia epidemiológica y está relacionada a la formación de esclerocios, que permanecen viables por varios años, en condiciones de baja humedad con amplio rango de pH y temperatura (Polanco y Castro, 2005). Por otra parte, la actividad micelial de este microorganismo es bastante elevada en sustratos vegetales en proceso de descomposición (Pineda y Polanco, 2005). En este aspecto, la incorporación de material orgánico al suelo incrementa según *Corrêa et al.*, (2007) el potencial de inóculo, lo que constituye un serio problema, especialmente en áreas donde la rotación se hace basada en la alternancia de cultivos susceptibles.



Según, Araya (2008). Durante épocas secas y calientes las pérdidas pueden llegar a un 25 %. Se presentan parches de plantas amarillentas y caída temprana de hojas. Puede haber marchitez repentina de plantas, cerca del suelo se notan lesiones oscuras y acuosas, que avanzan hacia las raíces; sobre estas lesiones se observa una masa de color blanco con estructuras redondas (tamaño de la cabeza de un alfiler). Este último síntoma la diferencia de la marchitez por *Fusarium*.

En frijol común (*Ph. vulgaris*) este fitopatógeno ocasiona amarillamiento, marchitez, caída de las hojas y finalmente la muerte de la planta. En el cuello de la raíz se observa una lesión necrótica y, sobre los tejidos afectados, un crecimiento micelial blanco conteniendo los esclerocios del hongo, inicialmente blancos que se tornan color marrón oscuro posteriormente (Hernández *et al.*, 2012).

También (Araya *et al.*, 2009) exponen la sintomatología característica de este hongo es: en las hojas: manchas que se originan en el envés y que están delimitadas por las nervaduras, luego evolucionan hasta convertirse en lesiones grisáceas que más tarde se tornan de color marrón y carecen de coloración en los bordes. La ausencia de color en la hoja y la angularidad de las manchas constituyen características inequívocas para un diagnóstico de esta enfermedad. Las lesiones pueden ser tan numerosas como para causar una defoliación prematura.

En los tallos, ramas, pecíolos: las lesiones son elongadas y marrones. En las vainas: las lesiones, que son menos frecuentes que en las hojas, son superficiales al principio y tienen márgenes casi negros con centro marrón-rojizo, siendo ambos netamente definidos.

Las vainas infestadas presentan semillas mal desarrolladas o arrugadas. Las manchas varían en tamaño, y pueden ser tan numerosas que se superponen y ocupan el ancho de las vainas.

#### **2.4- *Trichoderma*. Clasificación Taxonómica**

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 (2012), 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.

Según Samuels, (2006) *Trichoderma* se clasifica como un hongo anamórfico. El estado teleomorfo se ha detectado en pocas especies. En este sentido se han identificado: *Hypocrea lixii* Chaverri como el estado teleomorfo de *T. harzianum* Rifai, *Hypocrea atroviridis* Dodd como el teleomorfo de *T. atroviride* P.karst (Bissett) e *Hypocrea virens* Kullnig Gradinger como el teleomorfo de *T. virens* (López-Bucio *et al.*, 2015).

*Trichoderma* es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycetes y al Orden: Moniliales (clasificación asexual), entre las especies más destacadas de este género están *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, y *T. hamatum*.

Este hongo fue descrito por primera vez hace más de 200 años por los micólogos como un gasteromicetes, y un siglo después se realizó el análisis de su estructura y características para ser clasificado como un género entre los hongos filamentosos, con propiedades y actividades biológicas. Su habilidad como antagonista fue descubierta hace 50 años.

El género *Trichoderma* se ha descrito como un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo que se presenta en diferentes zonas y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Algunas de sus especies tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos por lo que lo convierten en un excelente agente de biocontrol (Carreras, 2011).

El género *Trichoderma* se encuentra en suelos abundantes en materia orgánica; es aeróbico y puede estar en los suelos con pH neutro hasta ácido. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha permitido su uso en el control biológico. *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la

germinación de las esporas hasta la esporulación. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. La competencia por el espacio y los nutrimentos es más favorable, principalmente para los hongos que se desarrollan en la superficie de las hojas antes de efectuar la penetración, no actuando sobre aquellos que penetran rápidamente (Orietta *et al.*, 2015).

En la actualidad se comercializan numerosos productos comerciales de distintas especies y cepas de *Trichoderma*, las que han demostrado no solo su efectividad como antagonista de hongos, sino también efectivas contra nematodos. Se considera un fungicida biológico natural que coloniza y protege la raíz de los cultivos contra enfermedades del suelo. Compite y produce compuestos orgánicos que inhiben el desarrollo de los patógenos del suelo de la mayoría de los cultivos, plantas ornamentales y forestales. Tiene un efecto de parasitismo al asociarse con las colonias de hongos patógenos para después inhibir su desarrollo en los sustratos, en el suelo o dentro de las raíces. Favorece la producción de fitoalexinas que activan los mecanismos de defensa de las plantas (López-Bucio *et al.*, 2015).

El género *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en varios tipos de suelos agrícolas y otros tipos de medios. De este microorganismo hoy se reportan más de 100 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras áreas económica (Martínez, 2015). Este mismo autor señala que el hongo crece y se ramifica en hifas que pueden medir entre 3 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, según las condiciones del sitio donde se esté reproduciendo. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares de color verde, generalmente tienen 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Algunos géneros de hongos tales como *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium*, *Taloromyces* y *Ampelomyces* también han mostrado su habilidad para inducir resistencia sistémica en una gran variedad de cultivos (De Meyer *et al.*, 2018; Harman, 2011; Howell, 2013). Algunos de estos hongos pueden igualmente tener un efecto positivo sobre el crecimiento y la cosecha al aumentar la solubilidad y la toma de los nutrientes. La defensa sistémica adquirida ha sido ampliamente estudiada y varios genes han sido identificados.

## **2.5- Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos**

Como mecanismo de acción *Trichoderma* al ser aplicado a las raíces forma una capa protectora, haciendo una simbiosis: el hongo se alimenta de los exudados de las raíces y las raíces son protegidas por el hongo; al mismo tiempo, reduce o elimina las fuentes de alimento del patógeno, y actúa como una barrera para prevenir la entrada de patógenos a las raíces.

Tiene una acción de hiperparasitismo, que es la acción del microorganismo que parasita a otro organismo de su misma naturaleza; es decir, lo utiliza como alimento y lo destruye. Compite por espacio y nutrientes con los hongos patógenos (Infante *et al.*, 2012).

En la acción biocontroladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos dianas. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente a los hongos fitopatógenos, así es portado por (Lorenzo N, 2001)

Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizosfera de las plantas. Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Harman., *et al* 2010).

Además, se conoce que *Trichoderma* presenta otros mecanismos, los que también son reportados por este autor cuya acción biorreguladora, es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que elicitán o inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Inducción de Resistencia). (Harman., *et al* 2010), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad, además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés.

Estudios recientes a niveles celular y molecular explican la diversidad de vías y mecanismos de acción de este hongo (Harman, 2014). Según este autor, se descubrió, que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas, conocido como Inducción de Resistencia Sistémica (por sus siglas en inglés IRS). Esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista. Prueba de ello, fue que la colonización de las raíces de pepino con *T. asperellum*, indujo resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Shoresh y Harman 2010) en el follaje. También existen evidencias de este modo de acción frente a nematodos (Sharon., et al 2011).

Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizosfera y estar relacionados con la IRS en las plantas. La primera clase son proteínas con actividad enzimática o de otro tipo. Algunas de las proteínas secretadas por *Trichoderma* al parecer inducen solo respuestas locales y necrosis (Brotman., et al 2008), otras activan mecanismos de defensa en plantas como los productos de los genes de avirulencia (Woo, 2007). Otra clase de elicitores de defensa en las plantas incluye oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular, liberados por la acción de enzimas de *Trichoderma* (Woo, 2007). En otros estudios se ha demostrado que la colonización de la raíz por *Trichoderma* ejerce un efecto multifuncional en la biología de los cultivos como maíz, jitomate y soya, por mencionar algunos. Por ejemplo, se incrementan las defensas y las plantas se hacen más resistentes a las enfermedades causadas por hongos y bacterias. Este fenómeno puede ser ocasionado por la inducción de compuestos químicos llamados fitoalexinas, los cuales se acumulan en altas concentraciones en la planta y ayudan a limitar la dispersión del patógeno o por la activación de rutas de señalización implicadas en defensa como la del ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno.

Dos grupos independientes de investigadores describieron un gen que codifica para una proteína elicitora en dos especies de *Trichoderma*, SM1 en *T. virens* (Djonovia., et al, 2006) y Epl1 en *T. atroviride*, con estos genes se transformaron protoplastos de aislamientos de dichas especies y posteriormente se aplicaron en plantas de tomate, las que a su vez fueron inoculadas con *Alternaria solani* Sor.

Las plantas tratadas con las cepas transformadas sufrieron menos daño por la presencia del patógeno, y presentaron mayor crecimiento que las plantas controles. Adicionalmente, se observó que los genes de defensa en tomate (chitinasa, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductasa y b -1,3 glucanasa) durante la interacción con las cepas de *Trichoderma*, se indujeron en mayor grado en las plantas tratadas con las cepas transformadas, que en aquellas que recibieron la cepa silvestre, y en menor grado en las plantas sin inocular (Salas, 2007). Aún se esclarecen y amplían los conocimientos acerca de *Trichoderma* como inductor de resistencia, pero es indiscutible su función en la defensa de las plantas.

Este hongo antagonista es reconocido por sus diferentes mecanismos de acción sobre aquellas especies donde ha sido estudiado, diferentes autores así lo refieren:

#### **2.4.1. Antibiosis**

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistente al antibiótico (Vero, 1999). En la práctica uno de los antecedentes ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* Smith y Townsend resistentes al Agrosin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* Beijerinck y van Del- den (Campbell R, 1989).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibitoras son consideradas "antibióticos". (Hjeljord L., et al, 1998).

Al inicio se estimó que la actividad inhibitora de aislamientos de *Trichoderma* sobre otros hongos se debía solo a compuestos no volátiles. (Dennis y Webster 2010) fueron los pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Ellos relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma spp.* con compuestos no volátiles, entre los

que se encontraban uno identificado como *Trichoderma* y otros metabolitos peptídicos. En investigaciones posteriores determinaron que *Trichoderma spp.* produce dos antibióticos más: gliotoxina y viridina. Más tarde (Martínez., *et al* 2010) informaron que *T. harzianum* Rifai produce numerosos antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Posteriormente, se ha detectado que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles, y notaron que los aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático (Martínez, 2011).

Desde el siglo pasado en Cuba (Stefanova., *et al.* 1999) informaron la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma* y concluyeron que los mismos reducen el crecimiento micelial de *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan y *R. solani* en medios de cultivo envenenado con filtrados líquidos donde se habían cultivado las cepas antagonistas. Plantean, además, que al parecer estos causan a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. Por otro método, (Rivero Deyanira *et al.* 2008) evaluaron el efecto de antibiosis de dos aislados de *Trichoderma* en cultivo dual con *A. padwickii*, *B. oryzae*, *C. lunata* y *Phoma spp*, obteniendo inhibición significativa del crecimiento radial de estos patógenos.

Por ejemplo, (Martínez *et al.*, 2008) en experimentos desarrollados en el Centro Nacional de Salud Animal y Vegetal (CENSA) observaron al evaluar 59 aislamientos de *Trichoderma*, competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis. En casi todos los aislamientos determinaron al menos un tipo de interacción hifal bien definida, y algunos de ellos presentaron hasta cuatro tipos de interacción sobre *R. solani*.

#### **2.4.2. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagonista entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como

quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados.

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico (Carsolio Carolina., *et al*, 2009), que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

El micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma* spp. Ha sido ampliamente estudiado, (Pérez, 2012). No obstante, existen aspectos en el mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales.

Las especies de *Trichoderma* tienen un elevado potencial parasítico, con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos (Sandoval., *et al.*2002).

Aislamientos de *Trichoderma* eficaces en el control de patógenos vegetales eran capaces de producir glucanasas, quitinasas y proteasas, por lo que recomienda que los aislamientos de *Trichoderma* spp. pueden ser seleccionados como agentes de control biológico en base a su capacidad de producir  $\alpha$ -1,3-D glucanasa y quitinasa en presencia de glucano y quitina, respectivamente.

Por los resultados que se han obtenido hasta el momento, se ha llegado a la conclusión que la producción del factor inhibidor en *Trichoderma* depende más del aislamiento que de la propia especie. Aspecto este, que reafirma una vez más la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista (León., *et al* 2008) planteó que el micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *R solani* es el responsable de la disminución de la densidad de inóculo de este patógeno y que se corresponde con un incremento en la densidad de población de *Trichoderma* spp.



Rivero Deyanira., *et al.* 2008), evaluaron cuatro aislamientos de *Trichoderma* sobre *Alternaria padwickii* (Ganguly) Ellis, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn y *Phoma spp.* y obtuvieron una alta capacidad competitiva, con dos o más tipos de interacción hifal, excepto en *Phoma spp.*

### **2.4.3. 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 control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Hjeljord., *et al.* 1998).

La presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas, forestales y en barbechos), se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie. *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas, hasta más de 30 años Luis Pérez Vicente (2019). La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Pérez, 2004).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminaria, y pectinas, entre otros) y microelementos (Stefanova., *et al.* 1999)

Un ejemplo fehaciente de estas interacciones es el notificado por (Durman., *et al.* 2003) quienes encontraron una disminución del crecimiento de *R. solani* y de

la viabilidad de los esclerocios por la acción de diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.*

## **2.6. Importancia de *Trichoderma spp.* Como alternativa de lucha en la agricultura.**

La necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad de los cultivos ha impulsado la búsqueda de estrategias de lucha contra numerosas plagas de los cultivos agrícolas, que sean alternativas eficientes al control químico y que además implique bajar el riesgo ambiental y sanitario sin arriesgar la salud humana, constituye hoy en día un gran reto para la agricultura y su desarrollo, así coinciden (Gallegos *et al.*, 2006).

En estudios realizados por Guedes *et al.*, (2012), para determinar el parasitismo, como posible mecanismo antagonista contra diferentes patógenos en tomate obtuvieron que el aislamiento T-121 tuvo un crecimiento levemente mayor que los otros aislamientos de este hongo; sin embargo, no obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) entre los 6 aislamientos de *T. harzianum* estudiados. El hecho de que los aislamientos de *T. harzianum* tuvieran contacto rápidamente con los hongos patógenos en un lapso de 3 días, indica que existe agresividad.

En Cuba, el uso de biofertilizantes y microorganismos en la agricultura por los campesinos no es muy utilizado por la mayoría, debido a que no se conocen los múltiples beneficios que ellos proveen; en la planta podría mejorar la sanidad y nutrición y por ende el rendimiento, además que no causan daño al ser humano ni al medio ambiente. Es por ello, que es necesario realizar investigaciones para generar alternativas de producción bajo un enfoque de manejo biológico desde la semilla hasta la producción.

En investigaciones desarrolladas en Perú por (Coaquira *et al.*, 2017), utilizando diferentes combinaciones de *Trichoderma* y biofertilizantes, encontró como, los rendimientos obtenidos utilizando, los microorganismos como *Trichoderma* y *Rhizobium* obtuvieron incrementos de 16.33 % y 14.03%, a diferencia del tratamiento en el cual se utilizó la inoculación de *Rhizobium*, *Trichoderma* aplicado al suelo y vía foliar y la mezcla de Alopes + Fertigigas aplicados vía

foliar, en el cual se obtuvo un incremento en rendimiento de grano seco de 5.92%.

Existe un grupo de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos contra hongos fitopatógenos de suelo y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre estos microorganismos se encuentran algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Fernández, 2001). Estos confieren protección a semillas, plántulas y hortalizas, en contra del ataque de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Phytophthora* y *Pythium*; (Reyes, et al., 2009).

En investigaciones desarrolladas por (González M. et al., 2008) utilizando dos cepas *Trichoderma* para determinar su acción antagónica sobre fitopatógenos, en semillas de frijol, arroz, lechuga y girasol, al diferir siempre el diámetro de las colonias en el cultivo dual con el del testigo. La mayor acción antagónica se observó sobre *Sarocladium oryzae* (45,45 % de inhibición del crecimiento con respecto al testigo para la cepa C-66 y 28,5 para A-34), aunque se presentó diferencia estadística entre ambas cepas. Para el caso de *Rhizoctonia solani* aislada de frijol la cepa A-34 tuvo un efecto mayor que la cepa C-66 pero sólo con un 21 % de reducción de la colonia con respecto al testigo.

Las investigaciones realizadas en el pasado han demostrado que los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., contra diversos fitopatógenos son muchos, variando para cada cepa y en cada interacción hospedero-patógeno (Howell, 2013); por ello, en la mayoría de los países la definición de este aspecto es fundamental para el registro de las cepas comerciales de *Trichoderma*.

En relación con los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., muchos autores han atribuido el fenómeno de control al micoparasitismo y a la capacidad de este antagonista para producir toxinas, lo que ha explicado el control ejercido por diferentes cepas contra *Rh. solani*. Recientemente se ha atribuido el fenómeno de control de diversos fitopatógenos a la producción de enzimas líticas de *Trichoderma* spp. del tipo quitinasas y glucanasas. Estas enzimas han demostrado capacidad para romper los polisacáridos quitina y - glucanos, que son constituyentes de la pared de los patógenos y que le confieren la rigidez a su pared celular (Howell, 2003).

Este mismo autor ha demostrado que cuando se inoculaban semillas de algodón

con *Trichoderma virens* o con sus filtrados de cultivo, se inducía en las raíces de las plántulas la síntesis de altas concentraciones de terpenoides altamente inhibitorios de *R.solani*.

Es el caso del hongo *Trichoderma koningiopsis* (cepa Th003), antes identificado como *Trichoderma koningii*. Con esta cepa se ha obtenido entre el 70% y el 100% de control en los siguientes patosistemas: *Pythium splendens* en frijol y pepino (Cotes, 2013); *R. solani* en frijol (Cotes, 2013); *R. solani* en papa (Beltran et al., 2007), *R. solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersicium* tomate (Cotes et al., 2013); *B. cinerea* y *Oidium* spp. en tomate (Moreno, 2014); *S. sclerotiorum* lechuga. Dichos modelos han involucrado actividades a nivel de laboratorio, pruebas experimentales en invernadero bajo condiciones controladas y a nivel de cultivos comerciales en campo abierto e invernadero.

Algunas cepas se conocen con el nombre de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas o PGPR (del inglés *plant-growth-promoting-rhizobacteria*) (Wei et al., 2016), las cuales pueden ser usadas como biofertilizantes (Kennedy et al., 2014). Estas bacterias producen efectos directos e indirectos sobre el crecimiento y sobre la resistencia a enfermedades (Kennedy et al., 2014; Persello-Cartieaux et al., 2013). La resistencia inducida puede ser localizada (en esta el sitio de inducción es la única parte de la planta con elevada resistencia) o puede ser sistémica (cuando la inducción en una parte de la planta lleva a la protección de la planta entera).

Entre los hongos más utilizados está *Trichoderma spp.* por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, lo que ha permitido su uso en la lucha biológica. Hay reportes que indican que tiene efecto antagonista sobre hongos del suelo como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Mycosphaerella fijiensis*, entre otros (Corrêa et al., 2007; Ezziyyani et al., 2004; Sempere et al., 2007, Djonovié et al., 2006).

De forma general los tratamientos realizados a las semillas fueron efectivos destacándose el tratamiento por peletización con la utilización de la C-66. Con estos resultados se corrobora la ventaja que ofrece la protección de las semillas con estos biopreparados, lo cual está en correspondencia con resultados de investigaciones realizadas en Argentina con tratamientos a las semillas de

acelga, espinaca, rabanito y tomate (Mónaco *et al.*, 2006) donde se obtuvo mayor porcentaje de germinación por protección contra los hongos patógenos. Por otra parte, respecto a la efectividad técnica, López y Sandoval (2006) obtuvieron una reducción de hasta un 96 % de las patologías causadas por *Phytophthora* ssp. en plantas de *Capsicum annuum* y *Dianthu* ssp. con tratamientos de dos cepas de *Trichoderma*.

En investigaciones de campo en la Provincia de Cienfuegos, municipio de Palmira, sobre un suelo pardo con carbonato típico González *et al.*, (2008) obtuvieron valores de distribución de plantas afectadas con *Rhizoctonia solani*, altos en el testigo; 16,8 % a los 75 días y 28 % a los 95 días; reportando que estuvo motivado por la alta infestación por hongos del suelo existente en el área durante años, aunque se elevaron también en las variantes con *Trichoderma*, y obtuvieron una efectividad técnica al final del ciclo del cultivo superior al 60 %.

En otras investigaciones realizadas por González *et al.*, (2008) encontraron en las mediciones del hiperparasitismo, que la interacción tratamiento-patógeno de las cepas C-66 y A-34 sobre los hongos patógenos a los siete días, obtuvieron diferencias altamente significativas entre ellos, siendo en general más hiperparásita C-66 que A-34, cuando evaluaron ambas cepas antagonistas contra el hongo *Alternaria solani* Sor. aislado de papa. Observaron el mayor hiperparasitismo en general sobre *Sarocladium oryzae*, lo que concuerda con el resultado de la acción antagónica. En otros resultados le siguió en orden descendente *Alternaria alternata*, y en tercer orden los patógenos *Macrophomina phaseoli* y *Gerlachia oryzae*. En sus investigaciones destacan el bajo nivel de hiperparasitismo que manifestaron ambas cepas antagonistas sobre la cepa de *R. solani* aislada de arroz.

Estos mismos autores reportan la efectividad de *Trichoderma spp* sobre diferentes semillas (arroz, frijol, lechuga y girasol) y encontraron efectividades en los tratamientos realizados a las semillas con índices altos entre 90 % y 95 %, aunque fue superior el nivel alcanzado por el método de peletización. También Hernández *et al.* (2006) han recomendado la peletización de las semillas de frijol con *Trichoderma viride* para la protección de los hongos patógenos.

Diferentes autores han investigado la acción de distintas cepas de *Trichoderma* sobre *F. solani* así-----) compararon tres aislamientos comerciales (TCC-001, TCC-005, TCC-006). TCC-001 y TCN-014, reportaron ser más competentes por nutrientes y espacio, con el mayor radio de crecimiento de 7,50 y 7,32 cm el día 10, comparado a FSM-011 en el cual solo fue de 2,30 cm. Aunque, TCN-014 mostró micoparasitismo grado 4 con ambos aislamientos de *F. solani* y TCC-005 únicamente con FSM-012, el cual fue más susceptible a ser micoparasitado. En cuanto al PICR, los tratamientos con mejores porcentajes de inhibición fueron TA-9, TA-12 y TA-6 con valores de 70,56, 68,52 y 65,32% respectivamente. El aislamiento del patógeno mayormente inhibido fue FSM-011. Todos estos resultados demuestran que hubo antagonismo *in vitro* al utilizar los aislamientos nativos y comerciales de *T. harzianum* sobre *F. solani*.

Encontraron que los seis aislamientos de *T. harzianum* (T813, T622, T121, T412, T523 y T212), se desarrollaron a una velocidad mayor a la de *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum*. Los aislamientos de *T. harzianum* tuvieron un crecimiento promedio de 6,9; 6,6; 7,1; 6,5; 6,6 y 6,4 cm respectivamente al tercer día de enfrentamiento, mientras que los patógenos mostraron un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 2,3 cm en todos los casos. La tasa de crecimiento de *Trichoderma* y de los fitopatógenos les permitió determinar si en los cultivos apareados se debe sembrar uno de ellos antes (1 o 2 días), para conocer todo el potencial de producción de los metabolitos secundarios de los hongos.

Para conocer el efecto antagónico de varias cepas de *Trichoderma spp. in vitro* (González, 2004), utilizó aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseoli* Tassi, aislados de semillas y plantas enfermas del cultivo del frijol, así como la evaluación de las cepas más promisorias para el control de hongos de la semilla y del suelo en condiciones de campo. Todas las cepas de *Trichoderma spp.* estudiadas presentaron antagonismo por competencia sobre *Rh. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseoli*.

El mayor efecto antagónico sobre *S. rolfsii* lo obtuvo con la cepa C-66, mientras que sobre *R. solani* lo observó con *T. harzianum* (cepa A-34), *Trichoderma spp.* y *Trichoderma spp.* (cepa A-61). *Trichoderma spp.* (cepa-66) encontró el mayor

hiperparasitismo sobre *S. rolfsii*, mientras que contra *R. solani* el mayor hiperparasitismo lo observó con las cepas C-66 y *T. viride*. *T. harzianum* (cepa A-34) y C-66 manifestaron mayor nivel de antagonismo e hiperparasitismo sobre el hongo patógeno *M. phaseoli*. Obtuvo una efectividad con los métodos de tratamiento a la semilla que osciló entre 96,5 y 97,5%.

Es importante destacar que en el mercado mundial ya se cuenta con formulados comerciales de *Trichoderma spp.* para el control de diferentes hongos fitopatógenos, principalmente de suelo. Sin embargo, estos formulados no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas debido a las diversas condiciones ambientales que existen en la naturaleza, las cuales pueden aumentar o disminuir la efectividad de los formulados. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de otras especies de *Trichoderma* que actúen contra diferentes hongos fitopatógenos en diversas condiciones, a fin de obtener resultados satisfactorios.

Por otra parte, Chávez (2006) afirmó que *Trichoderma* tiene diversas ventajas como agente de lucha biológica, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, pero además también produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos.

Este bioproducto posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo. Ezziyyani *et al.* (2004) destacó que las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores.

Son numerosos los beneficios agrícolas de *Trichoderma spp* según (Páez 2006). Ofrece un control eficaz de enfermedades de plantas, posee un amplio rango de acción, elevada propagación en los suelos, aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos. Ayuda a la descomposición de la materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en forma disponible para la planta, por lo tanto, tiene un efecto indirecto en la nutrición del cultivo.

## **2.7. Uso de *Trichoderma spp* en lucha biológica de fitopatógenos en el suelo.**

Según Chet et al., (1999) al realizar observaciones microscópicas apreciaron que el aspecto de las hifas y conidios de *A. porri* en crecimiento dual con *Trichoderma*, estas varían considerablemente con respecto al testigo, las que se observan desintegradas, parcial o totalmente con una coloración más tenue. La degradación de hifas y conidios podría provocar una inhibición de la infección causada por el patógeno y por consiguiente una menor diseminación.

El mayor énfasis en las investigaciones con *Trichoderma spp* se ha puesto en la lucha contra los patógenos que tienen el suelo como hábitat. Una de las razones fundamentales de esa tendencia es que el ambiente del suelo es mucho más favorable para el establecimiento de un antagonista que otros, como por ejemplo la filósfera. De hecho, el control biológico con *Trichoderma* ha sido más exitoso en la rizósfera que en otros ambientes (Olivera Costa y Rodríguez, 2014).

La lucha biológica dirigida al suelo y en las semillas está muy relacionado. Una gran parte de las aplicaciones de *Trichoderma* para el control de patógenos que habitan el suelo se realiza a través del tratamiento de semillas. Otros métodos para introducir biopreparados de *Trichoderma* en el suelo son la aplicación directa al surco o a voleo, en el momento de la siembra, en estos casos generalmente como gránulos, o incorporado junto con enmiendas orgánicas (Hernández, et al., 2013).

En numerosos ensayos realizados por diferentes investigadores ha quedado demostrado que la degradación y ruptura de las paredes celulares de *A. solani* por *Trichoderma* ocurre mediante un proceso enzimático en el que participan enzimas extracelulares del tipo quitinazas. (De la Cruz et al., 1995 y Chet et al. 1998).

Gran parte del éxito que se obtiene con el uso de biopreparados en base a *Trichoderma* dependen del método de aplicación, por esa razón a la mezcla con enmiendas orgánicas se ha prestado tanta atención. La introducción de diferentes enmiendas orgánicas al suelo previo a la siembra y a la aplicación de *Trichoderma* condiciona un ambiente favorable para la multiplicación y colonización de éste. Se ha comprobado que la efectividad es aún mayor si *Trichoderma* se incorpora como parte de un compost Marín, (2012).



Diferentes razas de *T. harzianum* han resultado muy efectivas en el control de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* en maíz, algodón, soya, papa, tomate, tabaco, remolacha, frijoles, maní y frutales (Olivera Costa y Rodríguez, 2014).

Este fenómeno de protección se ha relacionado con varios mecanismos, los cuales se ilustran a continuación. Cuando *T. koningiopsis* (cepa Th003) fue aplicado en el suelo, se observó una correlación positiva entre la actividad de las enzimas exo- -1,3 glucanasa y exoquitinasas producidas por este biocontrolador y el control del fitopatógeno del suelo *P. splendens* en frijol, sugiriendo que las enzimas producidas por *T. koningiopsis* en el suelo juegan un rol importante en la degradación de las paredes de los patógenos (Cotes *et al.*, 2014).

De otra parte, en diferentes experimentos se presentó también una correlación positiva (coeficiente de correlación 0,7) entre el tiempo de pre germinación de las semillas en presencia del antagonista, la actividad de enzimas de origen vegetal de tipo endo- 1,3 glucanasas y endoquitinasas, y la protección conferida a las plantas de frijol, mostrando que *T. koningiopsis* puede estimular la producción de estas enzimas en el tejido vegetal, las cuales también podrían estar relacionadas con la degradación de la pared celular de los patógenos (Cotes *et al.*, 2016).

En investigaciones desarrolladas por Cotes, A. M (2017) induciendo una pregerminación controlada de semillas en matriz sólida durante 24 horas en presencia del biocontrolador y estuvo relacionado varios fenómenos, entre ellos la colonización de los tegumentos por parte de *T. koningiopsis* mediada por la capacidad celulítica de esta cepa, el consumo de los exudados de la semilla; la producción de enzimas líticas de origen microbiano del tipo celulasas, exoquitinasas y exo- -1,3 glucanasas, las cuales demostraron su habilidad para degradar la pared celular del patógeno y la inducción en el hospedero de proteínas relacionadas por la patogénesis del tipo endoquitinasas y endo- -1,3 glucanasas que también demostraron su habilidad para degradar la pared celular del fitopatógeno, sugiriendo así un fenómeno de inducción de resistencia.

La resistencia inducida es el proceso por el cual las defensas de la planta son activadas de tal forma que cuando el patógeno infecta es rápidamente reconocido por la planta que desarrolla adecuadas defensas para restringir su desarrollo. La resistencia inducida puede ser localizada (en esta el sitio de

inducción es la única parte de la planta con elevada resistencia) o puede ser sistémica (cuando la inducción en una parte de la planta lleva a la protección de la planta entera).

La resistencia sistémica se divide en dos: 'resistencia sistémica adquirida' (SAR) o 'resistencia sistémica inducida' (ISR). La SAR es elicitada por patógenos necrotrofos que causan reacción hipersensible o por químicos tales como el ácido salicílico, el ácido indol acético (INA) o el ácido amino-butírico (BABA) (Ryuet *et al.*, 2003). El tema de inducción de resistencia ha sido ampliamente estudiado en relación con las bacterias asociadas a las raíces, las cuales han demostrado que pueden aumentar la resistencia o los niveles de defensa de las plantas a un amplio espectro de patógenos (Whipps, 2011). Dichas bacterias viven en o dentro de las raíces de las plantas y se nutren de los exudados de las raíces (Pieterse *et al.*, 2012).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron seleccionados dos lotes de semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), cosechados en distintos momentos y destinados para la campaña de siembra de 2018-2019, de los campesinos de la Cooperativa de Créditos y Servicios Fortalecida (CCSF), "Victoria de Girón" del municipio Unión de Reyes. Poblado Juan G. Gómez, el que fue sembrado sobre un suelo pardo pedregoso.

Las semillas fueron trasladadas al área de Fitopatología del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Matanzas. Fueron analizados dos lotes de semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de 4 variedades cultivadas por los campesinos. De cada lote se analizaron 100 semillas mediante el método de ensayo biológico de crecimiento en cámara húmeda (*blotter test*) (ISTA, 1996).

#### **3.1. Incidencia, aislamiento e identificación de hongos filamentosos**

Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl 1%) por 1 min, colocadas en placas de Petri de 15 cm de diámetro con papel de filtro Whatman N°1, humedecido con agua destilada estéril e incubadas de 8-10 días con alternancia de luz oscuridad (ocho horas de luz fluorescente y 16 horas de oscuridad), a 22-24°C.

Transcurrido el período de incubación, se realizaron observaciones bajo el microscopio estereoscópico. Se observaron las características culturales de cada tipo de crecimiento fúngico y se cuantificó el número de semillas infectadas por cada uno. De todos los diferentes se realizaron aislamientos directos en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), se purificaron y se conservaron a 4°C para su identificación.

Se usó para la siembra el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), usado por Roco y Pérez (2001) para el enfrentamiento y que, según López (1999), es uno de los medios más idóneos para este tipo de ensayos pues constituye uno de los sustratos más usados para el cultivo de hongos fitopatógenos y resulta menos costoso.

Posteriormente se realizaron preparaciones microscópicas para observar los caracteres morfológicos de las estructuras vegetativas y de reproducción. La identificación se llevó a cabo mediante caracterización morfométrica y según los criterios taxonómicos descritos por Burgess *et al.* (2006) y Seifert *et al.* (2011).

Para la identificación de las especies de *Fusarium*, se obtuvieron cultivos monoconidiales de los diferentes aislados, los cuales se inocularon en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA) las cuales fueron incubadas a 25°C en la oscuridad.

Transcurridos 5 días de incubación los aislados fueron caracterizados morfo culturalmente y se identificaron según los criterios taxonómicos descritos por Leslie y Summerell (2006).

A los aislados de *Rhizoctonia* sp. cultivados en placas con PDA se les determinó el número de núcleos presentes en las células de las hifas, para lo cual se siguió el procedimiento descrito por (Sneh *et al.*, 1991): el micelio tomado de un cultivo puro fue fijado con una mezcla 3:1:1 de etanol absoluto, ácido acético glacial y ácido láctico durante 10 min., seguido de lavados con etanol al 95%, etanol al 70%, HCl 1M durante 5 minutos y HCl 1M a 60°C durante 7 min. Se lavó alternadamente cinco veces con agua destilada y tampón fosfato pH 6.9 y se colocó en una solución de colorante Giemsa y tampón fosfato (1:15) donde se mantuvo por dos horas.

Posteriormente se montó en glicerina y se observó directamente al microscopio con 400x de aumento. Estos aislados fueron caracterizados morfo culturalmente y se identificaron según los criterios taxonómicos descritos por Sneh *et al.* (1991).

En el caso de *Aspergillus*, cultivos monoconidiales de los diferentes aislados fueron inoculados en placas de Petri con Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA; 1g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml de concentrado Czapek, 5g de extracto de levadura, 30g de sacarosa, 15g de agar en 1 litro de agua destilada), CYA con 20% de sacarosa (CY20S; 1g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml de concentrado Czapek, 5g de extracto de levadura, 200g de sacarosa, 15g de agar en 1 litro de agua destilada) y en Agar Extracto de Malta (AEM; 20g de extracto de malta, 1g de peptona, 20g de glucosa, 20g de agar en 1 litro de agua destilada) e incubados por 7 días en la oscuridad. Las placas con AEM y las de CY20S fueron incubadas a 25°C, mientras que las de CYA se incubaron a 25°C y a 37°C, respectivamente. Posteriormente los aislados se caracterizaron morfo culturalmente y se identificaron según los criterios taxonómicos descritos por Klich y Pitt (1988).

Las cepas de *Trichoderma* procedían de la Planta de Bioplaguicidas de Matanzas.

Las investigaciones realizadas lo largo de muchos años con un número considerable de cepas de *Trichoderma* y de especies de hongos fitopatógenos han demostrado que estas son efectivas sólo contra patógenos específicos. El conocimiento de esta especificidad condujo a la idea de que el reconocimiento molecular entre *Trichoderma* y el hospedante es el evento esencial que precede al proceso antagonista. Esto es un elemento a tener en cuenta para la aplicación práctica de este hongo, y para la búsqueda de nuevos aislamientos más adaptados y eficaces como un proceso continuo.

**Tabla 1.- Indicadores y variables empleadas en la medición y comparación de cepas de *Trichoderma spp*, sobre fitopatógenos aislados de semillas de frijol.**

<b>Indicadores</b>	<b>Variables medibles</b>	<b>Unidad</b>
<b>EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA</b>	Crecimiento de <b>TS-3</b> sobre <i>Fusarium</i> y <i>Sclerotium</i> . Crecimiento de <b>A-53</b> sobre <i>Fusarium</i> y <i>Sclerotium</i> . Crecimiento de <b>A-34</b> sobre <i>Fusarium</i> y <i>Sclerotium</i>	cm
	Germinación de semillas de frijol con aplicación de <b>A-53, TS-3 y TMTD</b>	%
	Protección de semillas de frijol con aplicación de <b>A-53, TS-3 y TMTD</b>	%
	Compatibilidad de <b>A-53</b> con <b>TMTD</b>	%

Se realizaron ensayos para detectar posibles efectos antagónicos entre tres cepas de *Trichoderma spp* y hongos fitopatógenos aislados de las semillas de los dos lotes y cuatro variedades de frijol. Para el enfrentamiento de estos organismos se procedió según la metodología propuesta por Johnson *et al.*, (1960). Se usó para la siembra el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 kg cm<sup>-2</sup> de presión por 20 minutos, posteriormente se extendió en placas Petri Anumbra de 9 cm de diámetro.

Primeramente, se determinó el crecimiento micelial de las tres cepas de hongos

antagónicas y los cinco aislamientos obtenidos de las semillas de frijol. Para ello se prepararon placas madres a partir de aislamientos monospóricos de los hongos *T. harzianum* cepas A-34 y A-53, *T. viride* cepa TS-3 y de los fitopatógenos: *F. solani*, *S. rolfsii*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*.

Posteriormente, se sembró cada microorganismo por separado y también se depositó en lados opuestos de la placa (cultivo dual) un disco de agar con micelio de 0,5 cm. de diámetro, de cada uno de los microorganismos a enfrentar. Se incubaron a 28°C y se determinó diariamente el crecimiento radial en las tres repeticiones. Se describieron las características morfológicas de las colonias y se observaron en el microscopio óptico.

Las pruebas de antagonismo mediante la técnica de enfrentamiento en placas Petri con medio (PDA) papa-dextrosa-agar, colocando el aislamiento del fitopatógeno en un disco de PDA de 5,0 mm de diámetro a 10 mm del borde de la placa y, de manera equidistante, en forma opuesta se colocó un disco de micelio de cada una de las cepas de *Trichoderma*. Determinándose posteriormente el antagonismo en porciento. Mediante la fórmula.

Antagonismo (%)= (crecimiento del antagonista-crecimiento del fitopatógeno/crecimiento del fitopatógeno)\*100.

Después de realizada la siembra de los microorganismos en estudio. Para evaluar el hiperparasitismo se continuó con la medición de cada colonia de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno hasta los 7 días, midiéndose el radio de solapamiento del antagonista sobre el hongo fitopatógeno.

Se evaluó la efectividad de los biopreparados de las tres cepas de *Trichoderma* en estudio contra los fitopatógenos de la semilla utilizando un diseño bifactorial en condiciones de laboratorio con semillas de frijol, empleándose tres variantes y un testigo con agua destilada y estéril, considerada una cuarta variante.

Cada variante de *Trichoderma* tuvo dos subtratamientos: inmersión de la semilla con una suspensión de conidios de *Trichoderma* de 10<sup>8</sup> conidios/mL (100 gramos de biopreparado sólido en un litro de agua) y peletización de la semilla en una pasta de la suspensión del biopreparado (al 10%) y como adherente zeolita en polvo en la proporción 1:1 en volumen.

Se utilizaron 4 réplicas para cada variante. Fueron tratadas 50 semillas por réplica las cuales fueron montadas por el método tradicional de cámara húmeda, incubándose a 25 + 1 °C con alternancia de 8 horas luz y 16 horas oscuridad. Al concluir este período se realizó la evaluación de la presencia o no de los patógenos sobre las semillas.

**Tabla 2. Ecuaciones utilizadas en la cuantificación del antagonismo**

Parámetro	Ecuación	Nomenclatura
Estimado del crecimiento del micelio	$L = \frac{(D - d)}{2}$	L: Crecimiento del micelio(mm) D: Diámetro de la colonia (mm) d : Diámetro de siembra (mm)
Crecimiento micelial medio	$V = \frac{\sum (L_n - L_{n-1})}{n}$	V: Media del crecimiento del micelio (mm/día) L <sub>n</sub> , L <sub>n-1</sub> : Crecimiento del micelio por día (mm) n : Número de días
Por ciento de inhibición	$I = \frac{(L_w - L) * 100}{L_w}$	I: Por ciento de inhibición del crecimiento (%) L <sub>w</sub> : Crecimiento del micelio aislado (mm) L : Crecimiento del micelio enfrentado (mm)

A los resultados de las observaciones se les realizó análisis de varianza simple mediante el uso del paquete estadístico Stargraphic versión 5,0 y se les hizo la prueba de comparaciones múltiples de Duncan con un 95 % de confiabilidad.

### **3.2. Determinación de la eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma spp* sobre la germinación y protección de las semillas de frijol común.**

Para determinar la eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma spp* en la germinación y protección de semillas de frijol se realizó el montaje de los experimentos in Vitro.

Se establecieron cuatro variantes de tratamiento a las semillas:

- **V-1 Testigo con agua destilada estéril.**
- **V-2 *Trichoderma viride* cepa (TS-3.)**
- **V-3 *Trichoderma harzianum* cepas (T-34 y A-53).**
- **V-4 TMTD (Estándar químico).**

Se evaluaron durante 7 días para determinar la germinación y la presencia de organismos patógenos de las semillas.

A los resultados de las observaciones se les realizó análisis de varianza simple mediante el uso del paquete estadístico Stargraphic versión 5,0 y se les hizo la prueba de comparaciones múltiples de Duncan con un 95 % de confiabilidad.

### **3. 3. Compatibilidad de *Trichoderma spp* en aplicación con TMTD.**

Para evaluar la compatibilidad de *Trichoderma harzianum* con TMTD se establecieron cuatro variantes:

- Ambos mezclados al momento de la siembra.
- *Trichoderma harzianum* (cepa A-53) tres días después de TMTD
- *Trichoderma harzianum* (cepa A-53) siete días después de TMTD
- *Trichoderma harzianum* (cepa A-53) 15 días después de TMTD

Para evaluar la compatibilidad del biopreparado de la cepa A-53 de *Trichoderma harzianum* en estudio utilizándose de forma combinada con TMTD, igualmente fueron montadas cuatro variantes, ambos productos mezclados en el momento de la siembra, aquí la semilla de frijol fue peletizada con ambos productos.

El segundo tratamiento se preparó una suspensión de conidios de *Trichoderma* de  $10^8$  conidios/mL (100 gramos de biopreparado sólido en un litro de agua), tal y como se hizo en el experimento anterior al tratar la semilla y se asperjó a la siembra 72 horas después de haber sido tratada con el TMTD. De igual forma se procedió en las variantes tres y cuatro asperjado el biopreparado a los siete días y los 15 días



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Comportamiento del crecimiento hifal las cepas de *Trichoderma spp* TS-3, A-53 y A-34 en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Y los fitopatógenos aislados de las semillas.

Como se observa en la tabla 3, a las 48 horas se revelaba un crecimiento similar en las tres cepas de los antagonistas y la Cepa TS-3 de *T. viride* mostraba un crecimiento ligeramente superior con 2,8 cm. En las observaciones realizadas a las 72 horas, era la cepa A-53 de *T. harzianum* la que crecía con mayor rapidez, 24 horas después (96 horas) esta misma cepa y la A-34 ambas de *T. harzianum* alcanzaron en borde de la placa y los 9,0 cm de crecimiento hifal radial, logrando colonizar la mayor parte del sustrato en el menor tiempo, a los cinco días las tres cepas habían colonizado toda la placa, lo que demuestra el rápido crecimiento hifal de estas tres cepas de *Trichoderma* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

Son muchos los investigadores que utilizan este medio de cultivo en pruebas in Vitro, para el crecimiento de diferentes especies de hongos, ya sean fitopatógenas o también especies antagonistas. Así, por ejemplo, (Martínez *et al.*, 2008) en investigaciones desarrolladas en el Centro Nacional de Salud Animal y Vegetal (CENSA) evaluaron 59 aislamientos de *Trichoderma*, reproducidos sobre papa-dextrosa-agar (PDA), demostraron su competencia por el sustrato, al ser evaluadas las diferentes cepas como antagonistas de *R. solani*. Encontraron en casi todos los aislamientos al menos un tipo de interacción hifal bien definida, y algunos de ellos presentaron hasta cuatro tipos de interacción sobre *R. solani*.

**Tabla 3. Resultados de la Prueba in Vitro:** Crecimiento radial de las tres cepas de *Trichoderma spp* utilizadas en los enfrentamientos microorganismos.

U/M = Crecimiento de las colonias en cm

Organismo Tiempo	TS-3	A-53	A-34
2 días	2.8	2.7	2.5
3 días	5.0	5.8	5.6
4 días	8.2	<b>9.0</b>	<b>9.0</b>
5 días	<b>9.0</b>	<b>9.0</b>	<b>9.0</b>

6 días	9.0	9.0	9.0
--------	-----	-----	-----

Elaboración propia

Son muchos los investigadores que utilizan este medio de cultivo en pruebas in Vitro, para el crecimiento de diferentes especies de hongos, ya sean fitopatógenas o también especies antagonistas. Así, por ejemplo, (Martínez *et al.*, 2008) en investigaciones desarrolladas en el Centro Nacional de Salud Animal y Vegetal (CENSA) evaluaron 59 aislamientos de *Trichoderma*, reproducidos sobre papa-dextrosa-agar (PDA), demostraron su competencia por el sustrato, al ser evaluadas las diferentes cepas como antagonistas de *R. solani*. Encontraron en casi todos los aislamientos al menos un tipo de interacción hifal bien definida, y algunos de ellos presentaron hasta cuatro tipos de interacción sobre *R. solani*.

En estudio realizados por (Martínez de la Parte *et al.*, 2014), comparten el mismo criterio de que este medio de cultivo es ideal para el crecimiento de diferentes especies de hongos, estos investigadores evaluaron diferentes lotes de semilla de frijol provenientes de Mayabeque, Artemisa y Pinar del Rio, utilizan dos medios de cultivo agar-papa-dextrosa (PDA) y Agar hojas de Clavel (CLA), obtienen los crecimientos fúngicos esperados y estudian las características culturales de cada especie y realizan las preparaciones microscópicas para observar los caracteres morfológicos de las estructuras vegetativas y de reproducción, obtienen aislados monoconidiales de *Fusarium* y los caracterizan morfoculturalmente utilizando como medio de cultivo (PDA).

Al analizar el comportamiento del crecimiento radial hifal de los diferentes aislamientos de las semillas de frijol *A. flavus* mostró el más rápido crecimiento a las 48 horas de realizada la siembra con 1,8 cm, ver tabla 4, el aislamiento de *F. solani* fue el que presentó el menor crecimiento para este intervalo de muestreo.

**Tabla 4.- Resultados de la Prueba in Vitro:** Crecimiento radial de los aislamientos realizados de las semillas de frijol.

U/M = Crecimiento de las colonias en cm

<b>Organismo</b> <b>Tiempo</b>	<b><i>S. roflsii</i></b>	<b><i>F. solani</i></b>	<b><i>A. flavus</i></b>	<b><i>A. niger</i></b>	<b><i>Rh. solani</i></b>
2 días	1,4	0,6	1,8	1,6	0,9
3 días	2,7	1,8	3,1	2,9	1,6
4 días	4,0	3,4	5,2	4,1	3,4
5 días	6,0	5,0	7,2	5,7	5,2
6 días	7,5	6,9	8,5	6,4	7,0

Elaboración propia

A las 72 horas igualmente *A. flavus* superaba a los restantes cuatro aislamientos y alcanzaba los 3,1 cm de crecimiento radial hifal, este microorganismo generalmente presenta un rápido desarrollo sobre diferentes sustratos naturales sobre los cuales crece y se multiplica. El menor incremento a las 72 horas lo mostraba *Rh. solani* con 1,6 cm como se observa en la tabla 4.

Cuando se realizaron las observaciones a las 96 horas (cuatro días) *A. flavus* superaba, por más de un centímetro de crecimiento radial hifal al resto de los aislamientos, para este intervalo de tiempo *F. solani* y *Rh. solani* presentaban el menor crecimiento radial hifal con 3,4 cm en ambos aislamientos. Si se comparan los aislamientos de los fitopatógenos con las tres cepas de *Trichoderma* ver tabla 3 para este intervalo de tiempo, estas ocupaban toda la superficie de las placas Petri los 9,0 cm de diámetro, se manifestó un crecimiento mucho más rápido para el antagonista que los fitopatógenos.

En lo que respecta a las cepas de *Trichoderma spp* se corroboró lo planteado por (Martínez, 2015). Observándose un crecimiento rápido de las hifas del hongo, las que se ramifican y pueden medir de 3 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro. La esporulación asexual ocurrió en conidios unicelulares de color verde las que tenían 3 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro.

A las 120 horas (cinco días) igualmente *A. Flavus* mostraba el mayor crecimiento radial hifal con 7,2 cm, superando en más de dos cm lo alcanzado por *F. solani*, cuyo aislamiento media exactamente 5,0 cm muy similar a lo alcanzado por *Rh. solani* con 5,2 cm, el aislamiento de *S. roflsii* tenía 6,0 cm el más próximo en cuanto a crecimiento radial hifal y así se comportó durante todas las observaciones.

En la última fecha de las observaciones 144 horas (seis días) *A. flavus* alcanzaba los 8,5 cm de crecimiento radial hifal, muy próximo al borde de la placa Petri, el menor crecimiento en este momento fue para *A. niger* con 6,4 cm, dos menos que la especie *flavus*. También le siguió en crecimiento para el último día de muestreo *S. rolfsii* que midió 7,5 cm. Estos resultados corroboran los planteado por Ghangaokar y Kshirsagar (2013) quienes afirmaron que, de las especies asociadas a semillas de frijol, *A. niger*, *A. fumigatus* y *A. flavus* fueron de las más comúnmente detectadas y de rápida multiplicación en ellas.

Además de las especies que se estudian en este trabajo, otros autores han reportado numerosos organismos fitopatógenos de la semilla, muchos de los cuales después están presentes en las plantaciones y otros solo aparecen en los almacenes, así se reportan como los principales hongos que afectan las semillas se encuentran *Alternaria solani* (Ell.et Mart.), *Alternaria alternata* Nees, *Alternaria* spp., *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium solani* (Mart), *Fusarium* spp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*. Estos patógenos pueden localizarse en la parte exterior e interior de la semilla, produciendo diferentes síntomas como enanismo, exudaciones y bajo poder germinativo. En ocasiones, la semilla puede estar infectada y no presentar síntomas.

#### **4.2 Eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma spp* como antagonista frente a fitopatógenos aislados de las semillas de frijol *S. rolfsii* y *F. solani*.**

En la Tabla 5 se muestran los resultados alcanzados de las pruebas de antagonismo *in Vitro* de las cepas TS-3 de *T. viride* y A-53 y A-34 de *T. harzianum* contra los dos aislamientos de los fitopatógenos obtenidos de las semillas de frijol. A las 48 horas, el mayor crecimiento lineal del micelio era de la cepa TS-3 con 2,6 cm frente a solo 1,1 mm del aislamiento de *F. solani*, a las 48 horas cuando fue realizada la primera observación el mayor rango de inhibición fue para la cepa A-34 sobre *S. rolfsii* que solo mostraba 0,6 cm apenas había podido iniciar su crecimiento.

Tabla 5. Prueba de antagonismo *in Vitro* de cepas de *Trichoderma spp* contra hongos fitopatógenos.

U/M = Crecimiento de las colonias en cm

Cepa Tiempo	TS- 3	S	TS- 3	F	A- 53	S	A- 53	F	A- 34	S	A- 34	F
2 días	1,3	0,9	<b>2,6</b>	1,1	1,9	0,8	1,7	1,5	0,9	0,6	1,8	1,4
3 días	2,8	1,1	3,2	1,2	<b>4,2</b>	1,4	3,6	1,5	2,3	1,1	2,2	1,2
4 días	4,0	1,8	4,6	1,7	<b>6,1</b>	2,0	5,8	2,0	3,4	1,8	5,5	2,8
5 días	5,8	2,5	6,0	2,2	<b>7,6*</b>	2,1	7,4*	2,2	5,1	2,5	5,7	2,8
6 días	6,5*	2,5	6,7*	2,2	<b>8,9**</b>	2,3	<b>9,0**</b>	2,2	6,5*	2,5	6,2*	2,8

\* Hiperparasitismo de *Trichoderma* solo en el borde de la colonia del

patógeno

\*\* Hiperparasitismo de *Trichoderma* en la totalidad de la colonia del patógeno

Como puede observarse en esta tabla 5, las tres cepas de *Trichoderma* manifestaban crecimientos superiores a los dos fitopatógenos tomados para este primer enfrentamiento, desde estos momentos, 48 horas, ya se observaba el efecto inhibitor en el desarrollo de los aislamientos de los fitopatógenos. El mayor efecto lo ejercía la cepa A-34 sobre *S. rolfsii*. Este resultado puede confirmar lo planteado por (Carreras, 2011) de que las especies de *Trichoderma* tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos por lo que lo convierten en un excelente agente de biocontrol.

En las observaciones realizadas a las 72 horas (tres días), el mayor crecimiento radial hifal lo mostraba a cepa A-53 de *T. harzianum* y alcanzaba los 4,2 cm sobre *S. rolfsii* que revelaba 1,4 cm. Las tres cepas de *Trichoderma* igualmente en esta etapa del enfrentamiento mostraban el efecto inhibitor en el desarrollo de los dos aislamientos de las semillas de frijol, con el menor desarrollo para la cepa A-34 de *T. harzianum* con 2,2 cm en su enfrentamiento con *F. solani* que alcanza un crecimiento de 1,2 cm. Los menores crecimiento para este período de los enfrentamientos aparecían en la cepa TS-3 frente a *S. rolfsii* con solo 1,1 cm y la cepa A-34 frente a este mismo fitopatógeno con idéntico valor de 1,1 cm. Este resultado corrobora lo planteado por muchos autores de que distintas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. (Dennis y Webster 2010) relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma spp.* con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como Trichoderma y otros metabolitos peptídicos.

En investigaciones posteriores determinaron que *Trichoderma spp.* produce dos antibióticos más: gliotoxina y viridina. Más tarde (Martínez *et al.*, 2010) informaron que *T. harzianum* Rifai produce numerosos antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

En otros resultados, coincidente con los obtenidos en este trabajo (Martínez, 2011) detectó que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles, y notó que los aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático.

A los cuatro días (96 horas) la cepa A-53 de *T. harzianum* alcanzaba los 6,1 cm de crecimiento radial micelial, frente al aislamiento de *S. rolfsii* que solo conseguía 2,0 cm, Fig. 1, similar comportamiento presentaba esta cepa con 5,8 cm frente *F. solani* con igual crecimiento radial hifal de 2,0 cm. La cepa A-34 de *T. harzianum* era la que mostraba el menor crecimiento para el cuarto día de las observaciones con 3,4 cm. La Cepa TS-3 de *T. viride* exponía menor crecimiento que la cepa A-34 pero con buen comportamiento de inhibición sobre los dos fitopatógenos.

En las observaciones realizadas a los cinco días (120 horas) la cepa A-53 de *T. harzianum* alcanzaba los 7,6 cm y hacia contacto con las hifas del aislamiento de *S. rolfsii* y se producía el hiperparasitismo en el borde de la colonia de este fitopatógeno y ejercía el mayor efecto inhibitorio de las cepas en estudio, resultado similar expresaba sobre el aislamiento de *F. solani*, en este enfrentamiento se midió 7,4 cm y también se producía el hiperparasitismo en el borde de la colonia del fitopatógeno.

Las cepas TS-3 y A-34 manifestaban similar crecimiento, algo superior en la cepa TS-3, ambas inhibían el crecimiento de los dos fitopatógenos, pero sin llegar en este momento a producir el hiperparasitismo que lograba la cepa A-53.

A los seis días (144 horas) las tres cepas comerciales que fueron seleccionadas para los enfrentamientos duales manifestaban efecto antagonista sobre los dos aislamientos de *S. rolfsii* y *F. solani* de semillas de frijol, en ese momento la cepa A-53 penetraba el micelio de ambos y se enrollaba en las hifas del mismo, produciendo el hiperparasitismo en la totalidad de la colonia de los dos fitopatógenos, alcanzaba 8,9 cm frente a *S. rolfsii* y 9,0 cm frente a *F. solani*, ambos aislamientos solo alcanzaron los 2,3 y 2,2 cm de crecimiento radial micelial.

Las cepas TS-3 y A-34 a los seis días penetraban en los bordes de las colonias de los aislamientos de *S. rolfsii* y *F. solani*, demostraban también su efecto antagonista sobre estos dos fitopatógenos de las semillas del frijol, alcanzaron ambas los 6,5 cm frente *S. rolfsii* y 6,7 y 6,2 cm frente a *F. solani*.

En los resultados obtenidos se corroboró lo planteado por (Carsolio Carolina., *et al*, 2009), Los que plantearon que *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo las hifas del hongo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

Los resultados experimentales obtenidos son similares a los reportados (González, 2004), el que evaluando el efecto antagónico de varias cepas de *Trichoderma spp. in vitro* utilizó aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseoli* Tassi, aislados de semillas y plantas enfermas del cultivo del frijol, así como la evaluación de las cepas más promisorias para el control de hongos de la semilla y del suelo en condiciones de campo. En sus investigaciones todas las cepas de *Trichoderma spp.* estudiadas presentaron antagonismo por competencia sobre *Rh. solani*, *S. rolfsii* y *M. phaseoli*.

En sus resultados el mayor efecto antagónico sobre *S. rolfsii* lo obtuvo con la cepa C-66, mientras que sobre *R. solani* lo observó con *T. harzianum* (cepa A-34), *Trichoderma spp.* y *Trichoderma spp.* (cepa A-61). *Trichoderma spp.* (cepa-66) encontró el mayor hiperparasitismo sobre *S. rolfsii*, mientras que contra *R. solani* el mayor hiperparasitismo

lo observó con las cepas C-66 y *T. viride*. *T. harzianum* (cepa A-34) y C-66 manifestaron mayor nivel de antagonismo e hiperparasitismo sobre el hongo patógeno *M. phaseoli*. En los resultados que se presentan en esta investigación, el mayor efecto antagonista sobre *S. rolfsii* fue obtenido con la cepa A-53 de *T. harzianum* la que no fue probada por este investigador.

Los resultados alcanzados contra estos dos fitopatógenos del frijol difieren de investigaciones similares desarrolladas por (Guedes *et al.*, 2012), cuando estudiaron el parasitismo, como posible mecanismo antagonista contra diferentes patógenos en tomate obtuvieron que el aislamiento T-121 tuvo un crecimiento levemente mayor que los otros aislamientos de este hongo; sin embargo, no obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) entre los 6 aislamientos de *T. harzianum* estudiados. En estos resultados el contacto con el hongo se produjo a los tres días después del enfrentamiento. En la presente investigación el contacto se produjo a los cinco días, después de colocado el enfrentamiento. Los mismos plantean que el hecho de que los aislamientos de *T. harzianum* tuvieran contacto rápidamente con los hongos patógenos en un lapso de 3 días, indica que existe agresividad.

Diferentes autores plantean que el micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma* spp. Ha sido ampliamente estudiado, (Pérez, 2012). No obstante, existen aspectos en el mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales.





Figura 1. Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum* cepa A-53 sobre *S. rolfsii*.

#### **4.2.1 Eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma spp* como antagonista frente a fitopatógenos aislados de las semillas de frijol *A. flavus*, *A. niger* y *Rh. solani*.**

Al igual que los dos anteriores fitopatógenos que están presentes en las semillas de frijol, pero que constituyen importantes plagas fungosas durante su crecimiento vegetativo, se aislaron otras tres especies de hongos que aparecen fundamentalmente en la semilla, bien cuando son conservadas para la siembra o cuando se colocan en el suelo, en el momento de su germinación. Así fueron aislados *A. flavus*, *A. niger* y *Rh. solani*, los que también fueron enfrentados en las mismas condiciones de crecimientos duales a las tres cepas de *Trichoderma* seleccionadas para estas investigaciones. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos frente a la cepa TS-3 de *T. viride*. Puedo observarse como esta cepa presentó un crecimiento hifal similar, frente a los tres asilamientos, a los dos días (48 horas) cuando se iniciaron las observaciones, para esta fecha, el mayor crecimiento hifal radial lo mostró el aislamiento de *A. flavus* con 1,9 cm, superior al antagonista que fue de 0,5 cm, el mejor comportamiento de la cepa TS-3, se observó en el enfrentamiento contra *Rh. solani* que creció hasta los 0,9 cm y se observaba la inhibición de este patógeno, que solo creció 0,2 cm en este intervalo de tiempo.

**Tabla 6.- Prueba de antagonismo in Vitro de la cepa TS-3 de *T. viride* contra tres hongos fitopatógenos aislados de semillas de frijol.**

U/M = Crecimiento de las colonias en cm

Cepa	<i>TS-3</i>	<i>A. flavus</i>	<i>TS-3</i>	<i>A. niger</i>	<i>TS-3</i>	<i>Rh. solani</i>
Tiemp						
2 días	0,5	1,9	0,8	0,6	0,9	0,2
3 días	1,5	2,2	2,5	1,2	2,8	0,5
4 días	2,7	3,9	4,1	2,1	4,9	1,5
5 días	3,9	4,1	5,5	2,7	6,8*	2,3
6 días	4,1	4,3	6,5*	2,9	7,3**	2,5

\* Hiperparasitismo de *Trichoderma* solo en el borde de la colonia del fitopatógeno.

Elaboración propia

En las observaciones realizadas a las 72 horas (tres días), tabla 6, el enfrentamiento de la cepa *TS-3* contra *Rh. solani* exhibía el crecimiento más rápido con 2,8 cm y podía notarse la acción inhibitoria de esta cepa contra *Rh. solani* no así contra *A. flavus* y *A. niger*. Aislamientos que presentaban crecimientos similares al antagonista. Este resultado que se obtuvo a los tres días coincide con lo planteado por (León *et al.*, 2014) los que esbozaron, que los resultados que se han obtenido hasta el momento, se ha llegado a la conclusión que la producción del factor inhibitorio en *Trichoderma* depende más del aislamiento que de la propia especie. Aspecto este, que reafirma una vez más la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista, plantearon además que el micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *Rh. solani* es el responsable de la disminución de la densidad de inóculo de este patógeno y que se corresponde con un incremento en la densidad de población de *Trichoderma spp.*

También coinciden con los resultados obtenidos por (Rivero Deyanira., *et al.* 2008), cuando evaluaron cuatro aislamientos de *Trichoderma* sobre *Alternaria padwickii* (Ganguly) Ellis, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn y *Phoma spp.* y obtuvieron una alta capacidad competitiva, con dos o más tipos de interacción hifal, y no logran buen resultado en *Phoma spp.*

A los cuatro días (96 horas), el comportamiento de los enfrentamientos duales era similar a los observado, un día antes, con rápido crecimiento de la cepa TS-3 frente a *Rh. solani* que alcanzaba los 4,9 cm de crecimiento radial micelial, similar al enfrentamiento contra *A. niger*, pero con un crecimiento más lento y llegaba hasta los 4,1 cm. En esta fecha no se observaba acción inhibitoria de esta cepa contra *A. flavus*, este fitopatógeno aislado de la semilla superaba en su crecimiento radial hifal a la cepa TS-3 de *T. viride* 3,9 contra 2,7 cm.

En los muestreos realizados a los cinco días (120 horas), la cepa TS-3 de *T. viride*, alcanzaba los bordes de la colonia de *Rh. solani* y se producía el hiperparasitismo en el borde de la colonia de este aislamiento, penetraba en la colonia y se observó como producía la lisis del micelio por un cambio en el color del mismo. Un crecimiento más lento presentó esta cepa contra *A. flavus* y *A. niger* ante el primero no se observaba inhibición de fitopatógeno y cuanto al segundo se acercaba al borde de la colonia, con mayor crecimiento radial hifal y si lograba inhibir en crecimiento del fitopatógeno.

A los seis días (144 horas) último día de las observaciones, se observó como la cepa TS-3 penetraba en la colonia del micelio de *Rh. solani* produciendo el hiperparasitismo en toda la colonia, esta cepa alcanzaba los 7,3 cm de crecimiento radial micelial (tabla 6), penetrando en el interior de la colonia de *Rh. solani* y se producía el enrollado de las hifas de este hongo. A los seis días esta cepa TS-3 de *T. viride* también alcanzaba los bordes de la colonia del aislamiento de *A. niger* y mostraba 6,5 cm de crecimiento radial hifal.

No se observó inhibición contra el aislamiento de *A. flavus*. Este resultado obtenido contra *Rh. solani* coincide con los reportados por (Durman., *et al.* 2003) quienes encontraron una disminución del crecimiento de *Rh. solani* y de la viabilidad de los esclerocios por la acción de diferentes aislamientos de *Trichoderma spp.* También dan crédito a los planteado por (Reyes, *et al.*, 2009). Los que plantearon que antagonistas como *Trichoderma* le confieren protección a semillas, plántulas y hortalizas, en contra del ataque de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Phytophthora* y *Pythium*.

Otros investigadores han demostrado la acción de *Trichoderma* sobre *Rh. solani* (Howell, 2003). atribuye el fenómeno de control al micoparasitismo y a la

capacidad de este antagonista para producir toxinas, lo que ha explicado el control ejercido por diferentes cepas contra este fitopatógeno en numerosos cultivos.

En la presente tabla 7, se muestran los resultados obtenidos, en los enfrentamientos de *T. harzianum* cepa A-53 sobre *A. flavus*, *A. niger* y *Rh. solani*. Esta cepa presentó efecto inhibición sobre los tres aislamientos y a los seis días se observaba el hiperparasitismo sobre la totalidad de las colonias. A los dos días (48 horas) cuando se iniciaron las observaciones, el mayor crecimiento radial hifal lo mostraba la cepa A-34 en el enfrentamiento contra *A. niger* con 0,8 cm, similares crecimientos presentaban los dos restantes pruebas, los menores crecimientos observados a los dos días correspondían a *Rh. solani* y *A. flavus* con 0,2 cm de crecimiento radial hifal.

A los tres días (72 horas), se observó un rápido crecimiento de esta cepa A-53 en su enfrentamiento frente a *Rh. solani* con 2,6 cm, en este momento de las observaciones se notaba un efecto de inhibición de esta cepa, contra los fitopatógenos. Este resultado difiere en alguna medida del reportado por Guedes *et al.*, (2012), los que estudiaron el parasitismo, como posible mecanismo antagonista contra diferentes patógenos en tomate obtuvieron que el aislamiento T-121 tuvo un crecimiento levemente mayor que los otros aislamientos de este hongo; sin embargo, no obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) entre los 6 aislamientos de *T. harzianum* estudiados. El hecho de que los aislamientos de *T. harzianum* tuvieran contacto rápidamente con los hongos patógenos en un lapso de 3 días, indica que existía agresividad.

En estos resultados no se produjo el contacto hasta los cinco días en el enfrentamiento de la cepa A-53 contra *Rh. solani*. Se observó un crecimiento más rápido entre los tres y los cinco días.

Los resultados obtenidos corroboran lo planteado por (Carsolio Carolina., *et al*, 2009), donde señalan que las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

**Tabla 7.- Prueba de antagonismo in Vitro de la cepa A-53 de *T. harzianum* contra tres hongos fitopatógenos aislados de semillas de frijol.**

U/M = Crecimiento de las colonias en cm

Cepa/ Tiempo	A-53	<i>A. flavus</i>	A-53	<i>A. niger</i>	A-53	<i>Rh. solani</i>
Dos días	0,5	0,2	0,8	0,5	0,6	0,2
Tres días	2,4	0,9	2,4	1,6	2,6	1,6
Cuatro días	4,3	2,2	4,4	1,9	5,1	2,0
Cinco días	5,6	3,1	5,7	2,3	6,2*	2,9
Seis días	6,4**	3,1	6,3*	2,4	6,6**	3,2

\*\* Hiperparasitismo en la totalidad de la colonia del fitopatógeno.

Elaboración propia

En las observaciones realizadas a los cuatro días (96 horas), tabla 7, como ya se mencionó anteriormente la cepa A-53 de *T. harzianum* mostró un rápido crecimiento radial micelial en el enfrentamiento contra *Rh. solani* y alcanzó los 5,1cm y se observaba prácticamente en el borde de la colonia del fitopatógeno, revelándose un fuerte efecto de inhibición sobre *Rh. solani*. En los otros dos enfrentamientos se obtenían resultados similares del crecimiento radial micelial de esta cepa con 4,3 y 4,4 cm también se mostraba su efecto de inhibición.

A los cinco días (120 horas) se observó el hiperparasitismo de la cepa A-53 en el borde de la colonia en su enfrentamiento contra *Rh. solani* y llegó hasta los 6,2 cm penetrando en el interior de la colonia de este fitopatógeno del frijol. Se percibió como el antagonista producía un engrosamiento de sus hifas, emitía sus haustorios y lisis, observándose una descomposición del micelio del fitopatógenos. Para este mismo intervalo de tiempo, se halló un rápido crecimiento de la cepa en los dos restantes enfrentamientos, pero no se alcanzaba el borde de la colonia, los crecimientos fueron similares 5,6 y 5,7 cm.

Este resultado confirma lo planteado por (Orietta *et al.*, 2015) los que señalaron que el parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular.

En las observaciones realizada a los seis días se observó el hiperparasitismo en los tres enfrentamientos, contra *Rh. solani* la cepa A-53 de *T. harzianum* penetraba en el interior de la colonia y llegaba hasta los 6,6 cm, parasitando toda la colonia del fitopatógeno, acentuándose los síntomas descritos anteriormente, engrosamiento de las hifas del antagonista, el desarrollo de los haustorios y la lisis del micelio, marcado por un cambio de color de este, que se observaba por el anverso de la placa Petri.

En el enfrentamiento de esta cepa A-53, contra *A. flavus*, a los seis días también se observó que las hifas del hongo penetraban en el interior de la colonia de este fitopatógeno de la semilla y se producía el hiperparasitismo en toda la colonia, observándose síntomas similares a los descritos anteriormente, para *Rh. solani*. Aquí se obtienen resultados similares a lo planteado por (Infante *et al.*, 2012). Al decir que la acción de hiperparasitismo, es la acción del microorganismo que parasita a otro organismo de su misma naturaleza; es decir, lo utiliza como alimento y lo destruye. Compite por espacio y nutrientes con los hongos patógenos.

**Tabla 8.- Prueba de antagonismo in Vitro de la cepa A-34 de *T. harzianum* contra tres hongos fitopatógenos aislados de semillas de frijol.**

U/M = Crecimiento de las colonias en cm

Cepa						
Tiempo	A-34	<i>A. flavus</i>	A-34	<i>A. niger</i>	A-34	<i>Rh. solani</i>
2 días	0,6	0,5	0,3	0,2	0,9	0,4
3 días	2,2	1,5	2,6	1,4	3,7	1,3
4 días	3,8	2,3	3,9	2,2	5,2	2,1
5 días	5,6	2,5	5,7	2,3	6,3*	2,8
6 días	6,1*	3,0	5,9	3,0	6,7**	3,0

\* Hiperparasitismo solo en el borde de la colonia. Elaboración propia

En la tabla 8 se presentan los resultados del enfrentamiento de la Cepa A-34 contra los fitopatógenos aislados de las semillas de frijol *A. flavus*, *A. niger* y *Rh. solani*. Como puede observarse esta cepa fue la que presentó la menor velocidad de crecimiento medio radial del micelio y fue a los cinco días cuando se produjo

el contacto del micelio del antagonista con el borde del patógeno *Rh. solani*, y se produjo el hiperparasitismo en el borde de las colonias, aunque se observó en alguna medida el carácter inhibitorio de *Trichoderma*, no fue tan manifiesto como el observado con las cepas TS-3 y A-53. A los dos días (48 horas), se observaron crecimientos similares en los tres enfrentamientos y alcanzaba el mayor crecimiento radial micelial la cepa A-34 en el enfrentamiento con *Rh. solani* con 0,9 cm, similares crecimientos se mostraban en los dos restantes enfrentamientos con 0,6 y 0,5 cm.

A los tres días (72 horas) la cepa A-34 de *T. harzianum* reveló un rápido crecimiento y desarrollo de su micelio y alcanzaba los 3,7 cm, frente a 1,3 cm del fitopatógeno *Rh. solani*, observándose la inhibición de este en su crecimiento. Son varios los investigadores que plantean que *Trichoderma spp* presenta un rápido crecimiento del micelio entre las 48 y 96 horas después de la siembra, compitiendo por los nutrientes y el espacio y en los enfrentamientos duales generalmente inhibe el crecimiento de los patógenos a los que se enfrenta. Así lo reportan (López-Bucio *et al.*, 2015) los que plantean que *Trichoderma* produce un efecto de parasitismo al asociarse con las colonias de hongos patógenos para después inhibir su desarrollo en los sustratos, en el suelo o dentro de las raíces. En las condiciones naturales de suelo y planta, favorece la producción de fitoalexinas que activan los mecanismos de defensa de las plantas.

En las evaluaciones realizadas en los dos restantes enfrentamientos de esta prueba en el mismo intervalo de tiempo, el crecimiento de la Cepa A-34 fue algo más lento y alcanzaba los 2,2 y 2,6 cm, también el crecimiento de los dos fitopatógenos era similar con 1,5 y 1,4 cm, la acción de inhibición frente a estos dos aislamientos de la semilla de frijol era menor.

En las mediciones ejecutadas a los cuatro días (96 horas), igualmente en el enfrentamiento contra *Rh. solani* la cepa A-34 mostró el más rápido crecimiento radial hifal y media 5,2 cm y se aproximaba al borde de la colonia, se observaba un efecto de inhibición del fitopatógeno y posteriormente se produjo un efecto de parasitismo. Esta cepa ha sido utilizada en diferentes investigaciones para comprobar su efecto antagonista ante diferentes fitopatógenos aislados de semillas de distintas especies de plantas, por ejemplo, (González. M. *et al.*, 2008)

utilizando dos cepas *Trichoderma* para determinar su acción antagónica sobre fitopatógenos, en semillas de frijol, arroz, lechuga y girasol, encontró diferencias en el diámetro de las colonias en el cultivo dual con respecto al testigo. La mayor acción antagónica la observó sobre *Sarocladium oryzae* (45,45 % de inhibición del crecimiento con respecto al testigo para la cepa C-66 y 28,5 para A-34), en sus resultados obtuvo diferencias estadísticas entre ambas cepas. Para el caso de *Rh. solani* aislada de frijol la cepa A-34 tuvo un efecto mayor que la cepa C-66 pero sólo con un 21 % de reducción de la colonia con respecto al testigo.

Los enfrentamientos duales de La cepa A-34 contra *A. flavus* y *A. niger* tenían similar comportamiento a las mediciones realizadas anteriormente, los valores fueron de 3,8 y 3,9 cm de crecimiento radial hifal y se observaba una menor inhibición de estos dos fitopatógenos.

A los cinco días (120 horas), el enfrentamiento de la cepa A-34 de *T. harzianum* contra *Rh. solani*, se observaba la interacción del antagonista contra el fitopatógeno, las hifas penetraban en el borde de la colonia, y se producía el hiperparasitismo en esta zona, a los seis días colonizaba toda la colonia y se inició la descomposición del micelio del patógeno, se observó un cambio de color en el borde de la colonia, por la lisis del micelio. En los dos enfrentamientos contra *Aspergillus* también se observaba el efecto inhibitor, aunque fuera en menor grado. La cepa A-34 creció hasta los 5,6 y 5,7 cm respectivamente contra *A. flavus* y *A. niger*.

En las observaciones realizadas a los seis días (144 horas), como ya comentamos anteriormente en el enfrentamiento de la Cepa A-34 contra *Rh. solani*, el antagonista penetraba en el interior de la cepa de este fitopatógeno y mostraba el mayor crecimiento micelial con 6,7 cm penetrando en el interior de la colonia y se producía el hiperparasitismo en toda la colonia, para este intervalo de las mediciones también el enfrentamiento de esta cepa contra *A. flavus* hacia contacto en el borde de la colonia y producía el hiperparasitismo en esta zona del crecimiento y medía 6,1 cm. Muchos autores han atribuido el fenómeno de control de *Trichoderma* al micoparasitismo y a la capacidad de este antagonista para producir toxinas, lo que ha explicado el control ejercido por diferentes cepas contra *Rh. solani*. Recientemente se ha atribuido el fenómeno de control de



diversos fitopatógenos a la producción de enzimas líticas de *Trichoderma* spp. del tipo quitinasas y glucanasas. Estas enzimas han demostrado capacidad para romper los polisacáridos quitina y - glucanos, que son constituyentes de la pared de los patógenos y que le confieren la rigidez a su pared celular (Howell, 2003).

#### 4.3. Determinación de la eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma* spp sobre la germinación y protección de las semillas de frijol común.

Al comparar y analizar estadísticamente los valores de germinación de semillas según los tratamientos ensayados (Tablas 9), no se halló diferencias significativas entre los tratamientos Testigo (agua destilada estéril), *Trichoderma* cepa A-53 y TMTD, aunque se registra una ligera reducción en el porcentaje de germinación, destacándose negativamente el tratamiento TS-3 de *T. viride*, que si presentó diferencias significativas con relación al resto de los tratamientos, en los ensayos realizados con semillas de frijol, procedentes de dos lotes conservados para la siembra de campaña 2018-2019.

**Tabla 9. Evaluación de los tratamientos en la germinación de semillas de frijol común (*Ph. vulgaris*). U/M = (%).**

Días/VARIABLES	1	2	3	4	5	6	Total
Testigo. Agua destilada y estéril	0	0	0	20	62	12	94 <sup>a</sup>
Tratamiento Cepa TS-3. <i>T. viride</i>	0	0	0	10	50	12	72 <sup>b</sup>
Tratamiento Cepa A-53. <i>T. harzianum</i>	0	0	0	30	64	2	96 <sup>a</sup>
Tratamiento Químico. TMTD.	0	0	0	32	61	2	95 <sup>a</sup>

*a, b letras no comunes difieren significativamente para P < 0,01 (Duncan 95 %)*

#### 4. 4. Compatibilidad de *Trichoderma* spp en aplicación con TMTD

En los cuatro tratamientos realizados se observó compatibilidad del producto químico TMTD y la Cepa A-53 de *T. harzianum* utilizada para el ensayo. En las cuatro variantes se observó el crecimiento de *Trichoderma* en las semillas. La germinación se comportó de la misma manera del ensayo de TMTD para comprobar germinación y se logró un mejor control de los microorganismos patógenos de las semillas.

## VALORACIÓN ECONÓMICA

Tabla 10. Costos por tratamientos.

Tratamiento	Consumo kg / kg de semilla	Precio (\$/kg)		Costo \$/aplicación
		MN	USD	
<b>TMTD</b>	<b>0.070 – 0.098</b>	<b>2.12</b>	<b>2.12</b>	<b>0.148- 0.207</b>
<b>Trichoderma</b>	<b>0.003</b>	<b>8.95</b>	<b>-</b>	<b>0.027</b>

La Empresa Provincial de Semillas, radicada en Jovellanos, procesa anualmente alrededor de 113 750 Kg de semillas. El tratamiento con TMTD se realiza aplicando dosis que varían entre 0.07 y 0.098 kg del producto comercial por kilogramo de semilla, según se trata de hortalizas o granos, lo que implica un costo unitario entre 0.15 y 0.21 peso/kg de semilla tratada con este insumo importado, mientras que con la variante biológica a base de *Trichoderma*, el costo se reduce a 0.03 peso/kg. de semilla permitiendo un 84% de reducción de los costos actuales de la referida Empresa por este concepto, considerando sólo el costo subsidiado del fungicida en moneda nacional.

Para ilustrar con cifras, se trata de que el tratamiento con TMTD a los 113 750 kg de semilla le costaría alrededor de \$ 20 247. 50 (cup), -(para lo cual el Estado cubano debe invertir una cifra similar, pero en moneda libremente convertible)-, mientras que aplicando *Trichoderma* el costo se reduce a sólo \$ 3 071.25 (cup)

Estas cifras llegan a ser más significativas si los cálculos se realizan tomando en cuenta el gasto real en que incurre el Estado cubano al adquirir este producto en el mercado internacional, convirtiéndose el costo real en algo más de \$ 50 687.50.

## V.CONCLUSIONES

- Fueron aisladas cinco cepas monoconidiales de los hongos *S. rolfsii*, *F. solani*, *A. flavus*, *A. niger* y *Rh. solani*, presentes en las semillas de frijol, especies afectan la germinación y posterior desarrollo de la planta.
- Las tres cepas de *Trichoderma spp* mostraron su eficiencia como antagonistas de los cinco aislamientos de las semillas de frijol con destaque para la Cepa A-53 de *T. harzianum*.
- Se observó la inhibición y el hiperparasitismo de las tres cepas de *Trichoderma* destacándose la cepa A-53 de *T. harzianum* la que, puede ser incluida en una estrategia de manejo de plagas fungosas de las semillas de frijol.
- Las pruebas de compatibilidad demostración que es posible la utilización combinada de TMTD y la Cepa A-53 de *T. harzianum* en el control de fitopatógenos de las semillas de frijol común.

## VI.RECOMENDACIONES

- Llevar estos resultados a investigaciones en condiciones de campo y peletizar las semillas con la cepa A-53 de *T. harzianum* por su actividad antagónica sobre diferentes fitopatógenos de las semillas de frijol común y evaluar sus resultados en el agroecosistema de los campesinos.
- De este estudio se resalta la importancia que tiene la búsqueda de otras alternativas para el manejo de las plagas fungosas en el cultivo de frijol por lo que se recomienda llevar estos resultados a investigaciones en condiciones de campo y peletizar las semillas con la cepa A-53 de *T. harzianum* por su actividad antagónica sobre diferentes fitopatógenos de este cultivo.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Araya, C.M. (2003) Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatologia Brasileira* 28(3):221-228.
2. Beltrán, C.; Cotes, A. M.; Paris, A. (2007). Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* Kühn, in potato. *IOBC Bulletin* Vol. 30 (6) 55 - 58.
3. Blanco y Leyva (2013). Las arvenses y su entomofauna asociada en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*, L.) posterior al periodo crítico de competencia *Avances en Investigación Agropecuaria*. Aia. 17(3): 51-65.
4. Brotman, Y.; Briff, E.; Viterbo, A.; Chet, I. (2008) Role of Swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.*; 147(2):779-789.
5. Campbell, R. (1989) *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press. Cambridge. 218p.
6. Cardona, C.; Jarma, A.J. y Araméndiz, H. (2013). Mecanismo de adaptación a sequía en frijol Caupí (*Vigna unguiculata* L.Walp). *Ciencia Hortícola*. 7 (2): 277-286.
7. Carreras, B. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. *Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 129-133.
8. Carsolio, C.; Benhamou, N.; Haran, S.; Cortés, C.; Gutierrez, A.; Chet I.; Herrera-Estrella, A. (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol.*; 65:929-935.
9. Chávez, P. (2006). Producción de *Trichoderma* spp, y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Trabajo de grado. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias. 178 p. Consultado 20 junio 2019.
10. Coaquira, F.; Huaranga, A. Juscamaita, J. (2017): Efecto de la inoculación con *Rhizobium* sp., *Trichoderma* sp. y de la aplicación de biofertilizantes sobre el rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Blanco Molinero. , Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina.

11. Cotes, A.M. (2013): Aislamiento, selección y mecanismos de acción de *Trichoderma koningiopsis*. Centro de Biotecnología y Bioindustria - CBB, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA.
12. Cotes, A.M.; Cárdenas, A.; Pinzón, H. (2013). Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. IOBC WPRS Bulletin Vol. 24 (3) 259 - 263.
13. Cruz-Triana, A.; Rivero-González, D.; Infante-Martínez, D.; Echevarría-Hernández, A.; Martínez-Coca, B. (2018) Manejo de hongos fitopatógenos en *Phaseolus vulgaris* L. con la aplicación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg de Protección Vegetal, Vol. 33(3). 7p.
14. De Meyer.; Bigirimana, J., Elad, Y.; Hofte, M. (2018). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104: 279 - 286.
15. Dennis L, Webster J. (1971) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphalinteraction. Trans Br Mycol Soc.; 57(2):363-369.
16. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
17. Djonoviae S, Pozo M, Kenerley C. (2006) Tvbg3, a b-1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium multimum*. Appl Environ Microbiol; 72(12):7661-7670.
18. Durman S, Menéndez A, Godeas A.(2003) Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* "in vitro" y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. Argentina de Microbiología. ;31(1):13-18.
19. Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M. E. y Candela M. E. (2004) *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora Capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Universidad de Murcia, España. Anales de biología, Vol. 1(26), 35-45.
20. FAOSTAT (2018) Beans harvested area and production. [En línea]: <http://www.fao.org/statistics>. Consultado 15-04-2019.

21. Ghangaokar, N.M. ; Kshirsagar, A.D. (2013) Study of seed borne fungi of different legumes. *Trends in Life Sciences* 2(1): 32-35
22. González M.; Castellanos L.; Ramos M.; Pérez G. (2008) Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz. Evaluation of strain of *Trichoderma* spp. against pathogens seeds of bean, lettuce, sunflower and rice. *Centro Agrícola*, 35(1): 11-15.
23. Guillén-Cruz, R.; Hernández-Castillo, F.D.; Gallegos-Morales, G. (2006). *Bacillus* spp. Como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2): 105-114.
24. Harman, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, I. Y Lorito, M.( 2014) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology.*; 2:43-56.
25. Harman, G.E.; Howell C.; Ada V.; Chet I. Y Lorito M. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Departments of Horticultural Sciences and Plant Pathology, Cornell University, Geneva, New York 14456, USA. USDA/ARS, SPARC, College Station, Texas 77845, USA. Weizmann Institute, Rehovot 76100, Israel.
26. Hernández, A.; Jiménez, M.; Arcia, A.; Ulacio, D.; Méndez, N. (2013) Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante RAPD y rADN-ITS. *Bioagro* ; 25(3):167-174.
27. Hjeljord, L. Y Tronsmo, A.(1998) *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an over view. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Vol. 2(2). 131-151.
28. Howell, C. R. (2013). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*: Vol. 87(1):4 - 10.
29. Infante, D.; Martínez, B.; Peteira, B.; Reyes, Y.; Herrera, A.; (2013) Identificación molecular y evaluación patogénica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. *Biotecnología Aplicada.*; 30(3): 23-28.

30. Johnson, A.W., Minton, N.A., Breneman, T.B., Burton, G.W., Culbreath, A.K., Gascho, G.J., and Baker, S.H. (1999). Bahiagrass, corn, cotton rotations, and pesticide for managing nematodes, diseases, and insects on peanut. *Journal of Nematology* 31:191-200.
31. Kennedy, I. R.; Choudhury, A. T. M. A.; Kecskes, M. L. (2014). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited *Soil Biology & Biochemistry* 36 (8): 1229 - 1244.
32. Kennedy, I. R.; Choudhury, A. T. M. A.; Kecskes, M. L. (2014). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited *Soil Biology & Biochemistry* 36 (8): 1229 - 1244.
33. López, M. O. E.; Sandoval, I. (2006): "Selección de cepas antagonicas del género *Trichoderma* Person. *Fitosanidad* 10(2):132.
34. López-Bucio(2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 196:109-123.
35. Lorenzo N.(2001) Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. La Habana. Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana.
36. Marín, S. (2012). *Trichoderma* spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo del café. En: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. *Cenicafé* N 38.
37. Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. (2011) About to identification of some *Trichoderma* isolates reported in *Revista de Protección Vegetal. Protección Veg.*
38. Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. (2015) *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Veg* ; 28(1):1-11.
39. Monaco, C. V. ; Bonfiglio, C.M. Y Bolotti, P.A. (2006): Efecto de *Trichoderma virens* sobre patógenos causantes del damping off en especies hortícolas, en *Memorias del Taller Latinoamericano de biocontrol de Fitopatógenos con Trichoderma y otros antagonistas*, La Habana.
40. Negrone, C.; León, M.; Villalba, N.(2008) Evaluación del comportamiento de plantines de *Pinus taeda* L. con y sin aplicación de fertilización starter



- creciendo en sustrato con *Trichoderma harzianum*, Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 60p.
41. Nerey, Y, Pannecoucq J, Hernández HP, Díaz M, Espinosa R, De Vos E, Van Beneden S, Herrera L, Höfte M (2010) *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology* 158(2): 236-243.
  42. Olivera, V.; Rodríguez, D. (2014). Evaluación del crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de *Eucalyptus grandis* con aplicación de bio estimulantes, *Trichoderma harzianum* (Trichosoil®) y quitosano (Biorend®), en plantación. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 205p.
  43. Paez, M.E.; Sanabria, N.A. (2006): «Evaluation of the Antagonistic Capacity of *Trichoderma koningii* Above *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*», *Rev. Fav. Agron.* 24 (1): 27-31, Venezuela.
  44. Pérez, C.M.(2012). Aislamientos de *Trichoderma* spp., nativos de Venezuela, promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en maíz (*Zea Mays* L.). Venezuela. Trabajo de Grado presentado como requisito final para optar al título de Magister Scientiarum en Agronomía.
  45. Pieterse, C. M. J. Y Loon, L. C. (2012). Salicylic acid independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52–58.
  46. Reyes, T.; Rodríguez, G.; Pupo, D.; Alarcón, L. Y Cutido, Y. (2009): “Efectividad “in vitro” de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol de *R. solani* Kuhn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)”. *Fitosanidad* 10(2):136.
  47. Rivero D.(2008). Identificación y control in vitro con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). *Protección Veg* ; 23(1): 67p
  48. Ryu, C. M.; Hu, C.H.; Reddy, M. S.; Kloepper, J. W. (2003). Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist* 160 (2): 413 - 420.
  49. Salas, M. (2007) Generación de cepas transformantes del hongo *Trichoderma* spp. Que expresen constitutivamente la versión AS y OE del gen SM1 que codifica para un elicitador del sistema de defensa en

- plantas. Conferencia en IPICYT, 1. San Luis Potosí, México. Disponible en: <http://www.ipicyt.edu.mx/Trichoderma/elicitortransformación.php.htm>. [Consultado: 24 de marzo de 2019].
50. Samuels, G.; Dodd, S.; Lu, B.; Petrini, O.; Schroers, H. Y Druzhinina, I. (2006) The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology.*;56:67-133.
  51. Sandoval Ileana, López M. (2002) Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A-34 hacia *Macro phomina phaceoli* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad*;4(3-4):69-72.
  52. Sharon, E.; Chet, I.; Spiegel Y. (2011) *Trichoderma* as a Biological Control Agent Davies K, Spiegel Y. *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, © Springer Science.
  53. Shoresh, M.; Harman, G.; Mastouri, F. (2010) Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu Rev Phytopathol.*; 48(3):21-43.
  54. Stefanova, M.; Leiva, A.; Larriganaga, L.; Coronado, M.F.; (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Facultad de Agronomía.*;16(4): 509-516.
  55. Taylor & Francis, I.; Herrera-Estrella, A. (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *App I Environ Microbiol.*; 65(2):929-935.
  56. Torres, A.R.; Cursino, L.; Muro-Abad, J.I.; Gomes, E.A.; Araujo, E.F.; Hungria, M.; Alves, S.T. (2009) Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 852–856.
  57. Treviño y Rosa (2013) plantean que Independientemente de la variedad, la producción del frijol común se ve comprometida por una serie de factores que se clasifican como bióticos (seres vivos con los que se relaciona) y abióticos (ambientales, físicos y químicos).
  58. Villegas, M.A. (2005) *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. *Orius Biotecnología*. Colombia. (Consultado: 28 oct 2008). Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0>

59. Wei, G.; Kloepper, J.W. and Tuzun, S. (2016). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growthpromoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86: 221 - 224.
60. Whipps, J.M. (2011). Microbial interactions and Biocontrol in the Rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487 - 511.
61. Woo, S.; Lorito, M. (2007) Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M, Gressel J. (Eds.). *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer. 107-130.