



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE AGRONOMÍA

Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Título: Evaluación de cepas de *Trichoderma spp.* para el manejo de plagas fungosas en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Autora: Fanny Oliva Cruz

Tutor: MSc. Roberto León Aguilar

MSc. Marialys Trujillo Arbelo



Matanzas

2019

FRASE

" La agricultura es la profesión propia del sabio, La más adecuada al sencillo y la ocupación más digna para todo hombre libre."

Cicerón.

Declaración de Autoridad

Declaro que yo, Fanny Oliva Cruz, soy la única autora 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 pertinente.

Firma

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecerle a mi madre, que por ella y gracias a ella he llegado a culminar mis estudios de la educación superior, con pausas y retrasos, pero lo he hecho, gracias por siempre confiar en mí, y por guiarme siempre por el camino correcto, disculpa por todos los dolores de cabeza, y los disgustos, pero aquí estoy mamita, donde tu querías, y a donde siempre me guiaste a ser una persona profesional, y de bien.

A mi tutor Roberto León, por ser tan amoroso, dedicado y comprensivo, y por confiar en mí siempre, por ayudarme en cada momento, y sin el cual este trabajo de diploma no hubiese sido posible realizar.

A las otras personas que estaban a mi lado siempre apoyándome y deseándome lo mejor, que son mi otra familia, ellos son mis vecinos, y mis amigas.

A mis compañeros de aula del curso 2016-2017 que me acompañaron durante 4 años de mi vida de los cuales tengo hermosos recuerdos.

A los que se graduaron en el curso 2017-2018, que aunque solo fueron unos meses, me encanto compartir con ellos, y conocerlos, que me abrieron las puertas y desde el principio siempre fue como si hubiese estudiado toda mi carrera con ellos.

Al excelente claustro de profesores que me impartieron clases durante todo el transcurso de mi carrera, de todos y cada uno de ellos aprendí muchísimo, no solo por lo que saben, sino por el amor con que lo hacen llegar a cada uno de los estudiantes.

A mis abuelos, hermanos, sobrinos, primos, a mi padre, y tíos.

En fin a todos los que de una forma u otra aportaron su granito de arena para que esto pudiera ser posible.

A todos

Muchas Graciasssss...

DEDICATORIA

A mi madre, porque lo es todo en mi vida.

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, conocer la incidencia de plagas sobre las mismas y comprobar la efectividad de los productos fitosanitarios que aplican, así como las estrategias que utilizan para el manejo de las mismas. Por todas estas razones la tesis presentada por la estudiante Fanny Oliva Cruz posee un gran valor científico, por el aporte dado al tratamiento de los fitopatógenos, 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 obtener un mayor porcentaje de germinación y desarrollo saludable de las plantas. La 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 frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es la especie de leguminosa 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), el cual debido a la incidencias de diferentes organismos patógenos, no es posible superar la producción. Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos. En este sentido, las especies del género *Trichoderma* se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo. Estas especies presentan diferentes modos o mecanismos de acción que le permiten el control de los fitopatógenos. En este trabajo, se evaluó la actividad “*in vitro*”, antagónica de *Trichoderma harzianum* cepas A-34 y A-53, *Trichoderma viride* cepa TS-3, sobre los hongos patógenos *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Pseudocercospora griseola*. El ensayo se desarrolló en placas de Petri (x 9 cm) en papa dextrosa agar, sembrando el patógeno y *Trichoderma* en cultivo dual. Obteniéndose como resultado que las cepas TS-3 y A-34 no mostraron una alta eficiencia como antagonistas de los aislamientos *F. solani* y *Ps. griseola* con 28,0 y 28,1 % de inhibición respectivamente, esta misma cepa alcanzó un 53,9 % sobre *S. rolfsii* y la cepa A-34 un 49,4 % sobre *Ps. griseola* resultados que pueden ser alentadores. Resultaron muy positivos los resultados obtenidos con la cepa A-53 con 67,1 % de inhibición del aislamiento de *S. rolfsii* y 59,2 % para *Ps. griseola* algo inferior fue el resultado para *F. solani* con un 44,0 %, sobre este fitopatógeno de suelo, se obtuvieron los menores por ciento de inhibición.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.0 Características del Cultivo.....	14
2.1 Origen.....	14
2.2. Principales organismos Nocivos.....	15
2.2.1. Principales plagas insectiles y ácaros.....	15
2.2.2. Moluscos.....	15
2.2.3. Principales plagas fungosas.....	15
2.2.4. Principales plagas bacterianas.....	21
2.2.5. Principales plagas virales.....	22
2.3.0 <i>Trichoderma</i> . Clasificación Taxonómica.....	24
2.3.1 Mecanismo de acción de <i>Trichoderma</i> frente a hongos fitopatógenos.....	26
2.3.1.1. Antibiosis.....	28
2.3.1.2. Micoparasitismo.....	29
2.3.1.3. Competencia.....	31
2.3.2. Importancia de <i>Trichoderma spp.</i> Como alternativa de lucha en la agricultura.....	31
2.3.3. Uso de <i>Trichoderma spp.</i> en lucha biológica de fitopatógenos en el suelo.....	33
2.3.4. Uso de <i>Trichoderma spp.</i> en la lucha bilógica en la superficie aérea (flores, frutos y follaje).....	34
2.3.5. Ventajas de <i>Trichoderma spp.</i> en su empleo como antagonista.....	36
2.3.6. Otros biocontroles.....	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1. Localización del experimento.....	40
3.2. Trabajo de campo y laboratorio.....	40
3.2.1. Obtención de cepas.....	41
3.1.1. Trabajo de laboratorio.....	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
V. CONCLUSIONES.....	60
VI. RECOMENDACIONES.....	61

VII.BIBLIOGRAFÍA	62
VIII.ANEXOS	68

INTRODUCCIÓN

La producción de granos principalmente frijol y maíz crece aceleradamente en el país y según declaraciones a la prensa del Ministro de la Agricultura en el año 2019, Cuba pretende producir más del 70 % de sus necesidades para el consumo y el mayor aporte de estas producciones será realizado por los campesinos. 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, que según Chailloux *et al.* (1996), 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 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.

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 (Parra, 2012).

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 (Mello, *et al.*, 2006).

Son numerosos los fitopatógenos del frijol en todas las provincias del país, entre las que se destacan mancha angular, causada por el hongo *Pseudocercospora griseola* (anteriormente identificado como *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris) (Muiño *et al.*, 2006), según reportan (Domínguez *et al.*, 2012), afecta al frijol y otras fabáceas, es de gran importancia en Cuba por su amplia distribución geográfica y las pérdidas que causa. El inóculo proviene principalmente de los restos contaminados de la cosecha anterior y de semilla contaminada con el patógeno.

Esta enfermedad es favorecida por temperaturas moderadas entre 16 y 28°C, con un óptimo de 24°C. La Mancha angular es más severa cuando ocurren períodos alternos de alta y baja temperatura, alta y baja humedad relativa y mucha y poca luz solar.

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. 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.

Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Fernández, 2001).

Desde los primeros estudios en esta temática y hasta el presente, entre las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos (Cervantes, 2007).

Según Cruz-Triana *et al.*, 2018. Las especies de *Trichoderma spp.* como controladores biológicos y antagonistas naturales de fitopatógenos muestran 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) Syd.y Hans, *Fusarium roseum* Link, *Botrytis cinerea* Pers, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Sclerotinia spp.*, *Pythium spp.* *Phytophthora spp.*, *Alternaria spp.*, entre otros.

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.

Problema científico

La incidencia de hongos fitopatógenos en el cultivo del frijol, ocasionan importantes pérdidas en este cultivo y las aplicaciones de fungidas, además de encarecer el mismo contaminan el ambiente.

Hipótesis

La búsqueda de cepas de *Trichoderma spp.* que tengan efectos antagonistas 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 tres hongos fitopatógenos ***Fusarium solani***, ***Sclerotium rolfsii Sacc.*** ***Pseudocercospora griseola*** Sacc. Feraris). en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.

Objetivos específicos:

Aislar cepas puras de los hongos fitopatógenos *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Pseudocercospora griseola* en el cultivo del frijol (***Phaseolus vulgaris*** L.) en plantaciones de la CCSF "Victoria de Girón".

Comparar el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pseudocercospora griseola*. frente a las cepas *T. harzianum* cepas A-34 y A-53 y *T. viride* cepa TS-3.

Determinar el efecto antagónico de las cepas *T. harzianum* cepas A-34 y A-53 y *T. viride* cepa TS-3, frente a los hongos fitopatógenos *F. solani*, *S. rolfsii*, *Ps. griseola* aisladas en el cultivo del frijol (***Phaseolus vulgaris*** L.) en plantaciones de la CCSF "Victoria de Girón".

Análisis realizados

La determinación de la actividad antagonista se realizó a partir del cálculo del porcentaje de inhibición según Rapilly (1968), y que ha sido utilizado por varios investigadores. Además, fue estimado el crecimiento del micelio y crecimiento micelial medio, utilizándose las formulas recomendadas para ello.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.0 Características del Cultivo

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es entre las leguminosas de grano alimenticias, la especie más importante por el elevado contenido de nutrientes que posee. Este grano proporciona una fuente esencial de proteínas, vitaminas y minerales a la dieta de las poblaciones en América, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Buruchara, Mukankusi y Ampofo, 2014; Rodríguez., *et al.* (1990), plantean que este grano puede ser consumido como vaina fresca o tierna y también sus granos secos.

2.1. 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 favas 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.

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.

2.2. Principales organismos Nocivos

Algunas de las principales plagas que atacan al cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Cuba según Martínez *et al.*, (2007) son las siguientes:

2.2.1. Principales plagas insectiles y ácaros

- Mosca blanca (*Bemisia tabaci*, Gennadius)
- Salta hojas (*Empoasca kraemeri*, Ross y Moore)
- Ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus, latus*)
- Ácaro rojo (*Tetranychus tumidus*, Banks)
- Crisomélidos (*Andrector ruficornis*) y (*Diabrotica balteata*, Le Conte)
- Falso medidor (*Trichoplusia ni*)
- Gorgojos de los granos (*Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*).

2.2.2. Moluscos

- *Vaginulus plebeius*
- *Sirasinula plebeia*

2.2.3. Principales plagas fungosas

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. 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.

Roya del frijol (*Uromyces appendiculatus*, [Pers.] Unger), se considera en Cuba, una de las principales plagas del frijol, sobre todo cuando las siembras se realizan tardíamente, es una plaga fungosa, de mucha importancia en el cultivo de frijol, los síntomas que causa pueden afectar cualquier parte aérea de la planta, ya sea en el tallo o vainas, pero es más común en las hojas, tanto en el haz como en el envés. Se inician como pequeños puntillos de color blanco-amarillento levantados, que posteriormente se incrementan y rompen la epidermis formando una pústula que puede alcanzar un diámetro de un milímetro. Al madurar liberan una cantidad de polvillo color rojizo, que corresponde a las esporas del hongo. Las condiciones ambientales favorables para la aparición del patógeno son los períodos prolongados de 10-18 horas de alta humedad relativa (mayor de 90 %) y temperaturas moderadas de 17-27°C.

Antrácnosis: es causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Mag.) (Scrib). Es una plaga fungosa de importancia económica del cultivo de frijol. Es muy frecuente en localidades con clima fresco a fríos y alta humedad relativa. El hongo es favorecido a temperaturas entre 13 y 26°C, con una óptima de 17-18°C y lluvias moderadas a intervalos frecuentes. Las lluvias acompañadas de vientos son favorables para la diseminación de las esporas del patógeno a corta distancia. Antracnosis es frecuente en localidades con elevaciones superiores a 1000 msnm., rara vez ocurre en lugares con climas secos y calientes. La semilla infectada es el medio más común de diseminación del patógeno. La transmisión del hongo en la semilla es alta. El agente patógeno tiene la capacidad de atacar la planta en cualquier etapa del desarrollo. En el estado de plántula, los síntomas se observan en el hipocotíleo como pequeñas lesiones de color marrón oscuro, de aspecto acuoso, ligeramente hundidas y de

forma ovalada. A medida que la planta se desarrolla, estas lesiones se pueden observar sobre el tallo principal y en el pedúnculo de las hojas.

En las hojas, los síntomas están muy bien definidos, sobre todo en el envés. El hongo avanza por las venas primarias o secundarias, causando necrosis en los tejidos. Los síntomas más característicos de Antracnosis se encuentran en las vainas. Estas se inician con lesiones pequeñas, redondas, color marrón rojizo, de borde definido, que crecen y presentan un borde hundido. Como consecuencia del ataque de las vainas, el agente patógeno infecta la semilla causándole decoloración o deformación. En la vaina los síntomas podrían confundirse con los producidos con la Mancha Angular; sin embargo, la lesión que ésta causa es de color grisáceo y no tiene el centro hundido. La enfermedad se disemina principalmente con el salpique de la lluvia, insectos y el paso de personas o animales. La semilla es un importante medio de transmisión y sobrevivencia del hongo. En el campo, el patógeno permanece infeccioso en residuos de las cosechas.

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.

Diferentes autores han investigado la acción de distintas cepas de *Trichoderma* sobre *F. solani* así plantean Stefanova, *et al.*, (1999) 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.

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, Negrone (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*. El tratamiento de la semilla con *Trichoderma* constituye una alternativa para disminuir su incidencia.

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 (Negrone *et al.*, 2008) 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.

El hongo produce estromas oscuros en las lesiones y, en climas húmedos, los coremios pueden desarrollar muchos conidios.

Numerosos autores han plateado, su variabilidad morfológica y lo han demostrado a través de cultivos monobasidiospóricos en papa-dextrosa-agar (PDA), además, se ha visto que los medios de cultivo y la temperatura pueden influir tanto en la morfología del micelio como en la producción de esclerocios, los cuales son estructuras de supervivencia y constituyen la principal fuente de inóculo primario (Hernández-Jiménez *et al.*, 2013) y (Martínez *et al.*, 2014).

En trabajos de laboratorio (Hernández-Jiménez *et al.*, 2013) demostraron con varios aislamientos de *S. rolfsii* su crecimiento radial en cinco medios de cultivos diferentes: Jugo de verduras V8-Agar (V-8), papa-dextrosa-agar (PDA), extracto de malta-agar (EMA), extracto de cebolla-agar (ECA), y extracto de ajo-agar (EAA). con hifas laxas en V-8, PDA, ECA, y EAA; en tanto que, en EMA, este crecimiento radial presentó variantes con hifas compactas a manera de bandas, o formando círculos concéntricos a manera de anillos en la mayoría de los aislamientos.

Especies de *Trichoderma* se han reportado como hiperparásitos de un gran número de hongos fitopatógenos al atacar directamente y producir la lisis de micelios y también de esclerocios de hongos (Benhamou y Chet, 1996). Los resultados de Lima *et al.* (1997) evidenciaron la acción de una quitinasa en la pared celular de *S. rolfsii* y de *Rhizoctonia solani*. El-Katatny *et al.* (2001) demostraron la actividad de enzimas quitinasa y β -1,3-glucanasa contra *S. rolfsii* en medio de cultivos con las enzimas purificadas a partir de filtrados de colonia del antagonista. Otros importantes mecanismos de acción que usan estos hongos, en dependencia de la especie y aun de la cepa utilizada dentro de una especie, están relacionados con la secreción de diversos antibióticos, competencia por nutrientes y espacio, inducción de resistencia en la planta y tolerancia a estrés (Harman, 2000; Howell, 2003). Tales mecanismos pueden operar de manera independiente o simultánea en las interacciones microbianas (Howell, 2003). Por otra parte, la efectividad en controlar un hongo fitopatógeno en particular puede variar para un aislamiento del antagonista en la medida de

su peculiaridad en términos de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas.

En trabajos realizados por Sueli Corrêa *et al.*, 2007 investigando de la actividad antagónica de cepas de *Trichoderma* por el método de cultivo dual obtuvo que todas las cepas inhibieron el crecimiento del hongo patógeno cuando se aislaron en cultivo dual, en la proporción de 18,97 hasta 44,12%, comparado con el crecimiento del testigo. Las cepas CEN220, CEN249, CEN260, CEN262 y CEN266 fueron las que presentaron actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *S. rolfsii* a las 120 h, por lo que recibieron calificación de 1 en la escala de clasificación de Bell *et al.* (1982). Una vez alcanzada la zona de demarcación entre los inóculos, estas cepas continuaron su crecimiento hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno, sobre el que produjeron esporas.

Este colectivo de autores cuando evaluó el antagonismo a *S. rolfsii* mediante incorporación de filtrados de colonias de *Trichoderma* al medio el porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* frente al testigo, fue distinto con las cepas de *Trichoderma* ensayadas. El valor medio más elevado se obtuvo con la cepa CEN252 (PICR = 72,35%).

La mancha angular causada por el hongo *Pseudocercospora griseola* (anteriormente identificado como *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris) (Muiño *et al.*, 2006), según reportan (Domínguez *et al.*, 2012) es una enfermedad de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales. Las condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad son: temperatura moderada (15° C a 25° C), lluvias frecuentes durante un intervalo de 48 horas o más, alternadas con períodos de baja humedad y viento, que favorecen la esporulación y dispersión de esporas.

Esta enfermedad, que afecta el cultivo de frijol, es de gran importancia en Cuba, por su amplia distribución geográfica y las pérdidas que causa. El inóculo proviene principalmente de los restos contaminados de la cosecha anterior y de semilla contaminada con el patógeno.

Cuando la enfermedad se manifiesta en el follaje del frijol, lo hace primero en forma de manchas típicamente angulares. Al aumentar éstas de tamaño se hacen coalescentes, presentándose más tarde un amarillamiento general de la planta y posteriormente una defoliación parcial o total. Sí las condiciones

ambientales le son favorables, el hongo (*Ps. griseola*), forma sobre dichas lesiones, en el envés de las hojas, los cuerpos fructíferos llamados coremios. en los cuales se originan las esporas que son diseminadas por el viento o la lluvia o permanecen en los residuos de las cosechas, para producir más tarde nuevas infecciones.

Esta enfermedad es favorecida por temperaturas moderadas entre 16 y 28°C, con un óptimo de 24°C. La Mancha angular es más severa cuando ocurren períodos alternos de alta y baja temperatura, alta y baja humedad relativa y mucha y poca luz solar. Bajo estas condiciones fluctuantes de clima, una epidemia de Mancha angular se puede desarrollar muy rápidamente, causando una severa defoliación o pérdidas de hojas prematura con altas pérdidas en el rendimiento y calidad del grano y de las vainas.

El patógeno afecta todas las partes aéreas de la planta de frijol, pero los síntomas típicos que caracterizan y le dan el nombre a la enfermedad son las lesiones o manchas angulares observadas en las hojas. Cuando el ataque es severo, las lesiones en los trifolios se unen produciendo un amarillamiento de las hojas.

En la vaina, los síntomas iniciales se observan como pequeñas manchas circulares de color rojo marrón, éstas aumentan hasta convertirse en manchas grandes que se unen entre sí, causando vainas mal formadas, generalmente con poca o ninguna semilla o semillas pequeñas, arrugadas, mal formadas y manchadas. El fitopatógeno, puede sobrevivir en la semilla, la cual es un medio eficiente para su diseminación.

Pata negra: es una enfermedad transmitida por el hongo *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*). 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.

2.2.4. Principales plagas bacterianas

Bacteriosis común (*Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* [Smith] Vauterin) es una plaga bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) (Smith) Dye). Esta enfermedad se conoce con otros nombres: Bacteriosis, tizón común y bacteriosis común. Bacteriosis Común tiene una amplia distribución geográfica, por su importancia económica se considera una de las principales enfermedades del frijol. La enfermedad causa daños en zonas calientes (28°C) con alta humedad relativa. La bacteria puede sobrevivir por períodos cortos en residuos de cosecha infectados.

Los síntomas se presentan en las hojas, tallos, vainas y semillas. Inician con manchas húmedas o exudación en el envés de las hojas; luego las manchas aumentan irregularmente de tamaño, uniéndose una con la otra.

2.2.5. Principales plagas virales

Virus del Mosaico Común del Frijol (VMCF) es el patógeno viral más importante de este cultivo, debido a que puede ser transmitido en un alto porcentaje por vía mecánica, por la semilla y por varias especies de áfidos en el campo. Las condiciones ambientales favorables para la aparición del virus son: temperaturas medias entre 18 a 25°C y altas de 28°C, las coinciden con humedades relativas altas, permiten una rápida diseminación de la plaga. Los síntomas causados por el VMCF dependen de la variedad, de la cepa del virus y de las condiciones ambientales. En las variedades susceptibles, los síntomas se manifiestan con áreas verdes claras y oscuras delimitadas por la nervadura de las hojas y las cuales se enrollan hacia el envés.

Virus del Mosaico Dorado del Frijol (VMDF). Es la enfermedad más importante en el cultivo de frijol en el trópico, es transmitida por el insecto conocido comúnmente como mosca blanca (*Bemisia tabaci*), la enfermedad no se trasmite por semilla. Esta enfermedad se registra en el país en condiciones ambientales de temperaturas medias de 18-25°C y altas de 28°C y altitudes no mayores de 1200 msnm. Las plantas infectadas presentan en las hojas un color amarillo intenso, debido al desarrollo desigual de las áreas sanas y enfermas, las hojas pueden deformarse. Si las plantas han sido infectadas antes de la floración, hay aborto prematuro de las flores y deformaciones de las vainas. Las semillas presentan manchas y deformaciones y el peso disminuye. Las pérdidas por esta enfermedad pueden alcanzar hasta el 100%.

Virus del Mosaico Severo del Frijol (VMSF). La enfermedad es transmitida por especies de coleópteras de los géneros *Diabrotica* y *Epilachna*. También el virus es transmitido en forma mecánica por herramientas contaminadas. Los síntomas inducidos son severos, deforman las hojas, causan enanismo de la planta y pueden producir necrosis en algunas variedades de frijol.

Señala Murguido, (2015) que el pronóstico de la población de saltahojas de los frijoles *Empoasca kraemeri*. Insecto que incide desde los primeros días de germinado el frijol puede ser calculado, mediante la simulación de la población por algoritmos de su ciclo biológico y cálculo por computadora para fijar la fecha probable del tratamiento químico, y no realizar el mismo solo sobre la base de la fecha de siembra y los días de germinado el frijol que son los parámetros que

muchas veces toman los productores para iniciar las medidas de lucha químicas, encareciendo la producción y contaminando en medio, porque muchas veces los niveles poblacionales no justifican la aplicación.

Así según Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV). (2013) el umbral de daños económicos (UDE) por saltahojas: debe relacionar clima-plaga para el frijol y la soya con fenología de hasta 50 días, el Umbral de daños (UD) por conteo directo es de 0.5-0,8 individuos/hoja; mediante pase de red es 0,5 individuos/red y con fenología de más de 50 días el Umbral de Daños por conteo directo es de 1-2 individuos/hoja, mediante pase de red es de 1-1,5 individuos/red.

Esta especie de insecto que ha sido reportada como una de las plagas insectiles más importantes, para las distintas regiones de producción de frijol en Cuba también lo es para Colombia y otros países centroamericanos. Las hembras de este insecto opositan introduciendo los huevos en el tejido de la hoja, las venas, pecíolos o tallos de la planta afectada. La ninfa recién salida es color blanco pálido; luego pasa a amarillo pálido y finalmente al verde de los adultos; atraviesa por cinco instares ninfales tardando alrededor de 13 días; las ninfas se alimentan en el envés de las hojas cerca de las venas.

2.3.0 *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 (Villegas, 2005).

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 μm 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 μm de diámetro.

2.3.1. 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 Danay *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 defensas 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:

2.3.1.1. 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 inhibidora de aislamientos de *Trichoderma* sobre otros hongos se debía solo a compuestos no volátiles. (Dennis y Webster 1971) 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 antagónicas. 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*.

2.3.1.2. Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica 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 α -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.*

2.3.1.3. 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.*

2.3.2. 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).

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).

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).

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 producidos 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.

2.3.3. 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. (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).

2.3.4. Uso de *Trichoderma spp.* en la lucha biológica en la superficie aérea (flores, frutos y follaje).

Aunque la lucha biológica de los fitopatógenos fungosos en la superficie aérea de las plantas puede ser posible aplicando principios semejantes a los que se aplican para la lucha biológica de las enfermedades de las raíces éste difiere del último en aspectos esenciales, en primer lugar ha sido menos estudiado entre otras causas debido a su efectividad moderada, que con frecuencia es menor del 50 %, a un espectro de acción estrecho y velocidad de acción lenta (Olivera Costa y Rodríguez, 2014); y por otra parte, a la disponibilidad de fungicidas relativamente efectivos contra la mayoría de los patógenos fungosos foliares (Kurioka, *et al.*, 2013).

La efectividad moderada puede deberse a que el ambiente en la filósfera es un hábitat más hostil para los microorganismos que el suelo. La escasa disponibilidad de nutrientes, las temperaturas extremas, el polvo y la intensidad de la radiación solar son condiciones que dificultan el establecimiento de los antagonistas (Ahmad, *et al.*, 2012), sólo aquellos muy agresivos pueden establecerse por sí mismos antes de la llegada de los patógenos y por tanto ser capaces de frenar el desarrollo de la enfermedad; entre los antagonistas con esas características se encuentran especies pertenecientes al género *Trichoderma* (Devi, *et al.*, 2012).

Las formulaciones diseñadas para aplicaciones en la filósfera generalmente contienen aditivos (nutrientes y adherentes) para facilitar la colonización por *Trichoderma*. Se ha de tener en cuenta que esos aditivos no estimulen al patógeno bajo las condiciones de escasez de nutrientes que existe en ese lugar. En trabajos realizados en Colombia por (Jaworska J., 2007) encontraron que en pruebas de antagonismo *in vitro*, *Trichoderma spp.* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum f. sp. phaseoli*, deteniendo su crecimiento a los tres días y a los siete días se presentó una invasión total del micelio del fitopatógeno. *Trichoderma spp.* se caracterizó por un crecimiento radial, capaz de inhibir 64% el crecimiento de *F. oxysporum*, en tanto que *P. fluorescens* ocasionó una inhibición parcial del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, sin formación del micelio aéreo característico y sin tomar la coloración típica de la colonia.

Hasta hace poco tiempo las investigaciones realizadas sobre lucha biológica de los fitopatógenos foliares estaban centradas en el control de patógenos bacterianos. El hecho de que en los últimos años se haya incrementado el número de casos de fungo-resistencia, por ejemplo, a los benzimidazoles y dicarboximidias (Seibel, *et al.*, 2012), la preocupación por los efectos negativos de los fungicidas sobre el agroecosistema y el elevado costo de obtención de nuevos productos plantea la necesidad de desarrollar estrategias de luchas alternativas y por tanto se ha incentivado el interés en el lucha biológica de los fitopatógenos foliares causadas por hongos.

Inicialmente las investigaciones se concentraron en el uso de *Trichoderma spp.* y *Gliocladium spp.*, para el control de *Botrytis cinerea*, en uva y fresa (Wilson y Backman, citados por Pérez, 2004). *B. cinerea* es uno de los patógenos más nocivos para una amplia variedad de cultivos, *T. harzianum* ha sido usado exitosamente en el control de éste en numerosos países (Olivera Costa y Rodríguez, 2014).

Según reportan (Cruz-Triana *et al.*, 2018) el porcentaje de incidencia de *F. oxysporum* en los tratamientos con *Trichoderma asperellum*, independientemente del momento de la evaluación, fue significativamente menor con respecto al tratamiento sin aplicación. Una tendencia similar se observó al evaluar *U. appendiculatus* a los 54 días; sin embargo, a los 69 días después de la germinación, solo se logró reducir la incidencia de este hongo con el tratamiento químico y cuando se realizaron las tres aplicaciones del biocontrol. Estos mismos autores plantean que con la aplicación del biopreparado al cultivo del frijol, y marcadamente cuando se realizaron las tres aplicaciones del mismo, se logró la disminución de la incidencia y severidad de ambos agentes fitopatógenos en comparación con el tratamiento sin aplicación, lo que evidenció el potencial del producto para el manejo de estas dos enfermedades fúngicas. Se debe destacar que, en la mayoría de los tratamientos con el producto biológico, los resultados fueron similares o mejores que los del tratamiento con productos químicos.

2.3.5. Ventajas de *Trichoderma spp.* en su empleo como antagonista.

Las ventajas de los productos comerciales o artesanales de *Trichoderma spp.* que hoy están demostradas, con la utilización de numerosas cepas de este agente de lucha biológica en diferentes patologías de las plantas son múltiples:

- Mejora la germinación de las semillas.
- Actúa como protector contra los hongos que atacan las raíces de estas plantas.
- Estimula la resistencia de la planta, incrementa su crecimiento y la consecuente producción.
- Respeto el ambiente con microorganismos benéficos.

Entre las ventajas, destaca su inocuidad a los seres humanos, ya que no deja efectos residuales en el follaje, los frutos y las semillas, una diferencia fundamental al aplicarse fungicidas u otros agroquímicos. Además, posee un rápido crecimiento y desarrollo, puede proliferar en una amplia gama de suelos, es tolerante a condiciones ambientales extremas, puede tolerar altas concentraciones de agroquímicos y es capaz de parasitar, controlar y destruir hongos, nematodos y otros fitopatógenos (patógenos de plantas).

Es por estas propiedades que se le considera uno de los principales agentes para la lucha biológica en diferentes sistemas de producción. Es un agente natural, no agresivo con plantas o suelos. Aumenta la capacidad de crecimiento de las plantas y les confiere mayor resistencia a condiciones de estrés (mayor desarrollo radical).

Carece de toxicidad sobre las partes comestibles de los cultivos, asimismo aminora el daño al medio ambiente por la ausencia de químicos persistentes en el suelo. Se aplica fácilmente mediante formulación líquida o sólida, pulverizándolo sobre el terreno o sobre la planta; no requiere de equipamiento especial para su aplicación.

Posee bajo costo de producción, comparado con productos alternativos (extractos vegetales). Compatible con inoculantes de leguminosas; es posible aplicarlo a semillas que han sufrido un tratamiento fungicida químico.

Disminuye y, en algunos casos, elimina la necesidad de tratar con fungicidas químicos, con lo cual se reducen los costos y el uso de fertilizantes, pues las plantas tienen más raíces y las utilizan mejor.

Por ser un habitante natural del suelo, su registro comercial suele ser más fácil que el de un producto químico. Es considerado un producto no tóxico ni alergénico, no presenta toxicidad en mamíferos y es inocuo para abejas y abejorros.

En la actualidad los plaguicidas de origen biológico tienen muchas ventajas con relación a los químicos ya que no causan deterioro al ambiente, no afectan el desarrollo de las plantas, su producción es más barata y su uso no conlleva al surgimiento de nuevas plagas o de plagas secundarias (Karas *et al.*, 2011).

El género *Trichoderma* constituye un buen ejemplo de hongo no ligninolítico con gran habilidad de colonización, dicho hongo también es capaz de degradar plaguicidas al igual que los géneros *Fusarium* y *Penicillium* (Stamatiu, 2013) También se plantea que el género *Trichoderma* ha constituido una buena alternativa para el ahorro de fertilizantes químicos y plaguicidas.

Este bioagente forma asociaciones con micorrizas, aumentando de manera significativa la rizosfera del suelo, permitiéndole a las plantas hacer una mayor extracción de nutrientes y con un alto grado de asimilación. Se ha demostrado también que este hongo antagonista es compatible con el biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcun*, una bacteria que fija nitrógeno en el suelo; por lo que se establecen relaciones de ayuda mutua, con el consiguiente beneficio para la nutrición de los cultivos (Andrade, 2012).

Otros investigadores han demostrado como numerosas especies de *Trichoderma spp.* facilitan la asimilación de fósforo en plantas. Esta es una problemática en la agricultura, bajo nivel de fósforo disponible en el suelo. El fosfato, principal forma asimilable del fósforo, es un macro nutrimento esencial para el desarrollo y crecimiento vegetal; un constituyente necesario para la división celular, la fotosíntesis, la producción de proteínas y ácidos nucleicos; también para la fijación de nitrógeno, la biosíntesis de azúcares y almidones y otros procesos del metabolismo.

Pero la movilidad y concentración de fósforo en los suelos es muy baja, por lo que se requiere la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes fosfatados, que además de ser muy costoso para la producción, propician efectos negativos para el ambiente. Se conoce que cerca del 90 % del fosfato aplicado se precipita en formas insolubles con calcio y metales, como hierro y aluminio, que no pueden ser asimilados, limitando la producción de los cultivos a nivel mundial.

Ante esta situación, se reporta que *Trichoderma spp.* es eficaz en la solubilización del fosfato a través de la producción de ácidos orgánicos que reducen el pH del suelo haciéndolo más biodisponible, la liberación de metabolitos quelantes y enzimas especializadas en la degradación de compuestos orgánicos de fósforo como las fosfatasas ácidas y alcalinas.

Algunas cepas de *Trichoderma spp.* tienen habilidad para competir en la rizósfera y son capaces de colonizar la raíz y el espacio adyacente a ésta a partir de la semilla tratada (Olivera Costa y Rodríguez, 2014), siendo este uno de los métodos más utilizados por las ventajas que ofrece.

2.3.6. Otros biocontroles

Pérez, (2017) desarrolló experimentos en condiciones de laboratorio, semicontroladas y de campo para evaluar la efectividad de medios biológicos y productos naturales en la protección de plantas de frijol común frente a la enfermedad causada por *S. rolfsii*. En las evaluaciones *in vitro* comprobó el efecto antagónico de las rizobacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* frente y *T. viride*, a este fitopatógeno; mientras las dos primeras inhibieron completamente el crecimiento *in vitro* del patógeno, las dos últimas sólo lo hicieron en un 80,72 % y 40,97 % respectivamente usando el método del cultivo dual.

Durante sus trabajos experimentales comprobó que, el efecto del tratamiento a la semilla con organismos antagonistas y sustancias naturales sobre las afectaciones por *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas, mostró los mejores resultados con los tratamientos de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*; estos resultados fueron similares estadísticamente a los logrados con el control químico (TMTD 80 % PH). Estos tres tratamientos resultaron significativamente superiores al control, a *B. cepaea* y a los productos naturales evaluados en la reducción de la proporción de plantas enfermas, los cuales no difirieron entre sí.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento.

En una plantación de frijol (*Phaseolus vulgaris* (L.) en condiciones de producción y seco de la Cooperativa de Créditos y Servicios Fortalecida “Victoria de Girón” del municipio Unión de Reyes. Poblado Juan G. Gómez, sobre un suelo pardo pedregoso, que tuvo como cultivo precedente maíz, utilizando un campo de 4,5 ha, que fue sembrado entre los días 16 y 17 de octubre de 2018, de la variedad Tomeguín 93, empleándose una sembradora confeccionada por el propio campesino, que posee un marco de siembra de una planta cada 5 centímetros (cm), con 30 cm de camellón.

3.2. Trabajo de campo y laboratorio

El primer muestreo, se realizó siete días después de germinado el cultivo, que mostraba las primeras hojas trifoliadas, se seleccionaron diferentes puntos para la toma de las muestras, en cada uno de ellos eran revisadas 20 plantas, aproximadamente un metro lineal del surco, las plantas fueron revisada completamente, en esta fase fenológica tan temprana del cultivo, ya fueron observados crisomélidos, minadores y salta hojas, no se observaron plantas afectadas por hongos.

Con una frecuencia decenal, a partir del 29 de octubre de 2018, se mantuvieron los muestreos hasta los 72 días, cuando el cultivo mostraba incidencia combinada de diferentes plagas insectiles y fungosas.

El segundo muestreo fue realizado el ocho de noviembre de 2018, el cultivo se encontraba en la fenofase V3, comenzaban a aparecer los segundos trifolios, en este momento aún el cultivo no presenta síntomas de enfermedades fungosas, durante estos primeros días no se produjeron precipitaciones y el cultivo se desarrollaba en condiciones de seco.

A los diez días posteriores se efectuó el tercer muestreo, 19 de noviembre de 2018, 32 días después de sembrado el frijol, se observaba un incremento en los niveles de las plagas insectiles, pero aún el cultivo se encontraba libre de fitopatógenos, en los diez puntos de muestreo, no se contabilizó ni una sola planta, con la presencia de hongos o bacterias. Durante las fenofases vegetativas V3 y V4 solo se observaron plagas insectiles, moscas blancas,

crisomélidos, saltahojas y larvas de lepidópteros, y se observaron los primeros síntomas fungosos producidos por *Fusarium* en la base de las plantas muestreadas.

3.2.1. Obtención de cepas

El sistema radical de cinco plantas de cada uno de los puntos muestreados en el campo, se lavó con agua corriente y se cortó en fragmentos de un centímetro de longitud, los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% (NaOCl 1%) por un minuto y se lavaron con dos pases de agua destilada estéril. Se colocaron cinco fragmentos de aproximadamente 5 mm en placas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se encubaron a temperatura ambiente (23-26) °C en la sección de fitopatología, del laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, las placas fueron se revisaron al microscopio compuesto a las 24, 48 y 72 horas para observar el crecimiento de hongos, surgiendo de los fragmentos puntas de hifas y grupos de hifas desarrolladas de las raíces, se colocaron en tubos de ensayos con PDA, el crecimiento y desarrollo de las colonias fue seguido al microscopio a partir de las 48 horas, para realizar transferencia hacia nuevos tubos hasta alcanzar un aislamiento totalmente puro. Nunca se observó algún tipo de variación, en las colonias que se desarrollaron de los grupos de hifas que crecieron de las raíces, que sugiriera el crecimiento de dos a más hongos distintos. Después se transfirieron a placas Petri para obtener las colonias e identificar microscópicamente a *F. solani*.

El 29 de noviembre, fue efectuado el cuarto muestreo, para esta fecha el cultivo se encontraba en pleno desarrollo vegetativo, comenzaban a observarse los primeros botones florales y se contabilizan las primeras plantas afectadas por *Rhizoctonia spp.* y *Sclerotium rolfsii*, de esta última son tomadas varias plantas afectadas las que son colocadas en bolsas de nylon y trasladadas al Laboratorio Provincial de Sanidad a su sección de Fitopatología.

Aquí las muestras fueron registradas y se procedió al aislamiento del hongo *S. rolfsii*, se tomaron muestras de las plantas afectadas, las que fueron lavadas cuidadosamente debajo de la llave, después 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.

Cuando se observó la germinación de las primeras esporas y micelio característico del hongo, se realizaron las siembras en tubo de ensayos, con papa dextrosa agar (PDA), cuando se produjo el crecimiento del hongo, fue reaislado nuevamente a tubo de ensayo hasta que se logró una colonia totalmente pura del hongo.

Posteriormente se realizó una siembra en placas Petri y se estudió el crecimiento del hongo durante cinco días: se observó el tipo de micelio, color, forma y tamaño de las esporas, estas fueron comparadas con el cepario existente en el Laboratorio provincial de Sanidad vegetal, para proceder a comparar su crecimiento con tres cepas diferentes de *Trichoderma spp.* y posteriormente su enfrentamiento *In Vitro*, para evaluar las posibilidades de uso de este antagonista en la lucha biológica de esta importante plaga fungosa del frijol.

El ocho de diciembre de 2018, fue efectuado el quinto muestreo, se procedió a la revisión de cada uno de los puntos señalados en el campo y se observó varias plantas afectadas por *Rhizoctonia spp.*, *S. rolfsii*, *F. solani* y *Ps. griseola*. Se tomaron muestras de estas dos últimas, las que igualmente habíamos decidido evaluar junto a *Sclerotium* en su enfrentamiento ante tres cepas diferentes de *Trichoderma spp.*

Algunas de las plantas muestreadas mostraban síntomas de *Sclerotium* y *Fusarium*, mientras, que *Sclerotium* estaba más distribuido por toda la planta, en los dos casos las muestras que mostraban las sintomatologías características de los hongos fueron situadas en bolsa de nylon identificadas con el punto de aparición, teniendo en cuenta que el campo presenta un relieve ligeramente ondulado, con pendiente hacia la zona sureste, para donde se produce la escorrentía y se acumulaba la mayor humedad del suelo, en la parte superior del campo, la que drena rápidamente después de las precipitaciones y en solo dos o tres días desaparece el exceso de humedad no así en la parte más baja, la que se mantiene durante varios días por la acumulación del agua.

Las muestras igualmente fueron trasladada al Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal a su Sección de Fitopatología, fueron registradas he identificadas según el punto de aparición y la finca del campesino. Las muestras fueron conservadas en refrigerador hasta el siguiente día, cuando se procedió, al lavado de las plantas, la selección de las muestras y el montaje de las cámaras húmedas. Estas eran observadas diariamente hasta que se observó la aparición del

desarrollo del micelio del hongo, para estas dos especies de hongo se procedió, al igual que las anteriores muestras, se llevaron tubos de ensayo, hasta obtener una cepa totalmente pura del hongo fitopatígeno.

Cuando, se tuvieron los cultivos puros de *S. rolfsii*, *F. solani* y *Ps. griseola*, se sembraron en placas Petri y se compararon con las cepas conservada en el laboratorio y se procedió al enfrentamiento de cada una de ellas ante tres cepas diferentes de *Trichoderma spp.*

3.2.2. Trabajo de laboratorio

Después de obtenidas las cepas puras de cada uno de los hongos se realizaron los siguientes ensayos y mediciones para comprobar los posibles efectos antagónicos de las tres cepas de *Trichoderma* seleccionadas para la segunda parte del experimento y plantear una estrategia de lucha, contra tres importantes organismos nocivos del frijol.

Para el enfrentamiento de estos microorganismos, se procedió según la metodología propuesta por Johnson *et al.*, (1960) la que ha sido empleada en múltiples trabajos posteriores, ya permite utilizando medios de cultivos que pueden ser poco costosos y una metodología sencilla, evaluar el efecto antagónico de diferentes cepas de antagonistas contra fitopatógenos.

Se usó para la siembra el medio de cultivo Papa dextrosa Agar (PDA) que como señalamos anteriormente es un medio de cultivo poco costoso y constituye uno de los sustratos más utilizados e idóneos para el cultivo de estos hongos fitopatógenos.

Los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 kg cm⁻² 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 las tres especies de hongos seleccionadas. 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*, *Ps. griseola*.

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 X 100.

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 5 mm de diámetro, de cada uno de los microorganismos a enfrentar. Se incubaron a 28 °C y se determinó diariamente el crecimiento radial en las cuatro repeticiones. Se describieron las características morfológicas de las colonias y se observaron en el microscopio óptico.

Las observaciones se realizaron diariamente, hasta los siete días cuando algunos de los fitopatógenos y los antagonistas alcanzaron el borde de la placa los 90 mm (9 cm) de diámetro de la misma.

Tabla 1. Indicadores y variables empleadas en la medición y comparación de cepas de *Trichoderma spp.*

Indicadores	Variables medibles	U/M
Antagonismo	Crecimiento de TS-3 sobre <i>F. solani</i> , <i>S. rolfsii</i> , <i>Ps. griseola</i>	mm
	Crecimiento de A-53 sobre <i>F. solani</i> , <i>S. rolfsii</i> , <i>Ps. griseola</i>	mm
	Crecimiento de A-34 sobre <i>F. solani</i> , <i>S. rolfsii</i> , <i>Ps. griseola</i>	mm

La determinación de la actividad antagonista se realizó a partir del cálculo del porciento de inhibición según Rapilly (1968), y que ha sido utilizado por varios investigadores. Las expresiones utilizadas se muestran en la Tabla 2, donde todas las determinaciones dependen del crecimiento diario y el número de días del experimento.

Debido a que el control químico de estos fitopatógenos del suelo es costoso y, en algunos casos, infructuoso, el control cultural es difícil de aplicar y se carece de variedades resistentes, el presente trabajo de diploma tiene como objetivo evaluar el efecto de tres cepas de *Trichoderma spp.* En condiciones de laboratorio *In vitro* como alternativa en la protección de plantas de frijol común frente a los hongos *F. solani*, *S. rolfsii*, *Ps. griseola*.

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 _n , L _{n-1} : 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 _w : Crecimiento del micelio aislado (mm) L : Crecimiento del micelio enfrentado (mm)

Se realizó el cálculo económico, de las aplicaciones de los plaguicidas empleados por el campesino durante la primera siembra de octubre a diciembre de 2018.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comportamiento del crecimiento hifal de *S. rolfsii*, *F. solani* y *Ps. griseola* y las cepas de *Trichoderma spp.* A-34, A-53 y TS-3 en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

Como se observa en la tabla 3, a las 48 horas se mostraba un crecimiento diferenciado de los tres aislamientos de las especies de hongos fitopatógenos y las tres cepas de los antagonistas en estudio. *F. solani* asumía el liderato entre los patógenos del frijol con un crecimiento de 10,5 mm y la Cepa A-53 de *T. viride* dentro de los antagonistas con 12 mm, en su crecimiento en papa-dextrosa-agar (PDA), destacándose *T. harzianum* cepa A-53 por crecer con mayor rapidez, logrando colonizar la mayor parte del sustrato en el menor tiempo.

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 los microorganismos.

U/M = Crecimiento de las colonias en mm.

Organismos Tiempo	<i>S. rolfsii</i>	<i>F. solani</i>	<i>Ps. griseola</i>	TS-3	A-53	A-34
1 día	1	1	1	1	1	1
2 días	5	10,5	6	1	12	10
3 días	21	20,5	10	32	42	36,5
4 días	51	29,5	43	51,5	79	51
5 días	90	38,5	90	83	90	64,5
6 días	90	47	90	90	90	90

Elaboración propia.

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).

A las 72 horas las tres cepas de *Trichoderma* mostraban el mayor crecimiento micelial; la cepa A-53 de *T. harzianum* alcanzaba 42,0 mm, seguida de la cepa A-34 con 36,6 mm y la cepa TS-3 con 32,0 mm de *T. viride*; el aislamiento del fitopatógeno *S. rolfsii* con 21,0 mm superaba al de *F. solani* con 20,5 mm. Este resultado coincide con (Martínez, 2015). El que señala que *Trichoderma* puede crecer y ramificar sus hifas rápidamente las que pueden medir entre 3 a 12 μ m de diámetro, según las condiciones del sitio donde se esté reproduciéndose. La esporulación asexual ocurre en conidios unicelulares de color verde, generalmente tienen 3 a 6 μ m de diámetro.

Igualmente, queda demostrado lo planteado por Pérez, 2004 donde encontró que *Trichoderma* posee una 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.

A los cuatro días (96 horas), la cepa A-53 de *T. harzianum* alcanzaba los 79 mm de crecimiento radial superando ampliamente a las cepas A-34 y TS-3, con 51,0 mm y 51,5 mm respectivamente. Los tres aislamientos de los fitopatógenos mostraron un crecimiento mucho más lento, *S. rolfsii*, alcanzaba los 51,0 mm a los cuatro días, *F. solani* y *Ps. griseola* solo median de crecimiento radial 29,5 y 43,0 mm respectivamente.

Cinco días (120 horas) después de realizada la siembra, tres de los seis aislamientos alcanzaban el borde de las placas Petri utilizadas. *S. rolfsii* y *Ps. griseola* dos de los aislamientos fitopatógenos conseguían los 90,00 mm de crecimiento radial y la cepa A-53 de *T. harzianum*. El aislamiento de *F. solani* a

los cinco días solo alcanzaba, los 38,5 mm, los aislamientos anteriores obtenían más del doble en su crecimiento.

A los seis días (144 horas), último intervalo en que fueron evaluados los seis aislamientos, las tres cepas de los antagonistas alcanzaron su máximo crecimiento posible, en las placas Petri utilizadas, los 90 mm de su crecimiento micelial radial, igual comportamiento se observaba en los aislamientos de *S. rolfsii* y *Ps. griseola* que ya habían alcanzado este crecimiento desde el día anterior a los cinco días, el aislamiento de *F. solani* solo alcanzó los 47 mm.

Así este resultado coincide con lo planteado por (Hernández-Jiménez *et al.*, 2013) y (Martínez *et al.*, 2014), los que señalaron que la variabilidad morfológica, de *Fusarium* puede estar influenciada por los medios de cultivos y la temperatura, en sus investigaciones estos autores utilizaron cultivos monobasidiospóricos en papa-dextrosa-agar (PDA), además, también pueden influir en la producción de esclerocios los cuales son estructuras de supervivencia y constituyen la principal fuente de inóculo primario en las condiciones naturales del cultivo de frijol.

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 μm de diámetro. La esporulación asexual ocurrió en conidios unicelulares de color verde las que tenían 3 a 6 μm de diámetro.

El resultado de los cálculos del crecimiento del micelio y el crecimiento medio diario o velocidad media del crecimiento, calculado a los cinco días cuando los aislamientos de *S. rolfsii* y *Ps. griseola* y la cepa A-53 de *T. harzianum* alcanzaron el borde de la placa, máximos crecimientos posibles se muestran en la **Tabla 4**. Para estos tres aislamientos el crecimiento del micelio fue de 44,5 mm, la cepa TS-3 de *T. viride* le siguió con 41,0 mm y la cepa A-34 de *T. harzianum* con 31,75 mm, donde se reafirma el menor crecimiento lineal del micelio para *F. solani*, con solo 18,75 mm.

El crecimiento medio diario o velocidad media de crecimiento, fue igualmente mayor para los aislamientos de *S. rolfsii* y *Ps. griseola* y la cepa A-53 de *T. harzianum* con 17,8 mm, con solo 7,5 mm para *F. solani*.

Resultados similares encontraron Samuels, *et al.*, (2005) los que trabajando con 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.

Tabla 4.- Comportamiento de los parámetros calculados para 5 días de crecimiento *in vitro* contra hongos fitopatógenos.

U/M = Crecimiento de las colonias en mm

Parámetro	TS3	A-53	A-34	<i>S. rolfsii</i>	<i>F. solani</i>	<i>Ps. griseola</i>
L (mm)	41	44,5	31,75	44,5	18,75	44,5
V (mm/día)	16,4	17,8	12,7	17,8	7,5	17,8

Elaboración propia

En el ensayo de enfrentamiento de la cepa TS-3 de *T. viride* se observó un menor crecimiento del antagonista, aunque frente a *F. solani*. Se observó el hiperparasitismo de esta cepa a los seis días de los enfrentamientos duales. (Ver tabla 5).

4.2 Eficiencia biológica de cepas de *Trichoderma spp.* como antagonista frente a fitopatógenos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados alcanzados de las pruebas de antagonismo *in Vitro* de la cepa TS-3 de *T. viride*, contra los tres aislamientos de los fitopatógenos, a las 48 horas, el mayor crecimiento lineal del micelio era de *S. rolfsii*, con 19,3 mm frente a solo 4,6 mm de la cepa TS-3, este si superaba a *Ps. griseola* y *F. solani*.

A las 72 horas el aislamiento de *S. rolfsii* continuaba con el mayor crecimiento lineal del micelio con 22,0 mm, aunque en este intervalo se produjo un rápido crecimiento de la cepa TS-3 frente este fitopatógeno, pero no lo superó. Siguió mostrando similar crecimiento lineal del micelio frente a *Ps. griseola* y *F. solani*. A los cuatro días se observó un crecimiento diferente del antagonista frente a *F. solani* con una velocidad media de crecimiento muy rápida para este intervalo entre las 72 y 96 horas del enfrentamiento, donde alcanzó los 27,5 mm.

Cinco días después del enfrentamiento esta cepa TS-3 de *T. viride* continuaba mostrando su mayor crecimiento lineal del micelio frente al aislamiento de *F. solani* con 42,5 mm aproximándose al borde del micelio de este fitopatógeno, donde al siguiente día se produjo el hiperparasitismo, solo en el borde de la colonia del fitopatógeno.

Tabla 5. Prueba de antagonismo *in Vitro* de la cepa TS-3 de *Trichoderma viride* contra hongos fitopatógenos. U/M = Crecimiento de las colonias en mm.

Cepa	<i>TS-3</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>TS-3</i>	<i>F. solani</i>	<i>TS-3</i>	<i>Ps. griseola</i>
2 días	4,6	19,3	8,5	6	5	2
3 días	15,6	22	14	12	9,5	5
4 días	21	39,5	27,5	21	14	19,5
5 días	36	41	42,5	27	23	33,5
6 días	36	43	52,5*	29	26,5	42,5

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

Elaboración propia

Como se observa en la Tabla 5 la cepa TS-3 en los primeros tres días superó en crecimiento lineal del micelio, al aislamiento de *Ps. griseola* 9,5 mm contra 5,0 mm, sin embargo, a las 96 horas (4 días), se observó un comportamiento totalmente diferente del fitopatógeno, alcanzó los 19,5 mm y superaba a la cepa TS-3 que consiguió 14,0 mm, a partir de este momento siempre este aislamiento superó en crecimiento lineal del micelio a esta cepa, sin que se produjera parasitismo alguno, a los seis días (144 horas), el aislamiento de *Ps. griseola* alcanzaba los 42,5 mm por solo 26,5 mm de la cepa TS-3.

Similar comportamiento presentó esta cepa frente a *S. rolfsii*, aunque esta siempre la superó en su crecimiento lineal del micelio donde alcanzaron a los seis días los 43,0 y 36,0 mm respectivamente. Este resultado difiere del obtenido por (Jaworska J., 2007) en Colombia donde encontraron que en pruebas de antagonismo *in vitro*, *Trichoderma spp.* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum f. sp. phaseoli*, deteniendo su crecimiento a los tres días y a los siete días se presentó una invasión total del micelio del fitopatógeno. *Trichoderma spp.* se caracterizó por un crecimiento radial, capaz de inhibir 64% el crecimiento de *F. oxysporum*. Este trabajo no especifica la especie, ni la cepa de *Trichoderma* utilizada.

Cinco días después del enfrentamiento esta cepa TS-3 de *T. viride* continuaba mostrando su mayor crecimiento lineal del micelio frente al aislamiento de *F. solani* con 42,5 mm aproximándose al borde del micelio de este fitopatógeno, donde al siguiente día se produjo el hiperparasitismo, solo en el borde de la colonia del fitopatógeno.

También difiere de los resultados alcanzados (González, 2004), el que utilizó aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseoli* Tassi. Encontró que 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) mostró, 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 %.

Los resultados del enfrentamiento de la cepa A-53 de *T. harzianum* se muestran en la **Tabla 6**, donde el antagonista evidenció un buen crecimiento lineal del micelio, inhibiendo el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos, incluyendo los que presentaron similares velocidades medias de crecimiento, como ya los discutimos en la **Tabla 4**. Este comportamiento revela una acción controladora en el enfrentamiento de los hongos fitopatógenos.

Tabla 6. Prueba de antagonismo *in Vitro* de la cepa A-53 de *T. harzianum* contra los aislamientos de los hongos fitopatógenos.

U/M = Crecimiento de las colonias en mm

Cepa/ Tiempo	A-53	<i>S. rolfsii</i>	A-53	<i>F. solani</i>	A-53	<i>Ps. griseola</i>
Dos días	5,0	2,0	8,0	5,6	5,6	8,6
Tres días	14,3	9,3	24,0	10,6	22,6	26,0
Cuatro días	41,3	22,3	44,3	14,6	41,0	37,0
Cinco días	52,6	31,0	57,0	22,3	42,0	38,3
Seis días	64,0**	31,0	63,0**	23,0	52,6**	38,3

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

Elaboración propia

Como se observa en la Tabla 6 a los tres días (72 horas) la cepa A-53 mostraba mayor crecimiento lineal micelial que los aislamientos de *S. rolfsii* y *F. solani* con 14,3 y 24,0 mm sobre 9,3 y 10,6 respectivamente para los dos aislamientos fitopatógenos, no así para *Ps. griseola*, cuyo aislamiento a los tres días superaba en crecimiento lineal del micelio a la cepa A-53, 26,0 mm por 22,6 mm.

A los cuatro días todos los enfrentamientos de la cepa A-53 superaban a los tres aislamientos de los fitopatógenos, con similares dígitos de 41,3 mm frente a *S. rolfsii*, 44,3 mm frente a *F. solani* y en este tiempo también superaba el aislamiento de *Ps. griseola* 41,0 mm por 37,0 mm.

Cinco días después del montaje de los enfrentamientos, ya se observaba el parasitismo de la cepa A-53 de *T. harzianum* sobre *F. solani* y *S. rolfsii*, con un crecimiento lineal micelial de 57,0 mm, en esta fecha este último aislamiento era inhibido su crecimiento del micelial y mostraba los síntomas del parasitismo de *T. harzianum* cepa A-53 sobre *S. rolfsii*.

En la Tabla 6 se muestra como a los seis días (144 horas) en la cepa A-53 de *T. harzianum*, se observaba un hiperparasitismo sobre los tres aislamientos de los hongos fitopatógenos, observándose una zona de inhibición del crecimiento de los tres fitopatógenos, aquí también se encontró como esta cepa ejercía uno de los principales mecanismos de acción de *Trichoderma*, su competencia por el sustrato y el espacio.

Los resultados obtenidos corroboran lo planteado por (Carsolio Carolina., *et al*, 2009), donde señala 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.

Los resultados experimentales también confirman los obtenidos por Sueli Corrêa *et al.*, (2007), los que investigando la actividad antagónica de cepas de *Trichoderma* por el método de cultivo dual, obtuvieron que todas las cepas inhibieron el crecimiento del hongo patógeno cuando las situaron en cultivo dual, en la proporción de 18,97 hasta 44,12%, comparado con el crecimiento del testigo. Las cepas CEN220, CEN249, CEN260, CEN262 y CEN266 fueron las que presentaron actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una

colonización total sobre *S. rolfsii* a las 120 h, por lo que recibieron calificación de 1 en la escala de clasificación de Bell *et al.* (1982), es esta otra metodología para encarar y medir el efecto de inhibición por *Trichoderma*.

Este resultado también confirma lo planteado por (Carreras 2011), cuando planteó que algunas 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.

Similares resultados obtuvieron (Sandoval *et al.*, 2002) los que plantean que 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.

En estudios realizados en Cuba (Villegas, 2005). Esbozan que 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.

Otros autores como (Infante Danay *et al.*, 2009). Plantean que las especies de *Trichoderma* poseen 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 nutrimentos con los hongos patógenos. En las investigaciones realizadas se ratifica como la Cepa A-53 de *T. harzianum* mostró un efecto de hiperparasitismo sobre *S. rolfsii*, *F. solani* y *Ps. griseola* demostrándose en nuestros resultados su antagonismo para los tres fitopatógenos del frijol en investigaciones *in Vitro*.

Las especies y cepas de *Trichoderma*, también se distinguen y así ha sido demostrado por varios investigadores, que presentan no solo 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 fitopatógenos 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.

Los resultados obtenidos reafirman lo planteado por (Martínez, 2015) cuando señaló que 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 económicas.

En estudios realizados por (Lorenzo N, 2001) planteó que la acción biocontroladora de *Trichoderma* es descrita por diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. 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, los resultados que se obtuvieron así lo demuestran.

En el ensayo de enfrentamiento de la cepa A-34 de *T. harzianum* se observó un pobre crecimiento del antagonista para todos los casos, mientras los patógenos presentaron un buen crecimiento lineal del micelio, como se muestra en la Tabla 7. Este comportamiento resulta similar al observado en la cepa TS-3 de *T. viride*, donde la interacción del antagonista y el patógeno no mostraron un saldo positivo.

Este resultado también viene a fortalecer lo planteado por (León *et al.*, 2014), cuando estudiaron seis cepas de más de 200 aislamientos obtenidos de dos ecosistemas diferentes de la provincia de Matanzas y mostraron acciones antagónicas totalmente diferente. 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.

Como se puede observar en la tabla 7 a los dos días (48 horas) el crecimiento hifal no era significativo en ninguno de los aislamientos, ni la cepa del antagonista, ni tampoco los aislamientos de los tres fitopatógenos. El mayor crecimiento lineal micelial era para la cepa A-34 en su enfrentamiento con el aislamiento de *Ps. griseola* que alcanzaban ambos los 4,6 mm, pobre era el crecimiento de los aislamientos de *F. solani* y *S. rolfsii* con solo 1,6 mm.

Aspecto este, que reafirma una vez más la búsqueda constante de nuevos aislamientos de este antagonista.

Tabla 7. Prueba de antagonismo *in Vitro* de la cepa A-34 de *T. harzianum* contra hongos fitopatógenos. U/M = Crecimiento de las colonias en mm.

Cepa Tiempo	A-34	<i>S. rolfsii</i>	A-34	<i>F. solani</i>	A-34	<i>Ps. griseola</i>
2 días	4,3	1,6	2,6	1,6	4,6	4,6
3 días	12,6	10,3	9,0	10,3	16,3	17,6
4 días	19,3	22,3	14,6	22,3	17,8	18,8
5 días	23,6	27,3	17,6	27,3	18,2	19,3
6 días	37,0	53,0	18,2	53,0	26,0	47,0

Elaboración propia.

A los tres días (72 horas) igualmente el enfrentamiento de la cepa A-34 y el aislamiento de *Ps. griseola* mostraron el mayor crecimiento lineal micelial, con 16,3 mm y 17,6 mm respectivamente, pero bien distante de lo que en este mismo intervalo de tiempo alcanzaban la cepa A-53 en su enfrentamiento con *Ps. griseola* con valores de 22,6 y 26,0 mm respectivamente tabla 6. También era muy superior el crecimiento de esta cepa en su enfrentamiento con *F. solani* con 24,0 mm de crecimiento lineal micelial.

En las mediciones realizadas a los cuatro días (96 horas) el crecimiento lineal micelial era muy similar en los tres enfrentamientos {(cepa A-34 vs *S. rolfsii*), (cepa A-34 vs *F. solani*) y (cepa A-34 vs *Ps. griseola*)} y sobresalía el aislamiento de *F. solani* con 22,3 mm, igual crecimiento mostraba el aislamiento de *F. solani*. Cuando se comparó este crecimiento con las mediciones realizadas a cada uno de los aislamientos y las tres cepas de *Trichoderma*, encontramos un crecimiento mucho mayor, al ser evaluados independientemente cada uno de ellos sobre el medio de cultivo (PDA), la cepa A-53 alcanzaba los 79,0 mm y este aislamiento que se utilizó para el enfrentamiento dual media 51,0 mm.

Cinco días (120 horas) después de montados los enfrentamientos se observó el mayor crecimiento micelial lineal para los aislamientos de *S. rolfsii* y *F. solani* con idénticas mediciones de 27,3 mm, la cepa A-34 manifestaba un pobre crecimiento frente a los tres fitopatógenos, con 19,3, 17,6 y 14,8 mm, similar comportamiento al obtenido por la cepa TS-3 de *T. viride*.

Todo hace indicar que la interacción que se produce entre los tres fitopatógenos y esta cepa A-34 limita su crecimiento micelial lineal, pues cuando se comprobó el crecimiento de cada uno de los aislamientos y las tres cepas de *Trichoderma* que serían utilizadas como antagonista en los cultivos dual en (PDA) a los cinco días la cepa A-34 alcanzaba un crecimiento micelial lineal de 64,8 mm ver tabla 3. Esto puede estar motivado por la secreción de enzimas de estos hongos al igual que lo hacen las especies de *Trichoderma* que están limitando su crecimiento micelial.

En el último día de las observaciones seis días después del montaje de los enfrentamientos duales (144 horas), se mantenía el mismo comportamiento, mayor crecimiento micelial lineal de los aislamientos de los fitopatógenos, *S. rolfsii* llegaba hasta los 53,0 mm por solo 37,0 mm la cepa A-34, igual resultado mostraba *F. solani* por solo 18,3 mm de la cepa A-34, un poco menor era el crecimiento de *Ps. griseola* 47,0 mm, pero también superior a la cepa A-34 con 26,0 mm. Según los resultados obtenidos, la cepa A-34 de *T. harzianum* no mostró buena acción como biocontroladora o antagonista de los aislamientos de *S. rolfsii*, *F. solani* y *Ps. griseola* de este campo de frijol.

La determinación del por ciento de inhibición utilizando la fórmula propuesta por Rapilly (1968) y también propuesta por (Rivero Deyanira *et al.* 2008), se calculó que el mayor efecto inhibitorio es producido por la cepa A-53 de *T. harzianum*. Esta cepa alcanzó un 67,1 % de inhibición frente *S. rolfsii*, con 59,2 % y 44,0 % ante los aislamientos de *Ps. griseola* y *F. solani* respectivamente como se muestra en la Tabla 8. Estos valores son similares a los mayores valores alcanzados por Benzohra (2011) con *T. harzianum* frente a aislados de *Ascochyta rabiei*, donde se alcanzaron valores desde 20 % hasta un 65 %.

Tabla 8. Inhibición del Crecimiento *in Vitro* de las cepas de *Trichoderma* ensayadas contra los aislamientos de los hongos fitopatógenos. (U/M = %)

<i>Antagonista</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>F. solani</i>	<i>Ps. griseola</i>
<i>T. viride. cepa TS-3</i>	53.9 %	28.0 %	28.1 %
<i>T. harzianum. cepa A-53</i>	67.1 %	44.0 %	59.2 %
<i>T. harzianum. cepa A-34</i>	44.9 %	32.5 %	49.4 %

Elaboración propia

Entre las primeras investigaciones en Cuba para estudiar el efecto antagónico de cepas de *Trichoderma* están las desarrolladas por (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 *Rh. solani* en medios de cultivo envenenado con filtrados líquidos donde se habían cultivado las cepas antagónicas. Plantean, además, que al parecer estos causan a nivel celular: vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis.

Muchos autores plantean que son numerosos los aspectos por investigar sobre el antagonismo de las especies de *Trichoderma* por ejemplo el micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma spp.* ha sido ampliamente estudiado, no obstante (Pérez, 2004). Planteó, que 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 necrotrofica del antagonista. Este resultado así lo demuestra, esta cepa A-34 de *T. harzianum* utilizada no presentó ninguno de los mecanismos de acción planteados sobre estos tres aislamientos de frijol.

Igualmente, no son coincidente los resultados con lo planteado por (Sandoval., *et al.*2002), los que señalaron que 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.

Si bien las cepas TS-3 y A-34 no mostraron una alta eficiencia como antagonistas de los aislamientos *F. solani* y *Ps. griseola* con 28,0 % 28,1 % de inhibición, esta misma cepa alcanzó un 53,9 % sobre *S. rolfsii* y la cepa A-34 un 49,4 % sobre *Ps. griseola* resultados que pueden ser alentadores. Resultaron muy positivos los resultados obtenidos con la cepa A-53 con 67,1 % de inhibición del aislamiento de *S. rolfsii* y 59,2 % para *Ps. griseola* algo inferior fue el resultado para *F. solani* con un 44,0 %, sobre este fitopatógeno de suelo, se obtuvieron los menores por ciento de inhibición.

Varios investigadores plantean la presencia de un grupo importante 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, si queremos obtener producciones más limpias y alcanzar una producción sostenible. Entre estos microorganismos se encuentran algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* los que reporta (Fernández, 2001). Otros autores como (Corrêa *et al.*, 2007) y (Reyes, *et al.*, 2007). Plantearon que estos antagonistas le confieren protección a semillas, plántulas y hortalizas, en contra del ataque de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotium*, *Phytophthora* y *Pythium*.

Diferentes resultados confirman la eficacia y resaltan la necesidad de continuar estas investigaciones e introducirlas a las condiciones de producción para disminuir la alta incidencia de enfermedades en el frijol y las pérdidas que por este concepto se producen. Los resultados alcanzados por (González, 2004), también lo demuestran, este investigador utilizó aislamientos de *S. rolfsii*, *Rh. solani* y *M. phaseoli*, y obtuvo aislados de semillas y plantas enfermas del cultivo del frijol, y evaluó 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%.

El frijol es atacado por diferentes hongos presentes en el suelo, que atacan la semilla desde que se produce la siembra, pero también pueden atacar la base del tallo en los inicios de su desarrollo, además muchos de estos hongos están presentes en la semilla y al llegar al suelo encuentran las condiciones ideales, para que se produzca la germinación de sus esporas, estas realidades están demostradas por investigaciones realizadas en el Centro Nacional de Sanidad Vegetal y Animal (CENSA), donde (Martínez *et al.*, 2014), investigaron 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 spp.* (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 también se demuestra la alta incidencia de organismos fitopatógenos sobre el frijol y el significado de sus pérdidas: En Colombia donde el frijol al igual que en Cuba es uno de los principales granos cultivados. Negrone (2008). Plantea que 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 marca la diferencia de la marchitez por *Fusarium*. Y recomienda el tratamiento de la semilla con *Trichoderma* el que constituye una alternativa para disminuir su incidencia.

Los resultados obtenidos por (Hernández *et al.*, 2012), también incitan a la necesidad de la búsqueda de alternativas para el manejo de los organismos fitopatógenos de frijol, estos autores reportaron alta incidencia de *Fusarium* en frijol, atacando el cuello de la raíz, produciendo una lesión necrótica, y sobre los tejidos afectados un crecimiento micelial blanco los que se tornan a color marrón oscuro posteriormente.

V. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los 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*, *Ps. griseola*. Todos mostraron buen crecimiento en papa-dextrosa-agar (PDA), excepto *F. solani* con 47,0 mm de crecimiento micelial lineal a los seis días después de la siembra.
- La cepa A-53 de *T. harzianum* mostró el mejor comportamiento de crecimiento micelial lineal, frente a los tres aislamientos de los fitopatógenos logrando el hiperparasitismo en la totalidad de la colonia a los seis días de enfrentamiento.
- La cepa A-53 mostró el mayor porcentaje de Inhibición del Crecimiento *in Vitro* contra los aislamientos de los hongos fitopatógenos, con 67,1 % para *S. rolfsii*, 44,0 % para *F. solani* y 59,6 % para *Ps. griseola*.
- Son necesarios estudios de campo con las cepas más promisorias encontradas en este trabajo, con el fin de conocer su comportamiento frente a las condiciones ambientales en el sistema agroecológico.

VI. Recomendaciones

- 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. Bibliografía

1. Ahmad Israr, Bhagat Someshwar, Kumar Krishna, Birah Ajanta, Tripathi AK, Madhuri K. (2012). PCRR. FLP marker based DNA amplified fragments and diversity assessment of *Trichoderma spp.* from Andaman and Nicobar Islands. J. of Mycopathological Research. 50(1):55-59.
2. Andrade, C. (2012). Evaluación del efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* para el control de marchitez en Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). En el Cantón Pillarlo, provincia de Tungurahua. Tesis en opción al título de ingeniera agrónoma. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
3. Bell, D. K.; H. D. Wells; C. R. (1982). Markham: «*In Vitro* Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», *Phytopathology*, 72:379-382.
4. Benhamou, N.; I. Chet: (1996). «Parasitism of *Sclerotia* of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction», *Phytopathology*, 86:405-416.
5. Benzohra I.E, Bendahmane B.S., Labdi M and Youcef M. (2011). *In vitro* Biocontrol Using the Antagonist *Trichoderma harzianum* Against the Algerian Isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. the Agent of *Ascochyta* Blight in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Microbiological Research 2 (2): 124-128.
6. Blanco, Y. y Leyva, A. (2010). Abundancia y diversidad de especies de arvenses en el cultivo del maíz (*Zea mays*, L.) precedido de un barbecho transitorio después de la papa. Cultivos tropicales. 30(1):11-17.
7. Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. (2008). Role of Swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. Plant Physiol.; 147:779-789.
8. Buruchara, R., Mukankusi, C. & Ampofo, K. (2014). «Bean disease and pest identification and management »: International Center for Tropical Agriculture (CIAT); Pan Africa Bean Research Alliance (PABRA), Vol (171), No 4, pp 67, November 2014.

9. Campbell R. (1989). Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge.; 218p.
10. Cardona, C., Jarma, A.J. y Araméndiz, H. (2013). Mecanismo de adaptación a sequía en frijol Caupí (*Vigna unguilata* L.Walp). Ciencia Hortícola. 7 (2): 277-286.
11. Carreras, Bertha. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 12(2), 129-133.
12. Carsolio Carolina, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutierrez Ana, Chet Cervantes A. (2009) Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos.
13. Cervantes A. (2007). Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. (Consultado: 16 feb 2007). Disponible en: http://infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm.
14. Chávez, P. (2006). Producción de *Trichoderma spp*, y evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). (en línea). Trabajo de grado. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias. 178 p. Consultado 20 junio 2014. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>.
15. Chet I, Benhamou SH. (1998). Mycoparasitism and lectinenzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds.). Volumen 2. p. 153-152. Taylor & Francis Ltd., London, UK.
16. Chet I, Inbar J. (1999); Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology. 48:37-43.
17. Corrêa, S., Mello M., Ávila-Zila R., Minaré-Braúna L., Pàdua, R. R., Gómez D. (2007). Cepas de *Trichoderma spp*. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. FITOSANIDAD vol. 11, no. 1. De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín N. L. 515 p.

18. Cruz-Triana. A., Deyanira Rivero-González, Danay Infante-Martínez, Anayza Echevarría-Hernández y Martínez-Coca. B., (2018). Manejo de hongos fitopatógenos en *Phaseolus vulgaris* L. con la aplicación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Revista de Protección Vegetal, Vol. 33, No. 3.
19. Dennis L, Webster J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphalinteraction. Trans Br Mycol Soc.; 57:363-369.
20. Devi P, Prabhakaran N, Kamil D, Pandey P, Lekha BJ. (2012). Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma spp.* and assessment of their biocontrol efficiency against plant pathogens. African J of Biotechnology.; 11 (85):5150-15160.
21. Djonoviae S, Pozo M, Kenerley C. (2006). Tvbn3, a b-1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium multivium*. Appl Environ Microbiol. 72(12):7661-7670.
22. Domínguez, N. (2012). Director Estación Territorial de Protección de Plantas, Vázquez, Las Tunas. Ministerio de la Agricultura. Cuba. Comunicación personal. Fernández Miriam y J. Jasic. 1973. Sobre la influencia de la temperatura en el consumo de alimento en larvas de *Spodoptera frugiperda*. Ciencias Biológicas.
23. 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. Revista Argentina de Microbiología.; 31(1):13-18.
24. El-Katatny, M. H.; M. Gudelj; K. H. Robra; M. A. Elnaghy; G. M. Gübitz, (2001) «Characterization of a Chitinase and an Endo- β -1, 3-Glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T-24 Involved in Control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*», Appl. Microbiol. Biotechnol., 56:137-143.
25. Ezziyani, 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. Anuales de biología, (26), 35-45.

26. Fernández, L., V., O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62: 96-100.
27. Gallegos-Morales, Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F. D., (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; 105-114.
28. González I, Infante Danay, Martínez B, Arias Y, González N, (2004). Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma spp.* strains intended for biological control. Biotecnología Aplicada.; 29:12-16.
29. Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M. (2014). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology. 2:43-56.
30. Harman, G. E.: (2000). «Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Research on *Trichoderma harzianum* t-22», Plant Disease, 84:377- 393.
31. Harman, G. (2001) *Trichoderma spp.*, including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. *Deuteromycetes*, *Moniliales* (asexual classification system).
32. Hernández A, Jiménez M, Arcia A, Ulacio D, Méndez N. (2012). Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma spp.* mediante RAPD y rADN-ITS. Bioagro; 25(3):167-174.
33. Hjeljord L, 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). Volumen 2. P.131-151. Taylor & Francis.
34. Howell, C. R., (2003): «Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: the History and Evolution of Current Concepts», Plant Disease, 87:4-10.
35. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. (2009); Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev Protección Veg. 24(1):14-21.

36. Jaworska J, D³użniewska J. (2007). The Effect of Manganese ions on development and antagonism of *Trichoderma* Isolates. Polish J of Environ Stud.16 (4):549-553.
37. J, Herrera-Estrella A. (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. App Environ Microbiol. 65:929-935.
38. Karas, P. A., Perruchón C., Exarhou, K., Ehalotis, C., y Karpousas, D. G. (2011). Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. Biodegradation. 22: 215-228.
39. Kurioka, M.; Martirena, V.; Mulvany, J. (2013). Evaluación de metabolitos inducidos en plantines de *Eucalyptus grandis* y *E. globulus* creciendo en vivero sobre sustrato inoculado con *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 146 p.
40. Macías FO, Delgado CY, Peña ME, León BR, Elías BR. (2014). Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. 30p.
41. León; Negrone, C., 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*, Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 60p.
42. Lima, L. H. C.; C. J. Ulhoa; A. P. Fernandes; C. R. Felix: (1997). «Purification of a Chitinase from *Trichoderma spp.* and Its Action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* Cell Walls», J. Gen. Appl. Microbiol., 43:31- 37.
43. López-Bucio, (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. Scientia Horticulturae 196:109-123.
44. Lorenzo N. (2001). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana.

45. Marín, S. (2012). *Trichoderma spp.* Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo del café. En: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Boletín técnico Cenicafe N 38.
46. Martínez A, Roldán A, Lloret E, Pascual J. (2007). Formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai en la producción ecológica de plántulas de melón en semillero para el control de la fusariosis vascular. Dpto de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos. Campus Universitario de Espinardo. Murcia, España.
47. Martínez B, Reyes Yusimy, Infante Danay, González E, Baños Heyker, Cruz A. (2008); Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia sp.* en arroz. Rev Protección Veg. 23(2):118-125.
48. Martínez B, Infante Danay, Reyes Y. (2010). About to identification of some *Trichoderma isolates* reported in Revista de Protección Vegetal. Rev Protección Veg.; 25(2):135.
49. Martínez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M, Baccou JC. (2011); Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. Plant Physiol. 127:334-344.
50. Martínez B, Infante D, Reyes Y. (2013); *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev Protección Veg. 28(1):1-11.
51. Martínez B, Infante Danay, Reyes Y. (2015). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev Protección Veg.; 28(1):1-11.
52. Mello M, Ávila C, Gomes A. (2006). Cepas de *Trichoderma spp.* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* en soya. En: Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros antagonistas. Taller Latinoamericano Memorias, Ed. CIDISAV, Ciudad de La Habana, Cuba.
53. Muiño B, Sáenz M, Stefanova M, Pomas A, Díaz I. (2006). Compatibilidad de *Trichoderma spp.* con plaguicidas y fertilizantes en el cultivo del tabaco (*N. tabacum* L.). Fitosanidad; 10(2):153.

54. 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*, Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 60p.
55. Olivera costa, 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.
56. Páez O. (2006). Uso agrícola de *Trichoderma*. Disponible en: <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>
Consultado: 10 de enero de 2008.
57. Parra J, Pavone D. (2012). Efecto de *Trichoderma spp.* sobre *Rhizoctonia solani* y algunos parámetros fisiológicos en *Zea mays* L. bajo condiciones de vivero. Trabajo de grado, Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo.
58. Pérez, E. (2017). Manejo integrado de malezas. Curso CISAV Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 19 pp.
59. Pérez CM. (2012). Aislamientos de *Trichoderma spp.*, nativos de Venezuela, promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* (Kühn) en maíz (*Zea Mays* L.). Trabajo de Grado presentado como requisito final para optar al título de Magister Scientiarum en Agronomía. Venezuela.
60. Pérez Consuegra, M. (2004). Manejo ecológico de plagas. (en línea). La Habana, Cuba, Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural (CEDAR). 296 p. Consultado en 20 junio 2014. Disponible en <http://www2.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecoplagas/Bibliografia.pdf>
61. Persoon CH. (1794). Disposita methodica fungorum. Römer's Neues Mag Bot.; 1:81-128.
62. Pineda, J. B.; C. D. Polanco: (2005). «Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de *Penicillium notatum* Westl», *Agronomía Tropical*, 31:265-281.
63. Polanco, C. D.; J. L. Castro: (2005). «Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*», *Agronomía Tropical*, 27:539-547

64. Rapilly, F., (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétale. eds. Ann. Epiphyt. pp: 101.
65. Reyes Y, Martínez B, Infante Danay, García-Borrego J. (2009). Evaluación de la compatibilidad de *Trichoderma asperellum* Samuels con algunos de los herbicidas de mayor uso en el cultivo del arroz. XVII Congreso Científico del INCA, Habana, Cuba,
66. Rifai M A. A revision of the genus *Trichoderma*. Res Mycol. (1969); 116:1-56.
67. Rivero Deyanira. (2008). Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma spp.* de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). Rev Protección Veg.; 23(1): 67.
68. Rodríguez. I. (1990). Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana,
69. 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 elicitor del sistema de defensa en plantas. Conferencia en IPICYT, 1 Nov. San Luis Potosí, México. Disponible en: <http://www.ipicyt.edu.mx/Trichoderma/elicitortransformación.php.htm>. [Consultado: 24 de marzo de 2011].
70. Samuels, G. J.; P. Chaverri; D. F. Farr; E. B. McCray: (2005). «*Trichoderma* on Line, Systematic Botany & Mycology», Laboratory, ARS, USDA, <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Acceso en feb.
71. Samuels G, Dodd S, Lu B, Petrini O, Schroers H, Druzhinina I. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. Studies in Mycology.; 56:67-133.
72. 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.

73. Seibel C, Tisch D, Kubicek CP, Schmoll M. (2012). The role of pheromone receptors for communication and mating in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Fungal Genetics and Biology*; 49:814824.
74. Sharon E, Chet I, Spiegel Y. (2011). *Trichoderma* as a Biological Control Agent (Chapter 8). In: Davies K, Spiegel Y. (Eds.). *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, © Springer Science.
75. Shores M, Harman G, Mastouri F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu Rev Phytopathol*; 48:21-43.
76. Stamatiou, Katina. (2013). Tolerancia y Biodegradación de Plaguicidas con Hongos Filamentosos (Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de doctor en ciencias). Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas Campus Montecillo, Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico.
77. Stefanova M, Leiva A, Larriganaga L, Coronado MF. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp.* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía.*; 16:509-516.
78. Sueli Corrêa, M. Mello, Zilá R. Ávila, Leonardo Minaré Braúna, Raquel R. Pádua y Diogo Gomes, (2007). Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología, CP.02372 CEP 70770-900, Brasília, DF, smello@cenargen.embrapa.br. 2 Bolsista-CNPq-Faculdades Integradas da Terra, Q203 Área Especial lote 2, CEP 72610-300, Recanto das Emas, DF.
79. Vero SM, Mondino P. (1999). Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional.*; 7:1-10.
80. Villegas M. (2005). *Trichoderma*. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/tecnica/128-trichoderma-pers-caracteristicas-y-su-potencial-biologico-en-la-agricultura-sostenible>
81. 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.

VIII. Anexos

1. Fotos del crecimiento radial en placa Petri de las cepas del Hongo Antagonista *Trichoderma spp.*



Trichoderma viride
TS-3

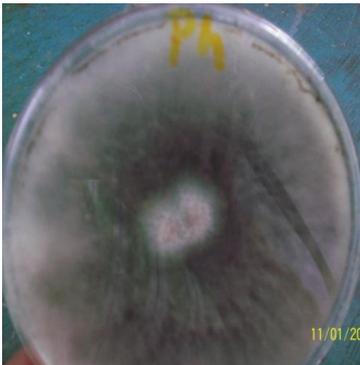


Trichoderma harzianum
A-34



Trichoderma harzianum
A-53

2. Fotos del crecimiento radial en placa Petri de los Hongos fitopatógenos ensayados.



Fusarium solani



Sclerotium rolfsii



Pseudocercospora
griseola

3. Fotos del crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en el medio papa-dextrosa-agar.



T. viride cepa TS-3



T. harzianum cepa A-53



T. harzianum cepa A-34

4. Antagonismo *in Vitro* de la cepa TS-3 de *trichoderma harzianum* contra hongos fitopatógenos.



TS-3 vs F.



TS-3 vs S.

5. Antagonismo *in Vitro* de la cepa A-53 de *Trichoderma harzianum* contra hongos fitopatógenos.



A-53 vs S.



A-53 vs F.



A-53 vs Ps.

6. Antagonismo *in Vitro* de la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* contra hongos fitopatógenos.



A-34 vs S.



A-34 vs F.



A-34 vs Ps.

7. Comportamiento de los parámetros calculados para 5 días de crecimiento *in Vitro* de las cepas de *Trichoderma* ensayadas contra hongos fitopatógenos.

