

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



**ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma harzianum* Y *T. viride* SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum* EN TRES MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO, AYACUCHO.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR:  
EMILIANO VELÁSQUEZ FLORES**

**AYACUCHO - PERÚ  
2017**

A mis padres: Mercedes y  
Teodoro.

A mis hermanos: Vilma, Nery,  
Maycon, Elizabeth, Jorge Luis y Luz  
María.

A la memoria de mi abuelo  
Zacarías Flores López.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga alma mater de generaciones.

A la Escuela Profesional de Agronomía y a toda la plana docente.

Al Ing. Fernando Barrantes Del Águila por su confianza y apoyo durante todo el proceso del presente trabajo.

Al Ing. Guillermo Carrasco Aquino por su apoyo y colaboración en la ejecución de la tesis.

## CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN .....	1
I. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
1.1. Pudrición blanca por <i>Sclerotinia</i> .....	3
1.2. Clasificación taxonómica de <i>Sclerotinia</i> .....	4
1.3. Biología de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	4
1.4. Patogénesis de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	8
1.5. Antagonismo y antibiosis .....	9
1.6. Mecanismos de antagonismo .....	10
1.7. Control biológico .....	14
1.8. Control biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	16
1.9. Biología de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. viride</i> .....	17
1.10. Características antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	22
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
2.1. Lugar de investigación .....	30
2.2. Materiales y equipos .....	30
2.3. Metodología .....	31
2.4. Evaluación descriptiva y cuantitativa .....	36
2.5. Diseño experimental .....	37
2.6. Evaluación de la actividad antagónica .....	40
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	127
LITERATURA CITADA .....	131
ANEXO .....	140

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antagónica con pruebas duales en placas de Petri usándose *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *Sclerotinia sclerotiorum*; en los medios nutritivos modificados a partir de PDA (papa-dextrosa-agar), se excluyó la dextrosa, por ser poco apta para *Sclerotinia*. Los medios se formularon con infusiones de apio, cayhua y lechuga, además de peptona, fosfato de potasio monobásico y sulfato de magnesio heptahidratado. Los inóculos para siembra fueron hifas y esclerotes de *Sclerotinia* y conidias de *Trichoderma*. La inclusión de ventaja de crecimiento para *Sclerotinia* en los medios, es una nueva propuesta para evaluar la capacidad antagónica de *Trichoderma* y la susceptibilidad o tolerancia de *Sclerotinia*. En PDA a partir de hifas, con siembra al mismo tiempo, los *Trichoderma* perjudicaron el crecimiento micelial de *Sclerotinia* y la producción de esclerotes. El uso de esclerotes en PDA y ventaja para *Sclerotinia*, mejoró el crecimiento de *Sclerotinia*, disminuyendo en los *Trichoderma*. En medio PAApio (papa-agar-apio) con ventaja, *Sclerotinia* tuvo el mejor efecto opositor para ambos *Trichoderma*. La presencia de ambos *Trichoderma* en siembra con ventaja estimuló el crecimiento rápido de *Sclerotinia* en los tres medios. En siembra esclerotial y con ventaja de 4 días para *Sclerotinia* en los medios PAApio y PACayhua, el crecimiento de los *Trichoderma* se redujo. En PALechuga, con ventaja y siembra esclerotial, *Sclerotinia* tuvo crecimientos radiales altamente significativos (Th/Ss: 1.97/5.20 cm; Tv/Ss: 1.83/5.20 cm). En PAApio, PACayhua y siembra al mismo tiempo, *Sclerotinia* no pudo contrarrestar el crecimiento de los *Trichoderma*. En PALechuga siembra hifal y sin ventaja, *Sclerotinia* creció mejor en presencia de los *Trichoderma*. En PACayhua, sin ventaja y con siembra esclerotial, *Sclerotinia* fue anulado por completo. El crecimiento retardado del esclerote, en siembra sin ventaja en PAApio, permitió que *Trichoderma* creciera sin oposición ante *Sclerotinia*. En PACayhua dual, el crecimiento de las colonias a partir del esclerote, registraron Th/Ss: 6.4/0.80 cm y Tv/Ss: 6.33/0.87 cm; en PALechuga se obtuvo Th/Ss: 6.13/1.33 cm y Tv/Ss: 5.67/1.37 cm de diámetro.

## INTRODUCCIÓN

El control biológico forma parte de la tecnología para evitar o erradicar patógenos de los cultivos. Se considera que no tiene efectos negativos para el ecosistema y es aplicable en forma combinada con todos los sistemas de control. Todos los organismos tienen sus antagonistas en alguna etapa de su vida, que les ocasiona daños temporales o permanentes. En el ámbito agrícola son frecuentes las relaciones de antagonismo, en cuales intervienen el patógeno, su antagonista y el ambiente donde se establecen. Uno de los patógenos frecuentes, que habitan el suelo y afectan las cosechas, en todos los continentes es *Sclerotinia sclerotiorum* que tiene un amplio rango de hospedantes (frijol, lechuga, calabaza, girasol, zapallo), en los cuales ocasiona pudriciones húmedas o semisecas; como estructuras de conservación forma esclerotes duros y oscuros que permanecen viables por varios años en el suelo y en los residuos de cosecha. Diversas investigaciones han evidenciado la existencia de muchos antagonistas, entre los cuales destaca el género *Trichoderma* un hongo de suelo que ha mostrado alta eficiencia en suprimir a patógenos de cultivos. El antagonismo se efectúa ejerciendo antibiosis, micoparasitismo, supresión y competencia.

La existencia de *Sclerotinia* como parásito en hortalizas, tuberosas, ornamentales y plántulas de almácigo en la región Ayacucho, constituyó la motivación para efectuar pruebas de antagonismo in vitro incluyendo las especies de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, tres modificaciones del

medio PDA y la aplicación de ventaja de crecimiento para *Sclerotinia* en cultivos duales e individuales.

Objetivos planteados:

- Evidenciar el antagonismo supresivo de dos especies de *Trichoderma* sobre el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* en tres medios de cultivo in vitro.
- Establecer diferencias antagónicas entre las dos especies de *Trichoderma* ante la presencia de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro.

## I. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1. PUDRICIÓN BLANCA POR SCLEROTINIA.

Boland y Hall (1994) y Duncan et al. (2005), citado por Ramos (2014) indican que este patógeno exhibe poca especificidad y un rango amplio de hospedantes incluyendo a 408 especies, 278 géneros y 75 familias de especies de plantas, principalmente dicotiledóneas. Las condiciones frescas y alta humedad favorecen el desarrollo de *S. sclerotiorum*. La temperatura óptima para su crecimiento es de 15 a 21°C. *S. sclerotiorum* afecta de manera importante el cultivo de frijol, los síntomas que causa este patógeno son la formación de lesiones oscuras y acuosas en las hojas y tallos de la planta.

Schwartz y Pastor (1988) indican que es una de las enfermedades más destructoras en el cultivo de frijol, su importancia es mayor en las zonas templadas, en áreas tropicales o semiáridas donde se aplica riego, especialmente durante las épocas frías.

Torres y Guerrero (2008) reportaron que *Sclerotinia sclerotiorum* tuvo un crecimiento micelial promedio por día de 9.3 mm en medio de cultivo PDA, llenando la placa de 90 mm de diámetro en 5 días. En cultivo dual con *Trichoderma harzianum* (producto comercial TRICHOD), *S. sclerotiorum* creció 8.8 mm por día y *T. harzianum* 5.8 mm, produciéndose el encuentro micelial al tercer día. Concluyen que el antagonista tuvo un efecto únicamente de parasitismo mas no efecto antibiótico, al final invadiendo la colonia del hongo patógeno.



Arias et al. (2007) reportaron que los esclerotes de *Sclerotinia sclerotiorum* se forman al final del periodo de cultivo a partir de micelio algodonoso blanco formado en tallos de plantas herbáceas. Esta observación también es confirmada por Pérez et al. (2009).

Subbarao (1998), citados por Pérez et al. (2009) indican que *S. sclerotiorum* tiene germinación miceliogénica a partir de hifas y germinación carpogénica cuando germinan las ascosporas producidas en el ascocarpo. Las formas de resistencia denominadas esclerocios, corresponde al 90% del total, y miceliogénica el 10%.

Ferreyra y Boyle (1992), citados por Pérez et al. (2009) reportan que bajo adecuada humedad, la germinación de las ascosporas ocurre entre 3 y 6 horas después de la liberación; pero Subbarao (1998) reportó que la germinación, en presencia de agua en la hoja, se presenta durante 48 horas o más.

## **1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Martínez (2008) clasifica en:

Reino	: Fungi
Filum	: Ascomycota
División	: Eumycota
Clase	: Ascomycetes
Subclase	: Discomycetes
Orden	: Helioteliales
Familia	: Sclerotiniaceae
Género	: <i>Sclerotinia</i>
Especies	: <i>S. sclerotiorum</i> , <i>S. minor</i> .

## **1.3. BIOLOGÍA DE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Willems y Wong (1980), citado por Martínez (2008) mencionan que el crecimiento de este hongo presenta un rango óptimo de temperatura de

20 a 30°C y pH entre 3.4 a 4.0. Los requerimientos nutricionales de *Sclerotinia*, son específicos, con un mayor crecimiento en fuentes de nitrógeno dentro de las cuales se encuentra 12 aminoácidos, sales de amonio, nitrato, úrea, peptona y caseína hidrolizada; como fuentes de carbono se encuentran la sacarosa, manitol, almidón y celobiosa.

Schwartz y Pastor (1988) indican que los esclerocios necesitan de un periodo de pre acondicionamiento en el suelo de mínimo 3 meses, para iniciar su germinación carpogénica o sexual. La germinación de los esclerocios se inicia con la aparición de las estípulas o tallos apoteciales de color pardo oscuro, que se desarrollan hasta alcanzar la superficie del suelo. Las estípulas no requieren de luz para desarrollarse y alcanzan una longitud promedio de 3 a 5 cm. En los terminales de las estípulas y solo en presencia de luz se forman los apotecios. Estos son discos de color bronce claro, con diámetro promedio de 3 mm. Cada apotecio contiene miles de ascas cilíndricos en forma de conidias, que a su vez tienen en su interior 8 ascosporas. Para que las ascosporas puedan germinar requieren una fuente de energía exógena, generalmente proviene de partes senescentes de la planta.

Peluffo (2010) sostiene que los esclerocios juegan un papel importante debido a que son estructuras de supervivencia de larga duración que pueden permanecer viables hasta 8 años. Se han caracterizado 3 estadios en el desarrollo de los esclerocios: iniciación, desarrollo y maduración. Por lo general los esclerocios son producidos cuando el crecimiento del micelio se encuentra limitado por la escasez de nutrientes. El pH tiene una influencia significativa en el desarrollo de los esclerocios. En medios de cultivo a pH neutro o básico, la formación de esclerocios se ve inhibida, mientras que la acumulación de ácido oxálico producida por el hongo lleva a una disminución del pH en el medio ambiente, favoreciendo el desarrollo de los esclerocios.

Arias et al. (2007) informan que la actividad patogénica se inicia en el suelo cuando las estructuras de reposo, denominado esclerocios,

comienzan el proceso de germinación ya sea carpogénica mediante la producción de apotecios los cuales forman ascosporas y miceliogénica, cuando el esclerocio produce micelio que afecta a las partes de la planta que están en contacto con la superficie del suelo.

Pérez, Piedrahíta y Arbeláez (2009) sostienen que los esclerocios germinan eruptivamente formando micelio o carpogénicamente estructuras delgadas que terminan en un pequeño apotecio con forma de copa o disco de un diámetro de 5 a 15 mm, en el cual se desarrollan las ascas y ascosporas para las cuales se requieren condiciones frescas y húmedas. Posteriormente, el micelio formado a partir del esclerocio infecta los tejidos vegetales. La infección causada por los esclerocios puede ocurrir en la superficie del suelo o debajo de esta.

Bajo condiciones de laboratorio Clarkson et al. (2003), citados por Pérez et al. (2009) encontraron esclerocios de *S. sclerotiorum* más grandes (2 a 10 mm de diámetro) que los de *S. minor*, poseen superficie lisa y son redondeados. Los esclerocios de *S. minor* son pequeños (0.5 a 2.0 mm de diámetro), rugosos, angulares y más numerosos que los de *S. sclerotiorum*.

Sepúlveda y Rebutel (2009), citados por Pérez et al. (2009) afirman que *S. sclerotiorum*, cuenta con amplio rango de hospedantes, que incluye especies de géneros muy diferentes, como alfalfa, frijol, garbanzo, ají, tomate, pepino, repollo, coliflor, etc. Ello hace más complejas las posibilidades de rotación de cultivos y manejo. A nivel mundial se señala a la fase sexual (apotecios y ascosporas) del hongo, como la principal fuente de inóculo de la enfermedad.

Erental et al. (2008), citado por Ramos (2014) reportaron que los esclerocios pueden germinar de dos maneras: carpogénicamente, produciendo apotecios, los cuales son estructuras que forman ascosporas, mismas que son dispersadas por el viento y son fuente de infección al germinar sobre tejidos senescentes tales como tejidos florales

y miceliogénicamente en la cual el esclerocio produce micelio algodonoso que infecta directamente tejidos vegetativos como tallos y hojas.

Heffer y Kenneth (2007) informan que *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. trifoliorum* son necrótrofos, las tres especies producen micelio blanco mullido en las plantas hospedantes. Los esclerocios tienen una corteza exterior dura y negra, con un blanco al interior de color beige claro. Son de forma irregular, miden de 2 a 5 mm de diámetro y hasta 25 mm de longitud, en *S. sclerotiorum* y *S. trifoliorum*, *S. minor* forma esclerocios pequeños (0.5 a 3 mm).

López (2010) indica que los esclerocios juegan un papel importante en el ciclo de la enfermedad ya que son fuentes de inóculo y estructuras de resistencia que le permiten al hongo sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo. El esclerocio es una estructura dura y resistente formada por la agregación de hifas, capas de células pseudo parenquimatosas melanizadas conocidas como corteza, las cuales se forman en la superficie externa y encapsulan a las hifas protegiéndolas de condiciones adversas. El tamaño del esclerocio varía dependiendo de la planta hospedante. En frijol presentan forma alargada, con un tamaño que oscila entre 2 - 10 mm.

Martínez (2008) menciona que las estructuras de conservación del hongo denominados esclerocios, son estructuras duras y resistentes, formadas por agregación de hifas, capas de células pseudo parenquimatosas melanizadas. El desarrollo del esclerocio comprende tres etapas: iniciación, en la que la hifa comienza a agregarse; desarrollo o crecimiento a un tamaño determinado y maduración. Durante el desarrollo del esclerocio se acumulan reservas endógenas de trehalosa, manitol y arabinol, además de pequeñas cantidades de glucosa, fructosa y manosa que les sirven de sostén durante el periodo de latencia y germinación.

#### **1.4. PATOGÉNESIS DE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Annis y Goodwin (1997), citado por López (2010) indican que en el proceso de patogenicidad el hongo produce un amplio rango de enzimas degradadoras de la pared celular, en las que se incluyen pectinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, glicosidasas, celulasas, xilanasas y cutinasas, que facilitan al hongo la invasión y colonización de la planta hospedante, además de crear una fuente de nutrientes asimilables. La expresión de muchas de estas enzimas es regulada por los niveles de transcripción y por enzimas de fuentes de carbono y/o nitrógeno.

Pérez et al. (2009) determinaron que la inoculación del patógeno con el hospedante puede ser: miceliogénica, a través de hifas provenientes del esclerocio original que alcanzan la base del tallo, las hojas y el sistema radical, o carpogénica, cuando el patógeno utiliza ascosporas que se producen en los apotecios generados a partir de las hifas provenientes de los esclerocios.

Pérez et al. (2009) indican que la penetración exclusivamente intercelular de las hifas de infección a través del tejido es incrementada por enzimas pectolíticas producidas por *Sclerotinia* spp., capaces de degradar la lamela media de las células del hospedante; dichas enzimas, endo y exopectinasa, celulasas, hemicelulasas y proteasas facilitan la degradación de la pared celular y la colonización posterior. Finalmente, el conjunto de hifas entrelazadas forman un micelio algodonoso en la superficie de las lesiones maduras.

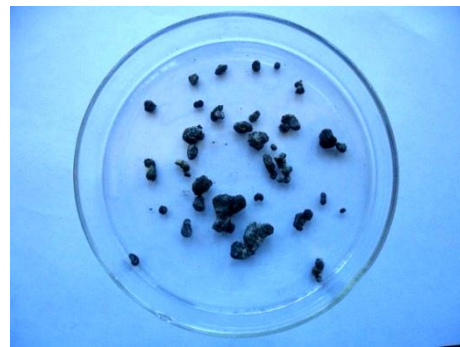
Pérez et al. (2009) sostienen que la nutrición de *Sclerotinia* spp., durante todos los estados del desarrollo de la enfermedad es el factor más importante en la determinación del éxito o fracaso en el establecimiento de la enfermedad en el hospedante. Durante la infección, el hongo se organiza en hifas especializadas de infección, que requieren una cantidad considerable de energía y una abundante cantidad de nutrientes disponibles. Algunas enzimas como la celulosa, la hemicelulosa, la

poligalacturonasa, la fosfatidasa, las enzimas proteolíticas y otras enzimas cumplen un papel nutricional en la patogénesis. La acción de estas enzimas en las paredes y los contenidos celulares proporcionan un suministro abundante de carbono y nitrógeno.

Guimaraes y Stotz (2004), citado por López (2010) demostraron que además de las enzimas degradadoras de pared celular, que facilitan su función como necrótrofo, el ácido oxálico producido por el hongo juega un papel importante, tanto en la patogénesis como en el desarrollo del mismo. La secreción de ácido oxálico provoca un descenso de pH de 4 a 5, lo cual favorece la actividad de muchas enzimas fúngicas secretadas durante la invasión de los tejidos vegetales. El ácido oxálico que secreta el hongo es capaz de producir especies reactivas a oxígeno en la planta hospedante, activando la muerte celular.



Fot. 1.1. Esclerotes de *Sclerotinia sclerotiorum* obtenidos de infección en cayhua fruto.



Fot. 1.2. Esclerotes de *Sclerotinia sclerotiorum* obtenido de medios de cultivo.

## 1.5. ANTAGONISMO Y ANTIBIOSIS

Jarvis (1998), citado por Roselló (2003) sostiene que la antibiosis es el antagonismo ejercido por los metabolitos de origen microbiano con actividad biocida, entre los cuales se encuentran los agentes líticos, las enzimas, los compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas. Los antagonistas deben ser capaces de producir metabolitos activos, no solo en medios artificiales sino también en condiciones naturales.

Wainwright (1995), citado por Roselló (2003) informa que *Trichoderma harzianum* produce un metabolito denominado harzianopiridona. Las piridonas fúngicas son relativamente raras y este es el primer compuesto producido por especies de *Trichoderma*. Muestras de extracto puro han sido producidas por fermentación y se ha demostrado que son moderadamente activas contra la costra de la manzana (*Venturia inaequalis*), el tizón del tomate (*Phytophthora infestans*) y *Botrytis cinerea*.

Según este autor, la competencia por los nutrientes es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre en cuando la utilización reduzca la cantidad disponible para los otros. Un factor esencial para que exista la competencia es la escasez o limitación de un elemento. La competencia por espacio en levaduras se destaca por producir compuestos extracelulares, principalmente polisacáridos, que restringen el espacio para que otros microorganismos lo colonicen.

Carlie y Watkinson (1997) y Fernández (2001), citado por Roselló (2003) reportaron que en la naturaleza el parasitismo es muy frecuente, y se trata de la acción directa de un microorganismo parasitando a otro, donde el patógeno es utilizado como alimento por su antagonista. El mecanismo se basa en la producción, por parte del antagonista, de enzimas extracelulares, como la quitinasa, la celulasa, la  $\beta$ -1,3-glucanasa y la proteasa, que utilizará para romper las estructuras del patógeno y poderlo parasitar. En *Trichoderma*, el parasitismo ocurre mediante la penetración, el engrosamiento de hifas, la producción de haustorios y la desorganización del contenido celular.

## **1.6. MECANISMOS DE ANTAGONISMO**

Vázquez y Garcidueñas (1998), citado por Chávez (2006) mencionan que los modos de acción del antagonismo incluyen producción de antibióticos, competencia por nutrientes, producción de enzimas degradadoras de la pared celular, estimulación de mecanismos de defensa de la planta.

## a. Micoparasitismo

Rey y col. (2000), citado por Chávez (2006) consideran que el micoparasitismo ocasiona la degradación de la pared celular de los fitopatógenos mediada por la acción de las enzimas hidrolíticas producidas por el antagonista, dentro de estas enzimas se encuentran gluconasas y quitinasas responsables de la degradación de la quitina y  $\beta$ -glucanos. La interacción comienza con el reconocimiento del hospedante o de moléculas liberadas por este, por acción enzimática del micoparásito. En este proceso el micoparásito crece directamente hacia su hospedante y se enrolla alrededor de este produciéndose la penetración del micelio en el hospedante, por la degradación de su pared celular.

Lorito (1998), citado por Castillo (2004) informa que el micoparasitismo es el fenómeno por el cual un hongo coloniza a otro, asociado a una serie de eventos e interacciones. Las enzimas producidas por *T. harzianum* capaces de hidrolizar las paredes celulares de numerosos hongos. Estas enzimas incluyen endoquitinasas, proteasas, exoglucan  $\beta$ -1,3-glucosidasas, endoglucan  $\beta$ -1,6-glucosidasas.

Martínez, Infante y Reyes (2013) evidenciaron que micoparasitismo es un proceso complejo. Esta interacción entre antagonista y patógeno ocurre en cuatro etapas:

**Crecimiento quimiotrófico:** *Trichoderma* puede detectar a distancias a sus posibles hospedantes.

**Reconocimiento:** se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato.

**Adhesión y enrollamiento:** ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

**Actividad lítica:** producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, gluconasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma*.



El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación.

Se considera que la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa se encuentra estrechamente relacionada con la degradación de la pared celular de patógenos y se evidenció una correlación positiva entre la secreción de  $\beta$ -1,3-glucanasa y N-acetylhexosaminidasa con la capacidad controladora de *Trichoderma*. En otras interacciones, las especies de *Trichoderma* lograron producir polisacaridasas, proteasas y lipasas, compuestos que intervienen en la degradación de la pared de las células de *Fusarium oxysporum* f. sp.

Haran et al. (1996), citados por Martínez et al. (2013) encontraron diferentes niveles de producción de enzimas hidrolíticas, cuando *Trichoderma* se enfrentó a *S. rolfsii* y *R. solani*. La actividad de una de las enzimas producida durante la acción parasítica de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii*, no se detectó en la interacción *Trichoderma* y *R. solani*, lo que evidenció la existencia de una selectividad en la producción enzimática por el antagonista en dependencia del agente fitopatógeno a controlar.

El crecimiento de *Trichoderma* sobre el patógeno en cultivo dual, no es garantía de alta capacidad parasítica, ya que las hifas de ambos pueden compartir espacios en el sustrato sin llegar a parasitarlo.

## **b. Antibiosis**

Tronsmo y Gordon (1998), citado por Castillo (2004) indican que la antibiosis ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos por un organismo con acción directa sobre otro. *Trichoderma* spp., produce antibióticos y enzimas durante el proceso de micoparasitismo.

Martínez et al. (2013) sostienen que los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen en grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diversos en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos

secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico. Se identificaron compuestos del tipo de las alquil-pironas (6- $\alpha$ -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina), atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichoianina, dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina).

Vinale et al. (2006), citados por Martínez et al. (2013) caracterizaron un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona), 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, koniginina, ácido heptelídico, trichoviridina, ácidoharziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) obtenidos de la interacción entre *R. solani* y dos cepas comerciales (T22 y T39) de *T. harzianum*.

Algunas especies de *Trichoderma* producen compuestos antifúngicos que actúan sobre *R. solani* y *S. rolfii* ocasionando la degradación de sus hifas, otros la inhibición in vitro, la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*.

La capacidad de una misma cepa de *Trichoderma* de secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente, limita el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos.

*T. harzianum* secreta una proteasa que degrada las enzimas que utiliza *B. cinérea* para afectar la pared celular de las plantas, mientras que *T. viride* produjo  $\alpha$ -glucosidasa para degradar una fitotoxina de *R. solani*.

Harman et al. (2004), citados por Martínez et al. (2013) reportaron que una cepa de *Trichoderma* contribuye al crecimiento de las raíces de maíz y algunos pastos, haciendo que estos cultivos sean más resistentes a la sequía; aislamientos seleccionados de *Trichoderma* estimularon la germinación y la altura de plantas de frijol con una ganancia en peso de 60%.

### **c. Competencia**

Tronsmo y Gordon (1998), citado por Castillo (2004) sostienen que la competencia ocurre cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. La competencia entre el antagonista y el fitopatógeno puede resultar en la aniquilación de la población perjudicial, y puede darse en favor de *Trichoderma* spp., debido a su alta tasa de crecimiento y desarrollo.

Boland (1998), Cook (1989), Harman (2001) y Campbell (1989), citados por Castillo (2004) informaron que por su carácter saprófito, *Trichoderma* spp., expresa un crecimiento rápido y uso eficiente del espacio de la rizósfera, creando una exclusión física de nicho.

### **d. Inducción de Resistencia**

Martínez et al. (2013) reportaron que algunas cepas de ***Trichoderma*** **pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas, conocido como Inducción de Resistencia Sistémica (IRS)**. Esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista. La colonización de las raíces de pepino con *T. asperellum*, indujo resistencia a *Pseudomonas syringae* en el follaje. Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizósfera y estar relacionados con la IRS en las plantas.

## **1.7. CONTROL BIOLÓGICO**

Serrano y Galindo (2007) indican que el control biológico es el uso de organismos (metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de un patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. Los organismos controladores son capaces de antagonizar con los patógenos, reduciendo sus efectos nocivos.

Wainwright (1995), citado por Roselló (2003) define que los hongos poseen un conjunto de características que los hacen biocontroladores potencialmente ideales, puesto que se desarrollan fácilmente en medios de cultivo pudiendo producirse en grandes cantidades y ser liberados al ambiente como esporas o fragmentos de micelio; tienen capacidad de sobrevivir durante periodos largos en reposo y germinar cuando las condiciones son favorables. Los compuestos biológicamente activos de los hongos son efectivos a concentraciones muy bajas, no son persistentes y no causan daño al ambiente.

Martínez (2008) sostiene que el control y/o supresión de la enfermedad por biocontroladores se ha basado en competición por fuentes de nutrientes y espacio, antibiosis, inducción de resistencia en las plantas, reducción de la habilidad saprofítica, reducción de la diseminación de esporas y micoparasitismo.

Nelson (1991), citado por Michel (2001) evaluó con éxito a *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pythium*, *Laetisaria*, *Sporidesmium*, *Coniothyrium*, *Verticillium* y *Talaromyces*, en el control de enfermedades como organismos biocontroladores.

Baker y Cook (1974), citado por Roselló (2003) indican que los suelos que presentan menos patógenos se le conoce como suelos represivos, la naturaleza de la represión se debe a la presencia de hongos antagonistas, mediante la fungistasis, la competencia saprofítica y el parasitismo. Para controlar los patógenos del suelo de las plantas, se debe introducir el antagonista en el suelo, o incrementar la cantidad de lo existente si lo hubiese.

Tovar (2008) indica que la actividad de biocontrol contra fitopatógenos fúngicos se fundamenta sobre la activación de múltiples mecanismos como: la inactivación de las enzimas del patógeno, la competencia por el espacio y nutrientes, la secreción de metabolitos secundarios con efecto antibiótico y el daño directo a otro hongo o micoparasitismo.

## 1.8. CONTROL BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bardin y Huang (2000), citado por Martínez (2008) informan que muchos programas de manejo de *Sclerotinia* spp., se han enfocado en la aplicación de organismos biocontroladores en la lechuga, frijol y canola. Los agentes han sido hongos micoparásitos, cepas hipovirulentas de *Sclerotinia* spp., bacterias e insectos micófagos.

El control y/o supresión de la enfermedad se ha basado en competición por fuentes de nutrientes y espacio, antibiosis, inducción de resistencia en las plantas hospedante, reducción de la habilidad saprofítica, reducción de la diseminación de esporas, restricción de los factores de patogenicidad del patógeno y micoparasitismo. Dentro de los hongos micoparásitos de *Sclerotinia* spp., se encuentran *Coniothyrium minitans*, *Clonostachys rosea* y *Trichoderma* spp., los cuales son capaces de parasitar y degradar esclerocios. *Trichoderma koningii* y *T. harzianum* han demostrado ser eficientes degradadoras de esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Adams y Ayers (1979) y Papavizas (1985), citados por Arias et al. (2007) mencionan que para el control biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* se han identificado más de 30 especies de hongos y bacterias como antagonistas y micoparásitos, entre los cuales se encuentran *Trichoderma* spp. y *Coniothyrium minitans*.

Burgess y Hepworth (1995), citado por López (2010) afirman que la supresión de la enfermedad ejercida por microorganismos se basa en antibiosis, competencia por fuente de nutrientes y espacio, micoparasitismo, inducción de resistencia en la planta hospedante, reducción en la diseminación de esporas y restricción de los factores de patogenicidad. Las especies de *Trichoderma* spp., *Ulocladium atrum*, *Aspergillus terreus*, *Coniothyrium minitans* y *Clonostachys rosea* actúan de manera eficaz al aplicarse en suelo donde parasitan y degradan esclerocios en invernadero y campo. Conidios de *T. virens* fueron

utilizados para inocular semillas de girasol disminuyendo la incidencia de *Sclerotinia* spp., hasta un 59%.

Hoyos, Duque y Orduz (2008) indican que el control biológico, está basado en la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno. Entre los hongos micoparásitos de *S. sclerotiorum* se encuentra *Coniothyrium minitans*, *Clonostachys rosea* y *Trichoderma* spp., los cuales son capaces de parasitar y degradar esclerocios de *S. sclerotiorum*.

Ramos (2014) informa que el control biológico contra *S. sclerotiorum* comprende el uso de hongos micoparásitos y bacterias antagonistas. *Coniothyrium minitans* es un hongo micoparásito de esclerocios de *S. sclerotiorum*, de igual manera *Bacillus subtilis* presenta un efecto antagonista contra el moho blanco.

Rodríguez y Veneros (2011) determinaron mediante una comparación diaria del radio del crecimiento del antagonista con el radio de crecimiento del patógeno aislados de frutos de papaya, la competencia por nutrientes y espacio en cultivo dual, determinándose, que *Trichoderma harzianum* desarrolló una velocidad superior a la de los hongos patógenos, con un crecimiento promedio de 6.29 cm al décimo día de cultivo; mientras que los patógenos mostraron un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 2.75 cm al décimo día. *Alternaria alternata*, *Stemphylium lycopersici* y *Lasiodiplodia theobromae* resistieron mejor la acción antagónica de *T. harzianum*, en cambio *F. oxysporum* mostró gran susceptibilidad a la acción de *Trichoderma harzianum*.

### **1.9. BIOLOGÍA DE *Trichoderma harzianum* y *T. viride***

Cook y Baker (1989), citado por Leyva (2006) definen que el género *Trichoderma* spp., posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados; las conidias se agrupan en forma de pelota presentando distinto tamaño y forma. Comúnmente forma clamidosporas intercaladas

las cuales varían de azules a verdes. El género *Trichoderma* está compuesto por hongos presentes en forma natural en casi todos los suelos y otros hábitats, coloniza las raíces de la planta con facilidad.

Harman (2000), citado por Leyva (2006) indica que *Trichoderma* spp., ha desarrollado mecanismos para parasitar a otros hongos, actuando como biocontrolador y colonizador de raíces. Durante su evolución, *Trichoderma* fue adquiriendo la capacidad de parasitar y/o excluir a otros hongos competidores. Entre los métodos de acción del hongo se pueden mencionar:

- Parasitismo directo.
- Producción de antibióticos.
- Competencia por nutrientes y espacio.
- Inactivación de enzimas del patógeno.
- Inducción de resistencia en la planta.
- Mejoramiento del desarrollo radicular.
- Estimular el crecimiento de la planta.

La forma más común de *Trichoderma* de parasitar a otros hongos, es el parasitismo directo, lo cual se logra envolviendo las células del hongo (hifas) a parasitar (hospedante) en forma de tirabuzón. *Trichoderma* secreta enzimas (celulasas, gluconasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y del micelio del biocontrolador, que se encarga de absorber los nutrientes del interior del hongo hospedante. Al final el micelio del hongo parasitado queda vacío y con perforaciones.

Chávez (2006) sostiene que el hongo está ampliamente distribuido en el mundo en diferentes rangos de zonas de vida y hábitats, principalmente en zonas que contienen materia orgánica y desechos vegetales en descomposición. *Trichoderma* spp., actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces; tiene acción directa sobre el hongo fitopatógeno: micoparasitismo, antibiosis, competición por nutrientes y

espacio y desactivación de las enzimas de los patógenos y acción indirecta impulsando mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta como: tolerancia al estrés en la planta, mejorando la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y generando resistencia inducida.

Margolles y col. (1996) y Garisto y Harman (2001), citados por Chávez (2006) sostienen que *Trichoderma* spp., posee un rápido crecimiento y desarrollo, produce una gran cantidad de enzimas inducibles en presencia de hongos fitopatógenos. Enzimas con actividad quitinolítica se han purificado y caracterizado: N-acetil glucosamidasa, quitobiosidasa y endoquitinasa, la producción de  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasas y proteinasas, cuya actividad se incrementa en medio de residuos orgánicos con quitina.

Castro y Rivillas (2012) indican que el rango de temperatura para el crecimiento de *Trichoderma* varía entre 15 - 30°C, con un óptimo de 25°C, temperaturas mayores a 30°C limitan el crecimiento y desarrollo del hongo, e inicia la formación de clamidosporas. Las condiciones adecuadas de humedad están en el 70%, pero tiene la capacidad de crecer en un rango entre 20% y 80%. La condición de pH fluctúa entre 5.5 y 7.5, con un óptimo de 6.6.

### **1.9.1. Características macroscópicas**

Arango y col. (1988) y Barnett y Hunter (1972), citados por Chávez (2006) sostienen que las colonias de *Trichoderma* spp., se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas verdosas, amarillo verdosas; en *T. harzianum* las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos. Por debajo de las placas de cultivo, las colonias tienen color amarillo, ámbar o amarillo verdoso.



### 1.9.2. Características microscópicas

Arango y col. (1988), citado por Chávez (2006) sostiene que los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificados, no verticilados solitarios o en grupos. Las fialides son en forma de botella, únicas o en grupos hinchadas en la región central, pero delgadas hacia el ápice. Hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Las conidias son unicelulares subglobosas u oblongas, lisas, hialinas o verdes.

Barnett y Hunter (1972) informan que los conidióforos de *Trichoderma* son hialinos, muy ramificados, no verticilados; los fialides solitarios, individuales, o en grupos; las conidias son fialosporas hialinas, de una célula, ovoides, que aparecen en pequeños clúster o agrupaciones terminales; usualmente son fáciles de reconocer por su rápido crecimiento en áreas verdes o colchones de conidias; *Trichoderma* es saprófito muy común en el suelo o en tejido leñoso en descomposición; se ha reportado que algunas especies son parásitos de otros hongos.

Agrios (2004) y Kredics y col. (2003), citados por Chávez (2006) indican que *Trichoderma harzianum* ha demostrado parasitismo sobre el micelio de *Rhizoctonia* spp. y *Sclerotinia* spp., inhibe el crecimiento de muchos hongos, como *Pythium* spp., *Fusarium* spp. y *Fomes* spp.

Cook y Baker (1989), citado por Castillo (2004) sostiene que *Trichoderma* spp., es el hongo antagonista más estudiado, habiéndose demostrado su efecto sobre patógenos como *Armillaria mellea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Verticillium dahliae*, *Gliocladium* spp., entre otros. El mecanismo de control de *Trichoderma* spp., se basa principalmente en la competencia y predación.

### 1.9.3. Especies de *Trichoderma* spp.

#### a. *Trichoderma harzianum*

Castillo (2004) menciona que *Trichoderma harzianum* produce esporas asexuales o conidias, posee clamidiosporas terminales y/o intercalares, las cuales son cilíndricas o globosas y miden en promedio 6.9  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se caracterizan por producir fialides simples que se ubican lateralmente sobre los conidióforos o en grupos de 2 a 4 en forma terminal. Las fialosporas surgen de los extremos de las fialides y ocurren en cadenas, suaves. Estas son hialinas o subhialinas, principalmente subglobosas de 2.7 a 3.2  $\mu\text{m}$  de diámetro.

*Trichoderma harzianum* según Roselló (2003) las colonias presentan un crecimiento rápido, poco uniforme y con penachos de pelos aislados, al principio hialinas y después adquieren tonalidades de color verde debido a la producción de conidios. El micelio es de color verde blanquecino y los conidios amarillo - verdoso. Los conidióforos presentan estructuras muy ramificadas de forma piramidal. Las fialides en forma de frasco surgen de las ramas normalmente de 5 - 7 x 3.0 - 3.5  $\mu\text{m}$ . La forma de los conidios varía de esferoidal a subesferoidal a veces son esferoidales de 2.5 - 3.2, 4.0  $\mu\text{m}$ ., de diámetro o de largo y con pared lisa. Las clamidiosporas están presentes en el micelio de las colonias viejas en su mayoría globosas y de pared lisa.

Pitt y Hocking (1999) y Samson et al. (2000), citados por Roselló (2003) reportan que los metabolitos más importantes producidos por *Trichoderma* son los antibióticos gliotoxina, la emodina y la trichodermina. Del mismo modo *T. harzianum* es un hongo de distribución cosmopolita que vive en el suelo, considerado como un importante biodegradador, especialmente de la madera.

## **b. *Trichoderma viride***

Neemproducts (2008), citado por Guilcapi (2009) indica que *Trichoderma viride* es un organismo antagonista de hongos presentes en el suelo y altamente efectivo para el control de enfermedades en legumbres y semillas de oleaginosas. Es un hongo que coloniza las semillas, se multiplica sobre ellas y elimina a los patógenos presentes en la superficie.

### **Clasificación Taxonómica de *Trichoderma* spp.**

Alexopoulos et al. (1996), citado por Tovar (2008) clasifica en:

Reino	: Fungi
División	: Eumycota
Subdivisión	: Deuteromycotina
Clase	: Hyphomycetes
Orden	: Hyphales (Moniliales)
Familia	: Moniliaceae
Género	: <i>Trichoderma</i>
Especie	: <i>T. harzianum</i> , <i>T. viride</i> .

### **1.10. CARACTERÍSTICAS ANTAGÓNICAS DE *Trichoderma harzianum* y *T. viride*.**

Castillo (2004) indica que *T. harzianum* es un bioregulador y antagonista natural de los fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. roseum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp, *Alternaria* spp., *Armillaria mellea*, *Rosellinia* spp.

Rodríguez (2002) sostiene que *T. harzianum* parasita micelio de *R. solani* actuando por medio de clavijas alrededor de la hifa de su hospedante y luego penetra por lisis enzimática de la pared celular, parasitando internamente las células hifales o invadiendo la capa melánica y el tejido pseudo parenquimatoso del esclerote por medio de la  $\beta$ -1,3-gluconasa y quitinasa o por aglutininas (lecitinas) presentes en *R. solani*. Considerado

como sustancias de reconocimiento para la interacción del micoparasitismo entre *Trichoderma* y *R. solani*. *T. harzianum* produce poca cantidad de antibióticos comparando con otras especies de *Trichoderma*.

Almaraz (2012) observó que todos los aislamientos de *Trichoderma* puestos en prueba invadieron las colonias de *P. cinnamomi* por el mecanismo de competencia, y en algunos casos debido al micoparasitismo ocasionaron lisis; redujeron el crecimiento y desarrollo del patógeno. Se considera que la colonización del área compitiendo por espacios y nutrientes es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio del patógeno; se estableció que *Trichoderma* es un buen candidato en el control biológico de *P. cinnamomi*.

Robles (2012) hizo una revisión de información sobre control biológico con microorganismos antagónicos, indicando que en la naturaleza existe una continua interacción entre los microorganismos fitopatógenos y sus antagonistas, de forma tal que ellos ayudan a la regulación natural de las enfermedades. El antagonismo es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. La antibiosis es un proceso de interacción entre organismos en el cual uno o más metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y tienen efecto dañino sobre uno o más organismos, normalmente actúan en bajas concentraciones. La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren para su funcionamiento del mismo alimento. El consumo de uno reduce la cantidad disponible del otro; al final se impone uno de ellos como un modo de acción indirecto.

Michel et al. (2013) evaluaron la acción antagónica de *Trichoderma* spp. En *Sclerotium rolfsii* en cultivos pareados o duales, midiendo el crecimiento de las colonias. Los aislados de *Trichoderma* mostraron un comportamiento heterogéneo en su actividad; uno de ellos logró detener

el crecimiento del fitopatógeno e inhibir la formación de esclerocios. En un aislado *S. rolfsii* creció sobre el micelio. La mayoría de aislados logró inhibir en buen porcentaje el crecimiento micelial de *S. rolfsii* por metabolitos secundarios. Cabe señalar que del 50% de los aislados obtenidos, que, en un principio inhibieron por metabolitos secundarios al fitopatógeno, en la competencia directa algunos no fueron capaces de afectarlo.

Ezziyyani et al. (2004) evaluaron el control biológico de *Trichoderma harzianum* sobre *Phytophthora capsici* en pimiento en tres medios de cultivo. Para *T. harzianum* usaron Agua-Avena-Vermiculita resultando ser el más útil por favorecer rápido y abundante crecimiento, comparado con el crecimiento en Czapek líquido y PDB. El test del antagonismo in vitro de *Phytophthora* por *Trichoderma* en medio PDA, enriquecido con Laminarina-glucosa, mostró que el antagonista aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1,3-glucanasa en el medio ejerciendo una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno (micoparasitismo), ejerciendo reducción y destrucción de la colonia del patógeno. La utilización de *Trichoderma* permitió reducir hasta un 65% los daños causados por *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento.

Suárez et al. (2008) evaluaron el antagonismo *in vitro* de seis aislamientos de *Trichoderma harzianum* ante *Fusarium solani*, aislado de plantas enfermas de maracuyá (*Passiflora edulis*). Utilizando la técnica de cultivo dual en platos Petri con Agar Sabouraud, registraron la competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), empleando un diseño estadístico factorial 2x6x1 con arreglo completamente aleatorio. El experimento demostró que existe variabilidad de comportamiento de los aislados durante la competencia por nutrientes, espacio y micoparasitismo. De igual modo, existió diferencias de susceptibilidad de los aislamientos de *Fusarium*

*solani*. En general se registró inhibición del crecimiento de *Fusarium* utilizándose los aislamientos nativos y comerciales de *T. harzianum*.

Correa et al. (2007) informan que en su estudio de antagonismo de *Trichoderma* sobre *Sclerotium rolfsii* utilizaron medio PDA, además de frascos que contenían granos de arroz humedecidos con agua destilada (60% p/v) y esterilizados a 120°C por 20 min. para reproducir el micelio del antagonista y el patógeno. La incubación se realizó a 25°C y 12 h diarias de luz durante seis días. En vasos de 500 g de capacidad con suelo fertilizado y esterilizado se adicionaron 2.5 g de granos de arroz colonizado por cada hongo (*S. rolfsii* y *Trichoderma*). Seguidamente el suelo se humedeció y sembraron semillas de soya. Todas las cepas inhibieron el crecimiento del hongo patógeno cuando se aislaron en cultivo dual, hasta 44.12%, comparado con el crecimiento del testigo. Las cepas presentaron actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *S. rolfsii* a los 120 h. Las cepas de *Trichoderma* continuaron su crecimiento hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno, sobre el que produjeron esporas.

Rubio y Fereres (2005) informan que la mayoría de las plagas y organismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o enemigos naturales que se pueden emplear como alternativa en un programa de control biológico. El llamado control biológico clásico consiste en la potenciación o utilización de organismos naturales para reducir la población de otro no deseado.

Los mecanismos de protección de los antagonistas son diferentes y variables; un mismo microorganismo puede proteger simultáneamente por varios mecanismos; entre estos mecanismos cabe destacar la capacidad de colonización y forma de inoculación; la competencia en la colonización con los patógenos en el mismo nicho ecológico en la superficie de la planta, la competencia por nutrientes; la producción de

compuestos inhibidores o antibiosis; la fungistasis; el micoparasitismo y la inducción de mecanismos generales de resistencia en las plantas.

1. La **colonización** de una planta por microorganismos solo puede ocurrir por inóculos existentes en su ambiente o bien traídos por el viento, el agua, los animales o el hombre. Se necesita un valor mínimo de inóculo para que la planta pueda ser infectada por un patógeno.
2. La **competencia** surge cuando al menos dos organismos requieren el mismo nutriente o espacio, y el uso por uno reduce la cantidad disponible para el otro. En la competencia por nutrientes uno obtiene más nutrientes y crece, mientras que el otro no los consigue y deja de crecer. Este mecanismo se observa en el uso de las fuentes de carbono y de nitrógeno. Si hay un exceso del nutriente de forma que hay para todos, no hay competencia. En sitios pobres la competencia es por los espacios reducidos donde es posible utilizar el nutriente, no por el espacio total.
3. La **antibiosis** se ejerce por el antagonista perjudicando el crecimiento o la supervivencia del patógeno. Se produce lisis celular debida a enzimas o metabolitos del antagonista, además de antibióticos. Existen antibióticos volátiles y otros productos tóxicos también volátiles capaces de afectar el crecimiento de las células. Los antibióticos son sustancias más estudiadas de antagonismo entre microorganismos.
4. La **fungistasis** consiste en imponer condiciones de inactividad en el organismo afectado, especialmente para las esporas de hongos por limitación en los nutrientes (fuentes de carbono) o acción de sustancias inhibitoras. Los elementos saprótrofos pueden reducir las fuentes de carbono e imponer la fungistasis a las esporas del patógeno impidiendo que germinen y que infecten a las plantas.
5. En el **micoparasitismo**, el antagonismo puede actuar usando al patógeno como fuente de alimento; el micoparásito antagonista es capaz de romper la pared celular del hospedante con quitinasas,

glucanasas o celulasas. Los micoparásitos mejor conocidos son los del género *Trichoderma*. Las hifas de *Trichoderma* parasitan los esclerocios e hifas durante el crecimiento. Los aislados de *Trichoderma* producen diferentes quitinasas y glucanasas en cultivo que degradan los componentes mayoritarios de la pared celular de los hongos patógenos. Los micoparásitos requieren contacto o estar muy próximos al hospedante para que produzca enzimas necesarios para producir la lisis de la pared celular.

Howell (2003) informa sobre los mecanismos empleados por los agentes bio controladores durante el desarrollo de las enfermedades en plantas. Entre ellos se encuentran el **micoparasitismo** y la producción de antibióticos, indicándose que las especies de *Trichoderma* son los microorganismos más eficientes; la competencia general y a nivel de la rizósfera, en *Trichoderma* es importante porque son buenos colonizadores de esta zona; **producción de enzimas de acción general y específica**; **la inducción de respuestas de defensa en las plantas**; **estimulación del metabolismo y de la germinación**; otros **mecanismos adjuntos** se refieren al incremento de la formación de raíces y el crecimiento de tallos, la resistencia a estreses bióticos y abióticos, y cambios en el estado nutricional de las plantas.

Delgado y Arbeláez (1990) evaluaron la actividad antagónica de algunos aislamientos del género *Trichoderma* sobre el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro y en el campo en cultivos de crisantemo y arveja, además de la eficiencia de algunos fungicidas en el control de enfermedades en estos cultivos. Los aislamientos *Trichoderma viride* y *Trichoderma hamatum* se seleccionaron como los mejores antagonistas del patógeno por su mayor inhibición del crecimiento del micelio, sobre la formación de esclerocios y la mayor esporulación sobre el patógeno. Las pruebas de antagonismo in vitro se realizaron utilizando cajas de Petri con PDA en crecimiento dual.



La inhibición del crecimiento micelial del patógeno por 10 aislamientos de *Trichoderma* evaluados, mostró una alta variabilidad. Los antagonistas en general redujeron la formación de los esclerocios del patógeno. Un aislamiento *T. hamatum* presentó una alta tasa de crecimiento y una esporulación abundante respecto a los demás aislamientos, lo que limitó rápidamente el crecimiento del patógeno y ocasionó una buena invasión y colonización del micelio de *S. sclerotiorum*: además permitió una formación muy escasa de esclerocios in vitro.

Mora et al. (2016) indican que *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo importante a nivel mundial que infecta alrededor de 400 especies de plantas incluyendo a frijol y que en el norte de México, este patógeno causa severas pérdidas económica. Informan que el empleo de fungicidas sintéticos es el principal medio de controlar la enfermedad en cultivos agrícolas comerciales, lo cual tiene efectos negativos en el ambiente y en la salud humana; por ello, es necesario el desarrollo de estrategias más amigables con el medio ambiente para el manejo de enfermedades como las causadas por *S. sclerotiorum*. El uso de microorganismos que inducen la resistencia a enfermedades de plantas, tales como los hongos micorrízicos arbusculares, es una alternativa adecuada.

Romero (2014) evaluó la producción de enzimas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas) de *T. asperellum* *T. inhamatum* y su efecto antibiótico sobre el crecimiento de micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*: Determinó que las quitinasas inhibieron el crecimiento de micelio de *F. oxysporum* en 33.6 y 97.4% y de *P. parasítica* en 48 y 98.2%; las glucanasas inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* en 71.7% y 98%; en el caso de *P. parasítica* se inhibió en 47.6 y 98%. Concluye que las quitinasas y glucanasas tienen alto potencial como sustancias inhibidoras sobre *P. parasítica* y *F. oxysporum*.

Guilcapi (2009) investigó el efecto de *T. harzianum* y *T. viride* sobre *Rhizoctonia solani* durante la producción de plantones de *Coffea arabica*, como protección contra la chupadera en almácigos; utilizó dosis altas y

bajas de esporas. Determinó que a la dosis baja de 10 g/l se logró disminuir significativamente la incidencia de chupadera en plántulas de café.

Soto (2005) investigó las cualidades microbiológicas de las cepas *Gliocladium virens* y *T. viride* mediante cultivos in vitro, con la finalidad de promover la preparación masiva de biopreparados líquidos con esporas de estos antagonistas y utilizarlos como biocontroladores en cultivos rentables. Efectuó pruebas contundentes de antagonismo en los hongos *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*.

Astorga (2013) investigó el efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* en el control de *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* sp. y *Pseudomonas marginalis* en el cultivo de ajo (*Allium sativum*). Se determinó su actividad antagónica y efecto inhibitorio utilizando el crecimiento en cultivo dual. La cepa de *B. subtilis* mostró un potencial con valores bajos de inhibición de crecimiento radial de 14.09% ante *S. cepivorum* y 3.32% ante *Penicillium* sp., por lo que se clasifica como un mal biocontrolador. Por su parte, *Trichoderma* presentó un potencial muy alto, con valores de inhibición de 40.21% frente a *S. cepivorum* y de 45.03% ante *Penicillium* sp., lo que indica que es un muy buen controlador. Los resultados apoyan el potencial de las cepas de *Trichoderma* spp., como agentes de control biológico frente a la pudrición causada por *Penicillium* del ajo, la bacteriosis por *P. marginalis* y la pudrición blanca por *S. cepivorum*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. LUGAR DE DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

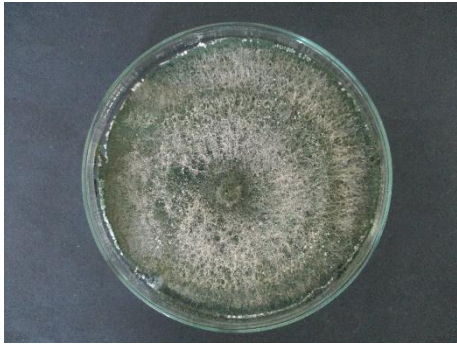
El estudio del antagonismo se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología Agrícola de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ubicado en el distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga - Ayacucho. En condiciones controladas de laboratorio, temperatura de estufa (26°C) y humedad en el interior de las placas de cultivo.

### 2.2. MATERIALES Y EQUIPOS

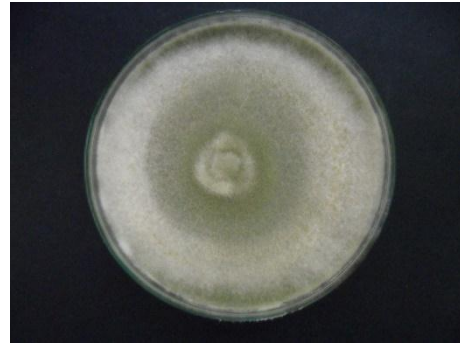
#### 2.2.1. Recursos necesarios.

- **Materiales de laboratorio:** vasos de precipitado, matraces, estufa, refrigeradora, autoclave, placas de Petri, medios de cultivo, agua destilada, mechero, plumones de tinta indeleble, luz blanca de fluorescente.
- **Equipo de laboratorio:** microscopio y esteroscopio, balanzas, cámara fotográfica digital o mecánica, computadora e impresora.
- **Materiales de escritorio:** papel bond 60 y 80 g, lápiz, regla, libreta de notas.
- **Cepas de *Trichoderma*** obtenidas de productos comerciales (TRICHOX H, TRICHOX V).

- **Cepas de *Sclerotinia sclerotiorum*.**



Fot. 2.1. Crecimiento de *T. harzianum* en medio PDA.



Fot. 2.2. Crecimiento de *Trichoderma viride* en medio PDA.

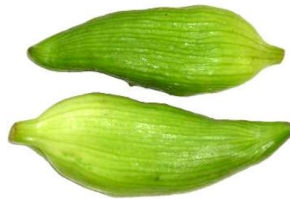


Fot. 2.3. Crecimiento de *T. harzianum* en medio PAApio.



Fot. 2.4. Crecimiento de *T. viride* en medio PACayhua.

- **Especies de vegetales para preparación de medios de cultivo.**



## 2.3. METODOLOGÍA

### 2.3.1. Preparación de medios modificados para cultivo in vitro.

- Medio PAApio:** Hervir 250 g de papa pelada y picada en 300 ml de agua durante 20 min. Se disuelve 18 g de agar en 300 ml de agua hirviendo de manera controlada; agregar la peptona y las sales. Se hierve 80 g de peciolo y hojas de apio en 200 ml de agua durante 15

min. Se mezclan los tres ingredientes, se completa a 1000 ml y se distribuye el contenido en cuatro matraces de 250 ml. y se esteriliza a 115 lb, 110°C durante 30 min. en autoclave.

Papa pelada	250 g
Peciolo con hoja de apio	80 g
Agar	18 g
Peptona	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
Agua destilada	1000 ml

- b. Medio PACayhua:** Hervir 250 g de papa pelada y picada en 300 ml de agua durante 20 min. Se disuelve 18 g de agar en 300 ml de agua hirviendo de manera controlada; agregar la peptona y las sales. Se hierve 260 g de fruto cayhua en 300 ml de agua durante 15 min. Se mezclan los tres ingredientes, se completa a 1000 ml y se distribuye el contenido en cuatro matraces de 250 ml. y se esteriliza a 115 lb, 110°C durante 30 min. en autoclave.

Papa pelada	250 g
Hervido de cayhua	260 g
Agar	18 g
Peptona	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
Agua destilada	1000 ml

- c. Medio PALechuga:** Hervir 250 g de papa pelada y picada en 300 ml de agua durante 20 min. Se disuelve 18 g de agar en 300 ml de agua hirviendo de manera controlada; agregar la peptona y las sales. Se hierve 200 g de hojas de lechuga fresca en 200 ml de agua durante 15 min. Se mezclan los tres ingredientes, se completa a

1000 ml y se distribuye el contenido en cuatro matraces de 250 ml. y se esteriliza a 115 lb, 110°C durante 30 min. en autoclave.

Papa pelada	250 g
Hojas de lechuga	200 g
Agar	18 g
Peptona	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
Agua destilada	1000 ml

### **2.3.2. Selección de hongos antagonistas y del hongo parásito de plantas.**

Sobre la base de experiencias previas, se consideró utilizar las dos especies antagonistas más importantes y de mayor uso en las prácticas de control biológico: *Trichoderma harzianum* y *T. viride*. Se incluyó al parásito *Sclerotinia sclerotiorum* por ser perjudicial importante en hortalizas y ornamentales en la estación de verano en los valles interandinos y en los cultivos de lechuga, papa, oca y mashua en zonas altas. Por ser polífago y de permanencia estable en los suelos es probable que *Trichoderma* pueda resultar una buena alternativa para aplicación a los suelos de cultivo.

### **2.3.3. Aislamiento de *Sclerotinia sclerotiorum*.**

El hongo parásito se aisló de un fruto de *Cucurbita ficifolia* (calabaza) procedente del distrito de Quinua cultivando, en medio PDA, con antibiótico oxitetraciclina, los esclerotes obtenidos de la zona enferma de la calabaza. Se incubó a 26°C durante siete días. Luego del crecimiento fungoso se efectuaron repiques de micelio puro en medio PDA para conservación del inóculo en refrigeración.

### **2.3.4. Proceso de aplicación de la técnica de cultivo dual.**

El desarrollo y expresión del antagonismo se observó durante el crecimiento de las colonias de los antagonistas y del patógeno en

medios modificados de cultivo. La técnica del cultivo dual consistió en una forma de enfrentamiento microbiológico entre el antagonista y el patógeno. Ambos se siembran en la misma placa, uno frente a otro, distanciados 7.5 - 8 cm entre sí, es decir opuestos uno a otro. En este ambiente de cultivo, las condiciones de medio de cultivo, humedad y temperatura fueron las mismas para ambos hongos. En razón a la alta capacidad de crecimiento de *Trichoderma* en sustratos diferentes, por comportarse como un saprófito eficiente, el medio de cultivo ofreció nutrientes que favorecieron el crecimiento de *Sclerotinia*, puesto que este hongo tiene crecimiento lento en comparación a *Trichoderma*, por lo cual se planteó ofrecer una ligera ventaja a *Sclerotinia* a fin de evaluar la capacidad de las dos especies de *Trichoderma* cuando *Sclerotinia* tiene alguna mejor condición para crecer.

#### **2.3.5. Siembra de medios en crecimiento dual.**

Para establecer igualdad de oportunidades a *Sclerotinia* y *Trichoderma*, la siembra de micelios en las placas se efectuó con un trozo de agar de 5 mm de diámetro, que contiene micelio de los hongos (patógeno y antagonista); además se utilizó esporas y esclerocios de los hongos en estudio, porque en el crecimiento micelial manifiestan desventajas y desigualdad de crecimiento de las colonias en los medios.

#### **2.3.6. Conteo de esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* en microscopio.**

- Preparar una suspensión de esporas en agua destilada con 2% de glicerina.
- Colocar con una aguja esterilizada las esporas a la lámina de portaobjetos y cubrir con la lámina cubreobjetos.
- Observar al microscopio con aumento conveniente (40.X) y de acuerdo al campo establecido. Contar las esporas en el campo enfocado.

- Promediar las repeticiones y determinar la cantidad exacta de esporas en el inóculo en este caso 25,000 y 50,000.

### **2.3.7. Inoculación directa de esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* sobre las hifas y esclerotes de *Sclerotinia*.**

Para determinar la capacidad antagónica de *Trichoderma* se procedió a inocular directamente esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* sobre las hifas y esclerotes de *Sclerotinia* en medio PACayhua.

La inoculación sobre hifas de *Sclerotinia* consistió, en brindar ventaja de dos días para crecimiento de *Sclerotinia* a partir de inóculo hifal en la placa, transcurrido dos días después de la siembra se inoculó esporas del antagonista sobre el micelio de *Sclerotinia*. Del mismo modo para inóculo esclerotial, en este caso brindar tres días de ventaja en medio PACayhua.

### **2.3.8. Evaluación del antagonismo in vitro.**

- i. Capacidad de crecimiento de los hongos en los medios propuestos.
- ii. Registro de velocidad de crecimiento de las colonias en cultivo dual.
- iii. Tiempo llenado de la placa con crecimiento fungoso, nivel de crecimiento dual y de crecimiento individual (testigos).
- iv. Expresión estructural y coloración de los micelios (formación de hifas, esporulación y formación de esclerocios).
- v. Diferencias de efecto antagónico entre las dos especies de *Trichoderma*.
- vi. Efecto de la ventaja de crecimiento de los hongos en medio de cultivo.
- vii. Registro fotográfico de las respuestas in vitro.



## 2.4. EVALUACIÓN DESCRIPTIVA Y CUANTITATIVA.

1. Las influencias de los antagonistas sobre *Sclerotinia* se registraron en forma cualitativa mediante descripción de las características de crecimiento y formación de estructuras miceliales, durante el establecimiento de relaciones antagónicas in vitro.
2. La determinación de influencia cuantitativa se efectuó mediante mediciones del crecimiento (cm/día) de las colonias de antagonistas y del patógeno durante el cultivo en medios nutritivos en estufa a temperatura controlada de 26°C, que es favorable para *Sclerotinia* y de utilidad también para *Trichoderma* por su amplio rango de uso de temperaturas.
3. Las diferentes manifestaciones fisiológicas de antagonismo se registraron fotográficamente conforme se expresaron los resultados.
4. Los tratamientos fijados para el presente experimento se evaluaron en tres repeticiones según el siguiente detalle:

### a) Medio PAApio

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T2	<i>Trichoderma viride</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T3	Testigo <i>Trichoderma harzianum</i>
T4	Testigo <i>Trichoderma viride</i>
T5	Testigo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

### b) Medio PACayhua

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T2	<i>Trichoderma viride</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T3	Testigo <i>Trichoderma harzianum</i>
T4	Testigo <i>Trichoderma viride</i>
T5	Testigo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

c) Medio PALechuga

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T2	<i>Trichoderma viride</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T3	Testigo <i>Trichoderma harzianum</i>
T4	Testigo <i>Trichoderma viride</i>
T5	Testigo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

d) Prueba adicional en medio PDA.

Tratamiento	Descripción
T1	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T2	<i>Trichoderma viride</i> + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
T3	Testigo <i>Trichoderma harzianum</i>
T4	Testigo <i>Trichoderma viride</i>
T5	Testigo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

## 2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

**Unidad Experimental:** placa de Petri.

Método de cultivo dual.

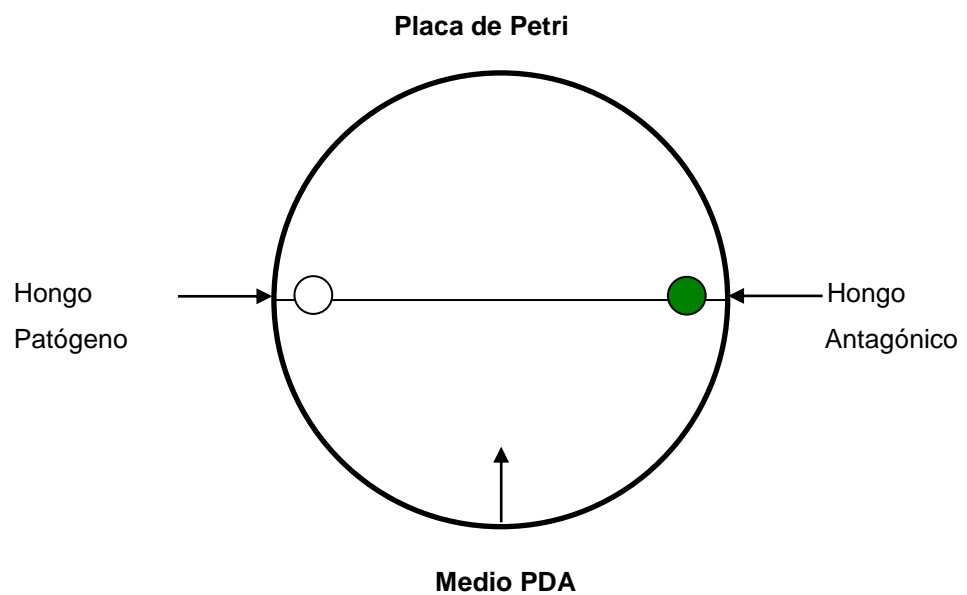


Figura 2.1. Esquema en que se indica la ubicación en la placa de Petri, el trozo de agar con micelio de *Trichoderma* spp. y *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fot. 2.5. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* en medio modificado.



Fot. 2.6. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* en medio modificado.

#### a. **Diseño experimental base**

Se aplicó el Diseño Completamente Randomizado Factorial con dos variables (tres hongos: dos antagonistas y un hongo patógeno, cuatro medios de cultivo; PAApio, PACayhua, PALechuga y PDA), 3 repeticiones por tratamiento y 12 testigos, resultando 48 unidades de observación, para evaluar el crecimiento radial de las colonias. La unidad de observación es la placa de crecimiento fungoso, en los distintos medios y procedimientos. El análisis estadístico se efectuó con el programa SAS y MINTAB 17.

#### b. **Siembra de *Sclerotinia*, inóculo hifal con ventaja en crecimiento dual.**

Para establecer igualdad de oportunidades a *Sclerotinia* y *Trichoderma*, la siembra hifal de *Sclerotinia* se efectuó con un trozo de agar de 5 mm de diámetro, que contiene hifas del hongo patógeno (lado izquierdo de la placa), tres días posteriores a la siembra de *Sclerotinia* se inóculo un trozo de agar de 5 mm de diámetro conteniendo esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, (lado derecho de la placa).

#### c. **Siembra de *Sclerotinia*, inóculo esclerotial con ventaja en crecimiento dual.**

Del mismo modo para establecer igualdad de oportunidades a *Sclerotinia* y *Trichoderma*, la siembra de esclerotes de *Sclerotinia* (lado izquierdo de la placa), cuatro días posteriores a la siembra de

*Sclerotinia* se inóculo (lado derecho de la placa), un trozo de agar de 5 mm de diámetro conteniendo esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*.

**d. Siembra de *Sclerotinia*, inóculo hifal sin ventaja en crecimiento dual.**

Para establecer el antagonismo de *Trichoderma*, se sembró hifas de *Sclerotinia* (lado izquierdo de la placa) con un trozo de agar de 5 mm de diámetro y al mismo tiempo (lado derecho de la placa) se sembró un trozo de agar de 5 mm de diámetro conteniendo esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride*, en los tres medios PAApio, PACayhua y PALechuga.

**e. Siembra de *Sclerotinia*, inóculo esclerotial sin ventaja en crecimiento dual.**

Del mismo modo, se inoculó esclerotes maduros de *Sclerotinia* (lado izquierdo de la placa) y al mismo tiempo un trozo de agar de 5 mm de diámetro conteniendo esporas de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* (lado derecho de la placa), en los tres medios PAApio, PACayhua y PALechuga.

**f. Prueba dual adicional de crecimiento con ventaja para *Sclerotinia*.**

Pruebas previas de crecimiento dual entre *Trichoderma* y hongos fitopatógenos indicó que *Trichoderma* tiene crecimiento muy rápido en medio PDA, mientras que los patógenos lo hacen lentamente; es decir, a priori se le da una amplia ventaja al antagonista, Para remediar esta injusta desventaja, se plantea en el proyecto usar medios donde *Sclerotinia* crece favorablemente y en forma rápida, de manera semejante a como lo hace *Trichoderma* en PDA, además de efectuar la siembra dual de *Sclerotinia* (hifas) y cinco días (esclerote) antes de la siembra del antagonista en la misma placa. Se aplicó el mismo DCR anterior.

- g. Prueba de comprobación de la ventaja a favor de *Trichoderma* que genera el Medio PDA y la desventaja que ocasiona en *Sclerotinia sclerotiorum*.**

El medio PDA favorece bastante bien el crecimiento y esporulación de *Trichoderma harzianum* debido a la presencia de dextrosa en el medio, ante la cual muestra gran actividad biológica. En cambio *Sclerotinia sclerotiorum* no requiere la presencia de dextrosa en el medio, ante la cual crece lentamente y sus esclerocios son escasos, además de que *Sclerotinia* parasita órganos o partes vegetales que no disponen de azúcar libre o asimilable directamente. En razón a este descubrimiento, en la investigación se planteó elaborar medios de cultivo sobre la base de vegetales que son apetecibles para *Sclerotinia*, incluyendo nutrientes (peptona, fosfato monobásico de potasio y sulfato de magnesio heptahidratado) que favorecen ampliamente a *Sclerotinia*, pero no son perjudiciales para *Trichoderma*, o no dificultan su crecimiento y esporulación en el medio de cultivo.

## **2.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA IN VITRO.**

### **2.6.1. Actividad antagónica de *T. harzianum* y *T. viride* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Consistió en medir el crecimiento (cm/día) micelial de las colonias de *Trichoderma* y *Sclerotinia* en cultivo individual y dual en cada unidad experimental, hasta el contacto hifal (cultivo dual). Con y sin ventaja de crecimiento para *Sclerotinia* en los tres medios modificados.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre la base de los objetivos planteados y de los procedimientos aplicados en la presente investigación, se obtuvieron los resultados esperados cumpliéndose la hipótesis planteada del antagonismo de dos especies de *Trichoderma* sobre el patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### **VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE CRECIMIENTO DUAL Y EFECTO DEL MEDIO NUTRITIVO, PREVIO A LA PRUEBA DEFINITIVA DE ANTAGONISMO.**

##### **PRUEBA DE MEDIOS.**

**3.1.** INFLUENCIA DEL MEDIO NUTRITIVO EN LA EXPRESIÓN DE CAPACIDADES DE CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN DE *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma harzianum* y *T. viride*.

**3.1.1.** PRUEBA DE CRECIMIENTO EN MEDIO PDA CON **SIEMBRA HIFAL** DE *Sclerotinia* EN FORMA INDIVIDUAL Y DUAL.

Esta primera parte se orientó a demostrar y comprobar que existe influencia de la dextrosa en el crecimiento de *Sclerotinia*, causándole desventaja cuando crece en el medio PDA, mientras que para *Trichoderma* no representa desventaja, sino que puede crecer en forma indiferente ante su presencia por tener cualidades de saprótrofo (5).

Generalmente, las pruebas frecuentes de antagonismo in vitro consideraron el uso exclusivo de PDA, como medio donde pueden crecer

y reproducirse la mayoría de hongos hemibiótrofos, facultativos y saprófitos. Sin embargo, algunos hongos, sobre todo habitantes de suelo, requieren de nutrientes adicionales en el medio PDA para expresarse de manera satisfactoria, sobre todo cuando se realizan pruebas de antagonismo con *Trichoderma*, puesto que este hongo tiene la habilidad de crecer bien en PDA, (12, 15, 49) y medios similares (17).

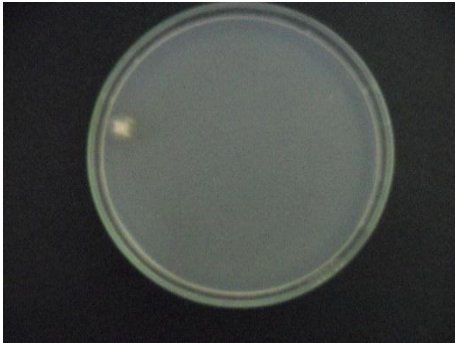
El parásito *Sclerotinia* es un habitante frecuente de suelos que vive en forma de esclerotes, a partir de los cuales realiza la penetración e infección de sus hospedantes Arias et al. (2007), Peluffo (2010), Pérez (2009). Se ha determinado que *Sclerotinia* Howell (2003), requiere de más nutrientes en el medio PDA para crecer y formar esclerotes López (2008). En razón a ello, se realizó una prueba de medios, incluido PDA, para observar las respuestas de crecimiento de *Sclerotinia* que contribuyeran a mejorar el estudio de antagonismo in vitro.

La confirmación de que *Sclerotinia* es un hongo de suelo que requiere de nutrientes adicionales en el medio básico PDA se realizó comparando el crecimiento individual y dual de ambos hongos, antes de efectuar las pruebas definitivas de antagonismo. Para ello se consideró incluir los dos tipos de inóculo de *Sclerotinia*: hifas y esclerotes.

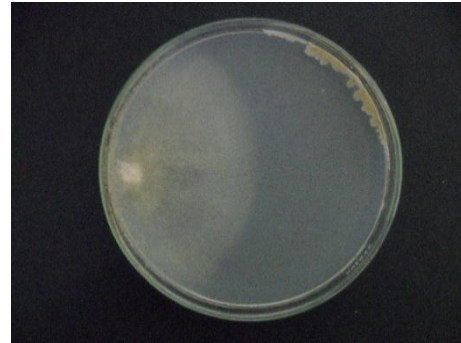
La prueba inicial con **PDA e inóculo hifal**, en siembras individuales y duales, informó que la presencia de dextrosa en el medio PDA tiene efecto retardador del crecimiento de hifas y formación de esclerotes en *Sclerotinia*; esta respuesta se consideró como una desventaja para *Sclerotinia* ante las especies de *Trichoderma* puesto que el azúcar dextrosa es de gran aceptación por *Trichoderma* permitiéndole crecer rápido y esporular fácilmente (12, 15, 49), sin embargo la exclusión de la dextrosa del medio de cultivo no afectó a las especies de *Trichoderma*.

Esta desventaja para *Sclerotinia* se eliminó posteriormente, excluyendo la dextrosa, antes de efectuar las pruebas de antagonismo a fin de brindarle

mejores condiciones de crecimiento y observar una influencia más real de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*.



Fot. 3.01. Crecimiento individual **hifal** de *Sclerotinia* en medio PDA a 3 días de la siembra hifal.



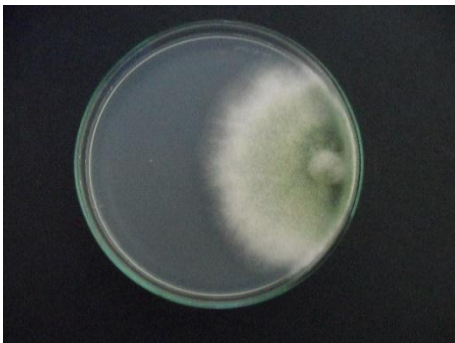
Fot. 3.02. Crecimiento individual **hifal** de *Sclerotinia* en medio PDA a 7 días de la siembra hifal.



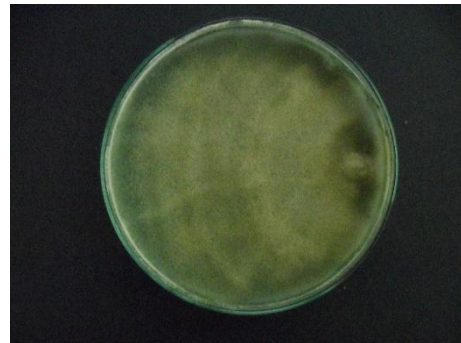
Fot. 3.03. Crecimiento individual de *T. harzianum* en medio PDA a 3 días de la siembra hifal.



Fot. 3.04. Crecimiento individual de *T. harzianum* en medio PDA a 7 días de la siembra hifal.



Fot. 3.05. Crecimiento individual de *T. viride* en medio PDA a 3 días de la siembra hifal.



Fot. 3.06. Crecimiento individual de *T. viride* en medio PDA a 7 días de la siembra hifal.

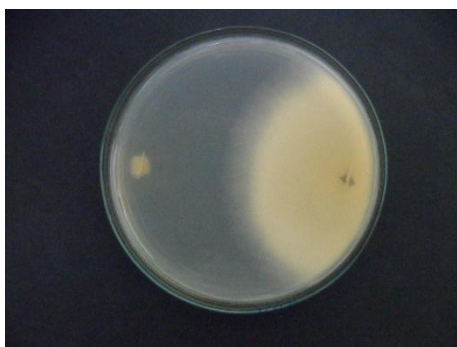




Fot. 3.07. Crecimiento dual de *Sclerotinia* y *T. harzianum* en medio PDA a 3 días de la siembra hifal.



Fot. 3.08. Crecimiento dual de *Sclerotinia* y *T. harzianum* en medio PDA a 7 días de la siembra hifal.



Fot. 3.09. Crecimiento dual de *Sclerotinia* y *T. viride* medio PDA a 3 días de la siembra hifal.



Fot. 3.10. Crecimiento dual de *Sclerotinia* y *T. viride* en medio PDA a 7 días de la siembra hifal.

En estos resultados puede observarse la facilidad de crecimiento que expresan los aislamientos de *Trichoderma* ante la dificultad que manifiesta *Sclerotinia* en el medio PDA tradicional. A los tres días de la inoculación ambos *Trichoderma* superaron entre 6 y 7 veces el crecimiento de *Sclerotinia*. A los siete días de la siembra, *Sclerotinia* alcanzó solo 45% de crecimiento, cubriendo la mitad de la placa, mientras que los dos *Trichoderma* alcanzaron el 100% de crecimiento cubriendo toda la superficie de las placas y con abundante esporulación.

La interacción de ambos hongos (patógeno y antagonista), que comprueban las características del crecimiento individual, se estableció en la siembra dual en el medio PDA. Los crecimientos correspondientes, que se muestran en las fotografías 3.08 y 3.10, evidencian la facilidad otorgada para los *Trichoderma* y la dificultad generada para *Sclerotinia*.

De este modo, resultó evidente que el medio PDA no favorece, o muy poco, el crecimiento de *Sclerotinia* (se hace lento). Esta prueba se efectuó con la finalidad de demostrar que el medio PDA no permite competir en iguales condiciones a *Sclerotinia* ante *Trichoderma*.

Las mediciones de crecimiento de las colonias en forma individual o en cultivo dual (en parejas) permitieron analizar las diferencias de su tamaño durante siete días. El cálculo estadístico se muestra en el cuadro 3.1; las representaciones cuantitativas en los gráficos 3.1. y 3.2.

Esta evaluación se efectuó como complemento matemático para afirmar la influencia desventajosa del medio PDA en el crecimiento de *Sclerotinia* ante los *Trichoderma* antagonistas.

Cuadro 3.1. Análisis de variabilidad del crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio PDA.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Crecimiento individual	2	20.48	10.24	9.61	4.10	7.56	**
Crecimiento dual	3	112.30	37.43	35.12	3.71	6.55	**
<i>Trichoderma</i>	3	7.30	2.43	2.28	3.71	6.55	NS
<i>Sclerotinia</i>	2	32.24	16.12	15.12	4.10	7.56	**
Error	10	10.66	1.07				
Total	20	182.97					

C.V. = 1.81%

El análisis de la variabilidad de crecimiento de las colonias reveló que en ambos *Trichoderma*, el tamaño de las colonias producidas en el medio PDA supera ampliamente al tamaño logrado por *Sclerotinia* en el mismo tiempo (gráfico 3.1: Th: 8.0 cm, Tv: 8.0 cm, Ss: 4.8 cm), esta situación se debe a que la presencia de la dextrosa en el medio es favorable para *Trichoderma* y ligeramente para *Sclerotinia* (12, 15, 49). Del mismo modo el tamaño de las colonias de ambos hongos en crecimiento dual en el medio PDA, indicó que los *Trichoderma* (7.55 y 6.10 cm) tuvieron un

tamaño muy superior al de *Sclerotinia* (1.0 y 0.60 cm) registrados en el gráfico 3.1, de igual modo, la ventaja considerable para *Trichoderma* con la presencia de la dextrosa y la desventaja doble para *Sclerotinia* (presencia de dextrosa y la actividad antagónica de los *Trichoderma*) ocasionaron un desarrollo muy bajo de su colonia. Por otra parte, se determinó que los dos *Trichoderma* tuvieron un crecimiento semejante (no significativo) en el medio PDA, promediando crecimiento individual y crecimiento dual gráfico 3.1, (Th: 7.78 cm, Tv: 7.05 cm); esto indica que para ambos *Trichoderma* la presencia de dextrosa es igualmente favorable, como fue observado en otros ensayos Correa et al. (2007), Delgado y Arbeláez (1990).

En cuanto a *Sclerotinia*, se determinó diferencias estadísticas altamente significativas en el crecimiento de las colonias, debido a que en forma individual crece lo suficiente (4.8 cm), que cuando crece en condición dual las colonias se reducen de manera importante (Ss-Tv, 1.0 cm; Ss-TH, 0.6 cm). En este caso la explicación también se sustenta en la presencia de dextrosa y en la actividad antagónica ejercida.

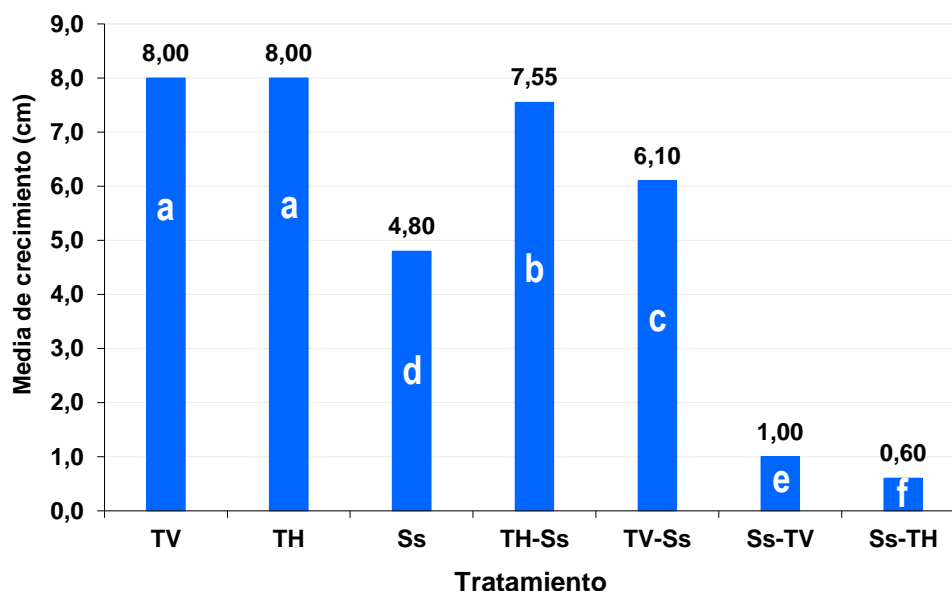


Gráfico 3.1. Prueba de Tukey para el crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio PDA.

- TV : *Trichoderma viride*.  
 TH : *Trichoderma harzianum*.  
 Ss : *Sclerotinia sclerotiorum*.  
 TH-Ss : *T. harzianum* – *Sclerotinia*.  
 TV-Ss : *T. viride* – *Sclerotinia*.  
 Ss-TV : *Sclerotinia* – *T. harzianum*.  
 Ss-TH : *Sclerotinia* – *T. viride*.

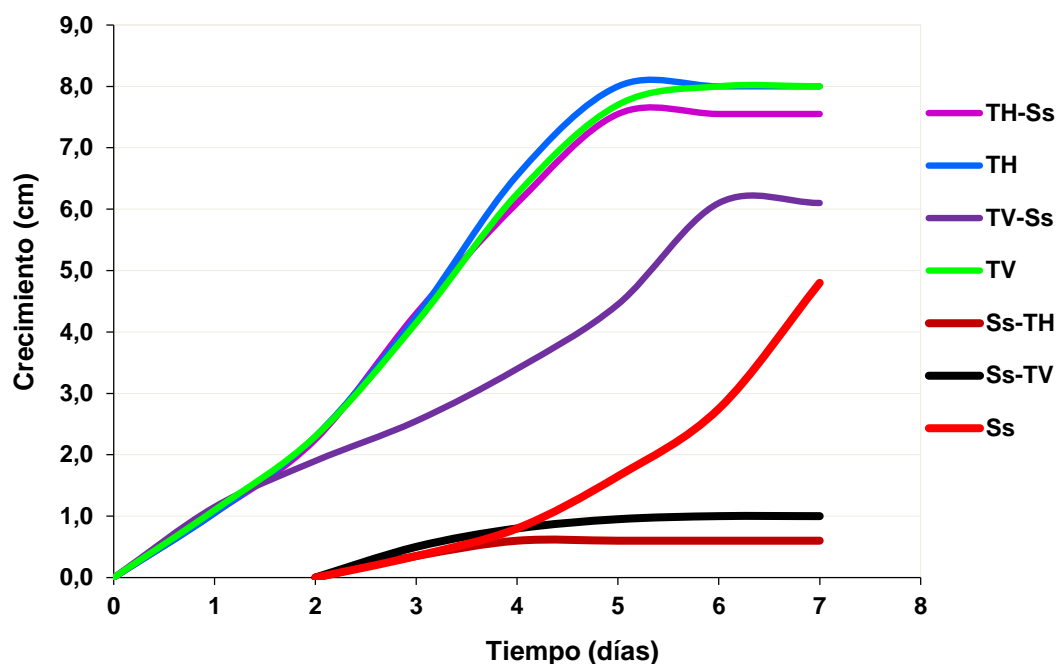


Gráfico 3.2. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio PDA.

El gráfico 3.2 muestra la tendencia y velocidad del desarrollo de las colonias en cultivo individual y dual de los tres hongos en evaluación para confirmar la influencia del medio PDA y de la actividad antagónica de los *Trichoderma*. En la parte inferior (Ss-Tv y Ss-Th) se observa la evidencia más drástica de la influencia de PDA sumada a la actividad de los *Trichoderma* en el crecimiento de *Sclerotinia*.

### 3.1.2. PRUEBA DE CRECIMIENTO CON INCLUSIÓN DE VENTAJA PARA *Sclerotinia* EN MEDIO PDA CON SIEMBRA DE ESCLEROTES DE *Sclerotinia*, EN CULTIVO DUAL.

Las pruebas previas de crecimiento de *Sclerotinia* en medio PDA indicaron que el uso de hifas o esclerotes ofrecía semejante comportamiento de crecimiento de la colonia, además de que el crecimiento de los *Trichoderma* es mucho más rápido que el de *Sclerotinia*. Esto sugirió probar un tiempo de ventaja de crecimiento en *Sclerotinia* antes de enfrentarlo a los *Trichoderma* en el mismo medio, debido a la influencia retardante del medio PDA sobre *Sclerotinia*.

Esta prueba sirvió para definir la influencia de la dextrosa en el crecimiento de *Sclerotinia*, esta vez usando esclerotes y otorgando ventaja de crecimiento individual de 5 días, antes de sembrar ambos *Trichoderma*.

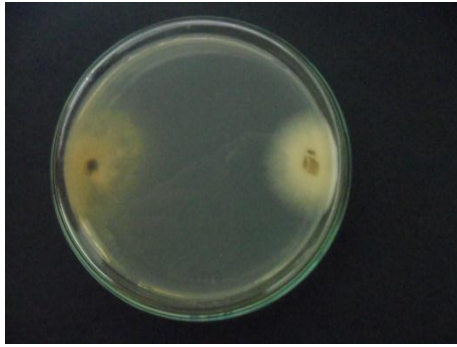
En las fotografías 3.11 y 3.13 se observa el gran retraso de crecimiento de *Sclerotinia* a 6 días de la siembra, ocupando el 5% de la superficie del medio acompañado de *T. harzianum* que tiene un día de crecimiento; con *T. viride* se obtiene mejor crecimiento (12.5% de la superficie). En esta relación *T. harzianum* ha ocupado el 22% de la superficie de la placa y *T. viride* el 12.5%.



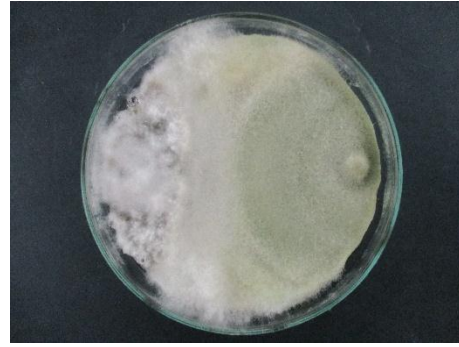
Fot. 3.11. Crecimiento de *Sclerotinia* a 6 días de la siembra y *T. harzianum* a 1 día en PDA.



Fot. 3.12. Crecimiento de *Sclerotinia* a 14 días de la siembra y *T. harzianum* a 9 días, en PDA.



Fot. 3.13. Crecimiento de *Sclerotinia* a 6 días de la siembra y *T. viride* a 1 día, en medio PDA.



Fot. 3.14. Crecimiento de *Sclerotinia* a 14 días de la siembra y *T. viride* a 9 días, en medio PDA.

A los 14 días de instalada la prueba, se observa en las placas (fotografías 3.12 y 3.14) el gran crecimiento de ambos *Trichoderma* en el medio PDA, aún ante la amplia ventaja de tiempo que se le dio a *Sclerotinia*. Parece ser que el rápido crecimiento de *T. harzianum* limitó con mayor intensidad el crecimiento de *Sclerotinia*, mientras que el menor crecimiento de *T. viride* permitió que *Sclerotinia* lograra un mayor crecimiento. En este crecimiento dual no solo se perjudicó el crecimiento hifal de *Sclerotinia* sino también la producción de esclerotes, aun cuando transcurrieron 14 días. Este comportamiento de *Trichoderma* en medio PDA también fue observado por Ezziyyani et al. (2004), Torres y Guerrero (2008), Delgado y Arbeláez (1990).

Esta prueba nos brinda una evidencia más acerca de la influencia importante de la dextrosa para los *Trichoderma* y de la dificultad que ocasiona en el crecimiento de *Sclerotinia*.

El análisis de la variabilidad del crecimiento de los tres hongos en crecimiento individual y dual, mediante siembra esclerotial para *Sclerotinia* y esporas para los *Trichoderma*, se muestra en el cuadro 3.2, el cual nos revela la existencia de diferencias estadísticas altamente significativas en las causas de variación del crecimiento.

Cuadro 3.2. Análisis de variabilidad del crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio PDA.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Crecimiento individual	2	25.21	12.60	6.87	4.10	7.56	*
Crecimiento dual	3	44.33	14.78	8.05	3.71	6.55	**
<i>Trichoderma</i>	3	21.02	7.01	3.82	3.71	6.55	*
<i>Sclerotinia</i>	2	16.81	8.40	4.58	4.10	7.56	*
Error	10	18.35	1.835				
Total	20	125.70					

C.V. = 0.83%

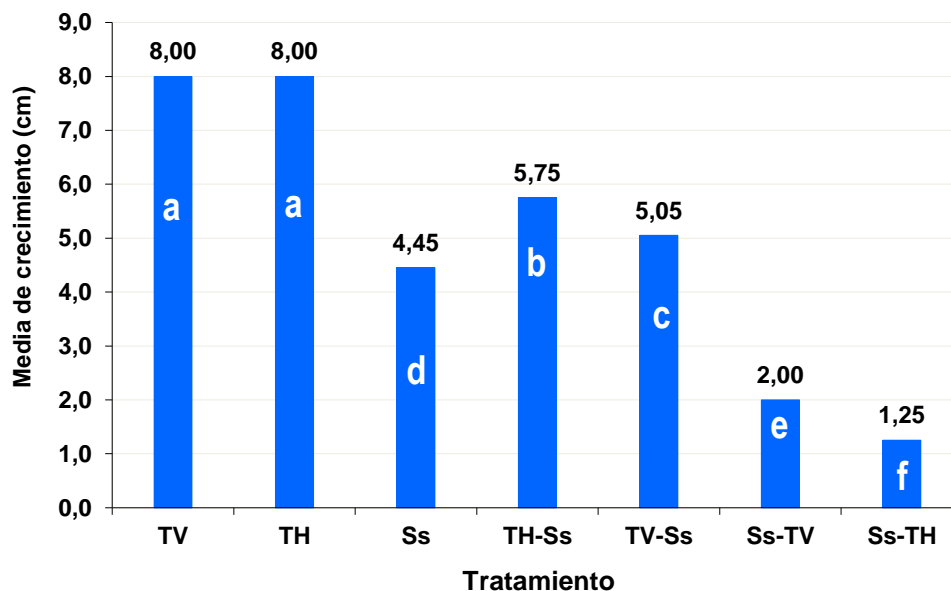


Gráfico 3.3. Prueba de Tukey para el crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio PDA.

- TV : *Trichoderma viride*.
- TH : *Trichoderma harzianum*.
- Ss : *Sclerotinia sclerotiorum*.
- TH-Ss : *T. harzianum* – *Sclerotinia*.
- TV-Ss : *T. viride* – *Sclerotinia*.
- Ss-TV : *Sclerotinia* – *T. harzianum*.
- Ss-TH : *Sclerotinia* – *T. viride*.

Debido a que no existen diferencias importantes en el uso de hifas o esclerotes en el crecimiento de las colonias, las explicaciones de estos resultados son las mismas que para la siembra hifal, con la diferencia de que esta vez se registró diferencias significativas en el crecimiento de los *Trichoderma* (disminuyeron: Th: 6.8 cm; Tv: 6.5 cm), lo cual puede deberse a la influencia de una nueva condición (ventaja de tiempo para *Sclerotinia*) de crecimiento (gráfico 3.3), además de alguna mejora en el crecimiento de las colonias de *Sclerotinia* en cultivo dual (Ss-Tv: 2.00 cm; Ss-Th: 1.25 cm).

En el gráfico 3.4 se observa un evidente cambio de las tendencias de crecimiento de las colonias en medio PDA, en relación a la siembra hifal; sin embargo esto puede explicarse por las nuevas condiciones de crecimiento para los tres hongos (siembra con ventaja para *Sclerotinia*) y que no necesariamente el inóculo esclerote influyó de manera diferente, puesto se comporta de manera semejante con el inóculo hifal.

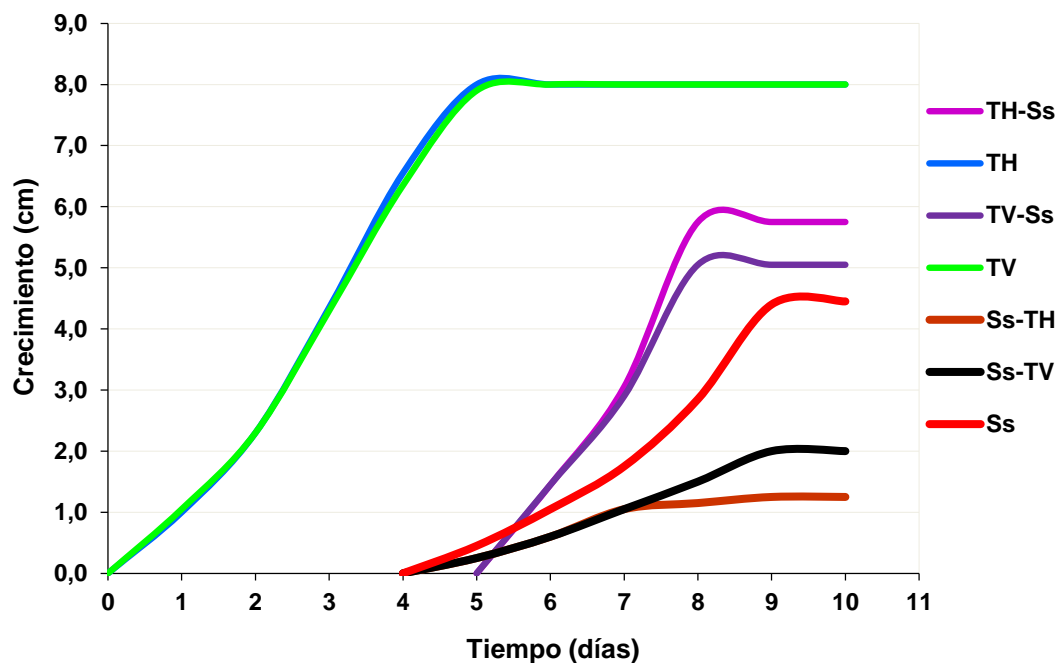


Gráfico 3.4. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio PDA.



### 3.1.3. MEJORAMIENTO DE MEDIOS, PREVIO A LA PRUEBA DE ANTAGONISMO.

#### 3.1.3.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL MEDIO PAPA - AGAR CON INFUSIONES DE APIO, CAYHUA, LECHUGA Y NUTRIENTES ADICIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROTES.

Con la finalidad de obtener suficiente cantidad de esclerotes de *Sclerotinia sclerotiorum* para las pruebas de antagonismo y con la idea de no incluir la dextrosa, se utilizaron nuevos medios para producir estas estructuras y observar además la calidad del crecimiento de *Sclerotinia*, usándose los beneficios de las hortalizas, además de la peptona y nutrientes minerales, tal como lo sugiere French (1985), Dhingra y Sinclair (2003), Curvelo y Rojas (2010), Martínez (2008).

Las pruebas preliminares de medios para evaluar a *Sclerotinia* dieron a conocer que las hortalizas apio, cayhua y lechuga facilitaban su crecimiento y la formación de esclerotes, debido a su amplio rango de hospedantes que afecta Pérez et al. (2009); Ramos (2014), utilizándose sus infusiones e incorporándolas al medio PA (caldo de papa, agar), para agregar sales de fosfato monobásico y sulfato de magnesio y peptona. Estos medios constituyeron los ingredientes de los medios nutritivos definitivos para las pruebas duales de antagonismo.

La prueba de hortalizas en medio modificado determinó que **la infusión de cayhua facilita mejor la formación de esclerotes y de mayor tamaño** (fotografía 3.15, centro) con micelio más denso; en lechuga (derecha) se vio crecimiento rápido pero micelio ralo, con esclerotes pequeños y buen número; en apio (izquierda) el crecimiento es rápido, pero más lenta la producción de esclerotes en menor número y de menor tamaño.

Esta prueba indicó que la ausencia de la dextrosa y la inclusión de la cayhua permitieron una mejor expresión de crecimiento y formación de

esclerotes. Un aspecto importante de la prueba de este medio indicó que no existen diferencias importantes entre el inóculo (**hifal o esclerotial**) en el crecimiento de la colonia y en la producción de esclerotes (fotografía 3.15). En esta prueba, resultó diferente el tamaño de los esclerotes producidos por los dos tipos de inóculo. Con **inóculo hifal** los esclerotes son de mayor tamaño y menor número; con **inóculo esclerotial** se obtuvo más esclerotes, pero de menor tamaño.

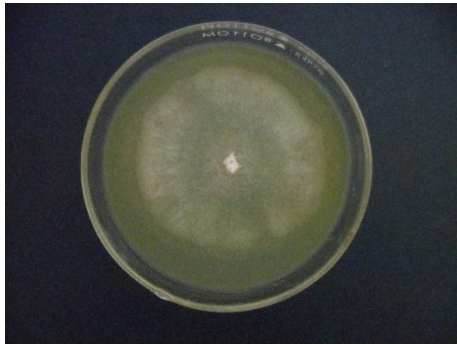


Fot. 3.15. Producción de esclerotes de *Sclerotinia* con inóculo hifal en medio PAApio (Izquierda), PACayhua (Centro) y PALechuga (Derecha) después de 15 días.

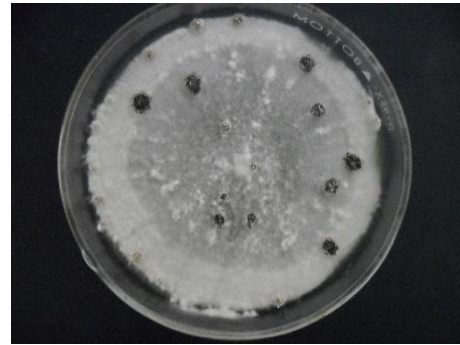
### 3.1.3.2. UTILIDAD DEL MEDIO PDA MEZCLADO CON EXTRACTO DE CAYHUA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESCLEROTES.

Durante la búsqueda del mejor sustrato para producir esclerotes para las pruebas siguientes de crecimiento dual para antagonismo, se consideró probar el medio PDA mezclado con extracto de cayhua, considerando que la cayhua es una buena hortaliza para el crecimiento de *Sclerotinia*, como se descubrió en la prueba anterior (ítem 3.1.3.1.). Esta prueba adicional confirmó que la dextrosa retrasa el crecimiento de *Sclerotinia*, pero la presencia de cayhua en el medio favorece bien la formación de esclerotes; en este caso lo importante es que **los esclerotes son de mayor tamaño que cuando no se utiliza la dextrosa**. En el medio modificado con cayhua se forman los esclerotes a partir de 5 días, mientras que el medio PDA con cayhua, se forman a los 9 días; existe **una evidente precocidad de formación de estructuras cuando se extrae la dextrosa**; pero al mismo tiempo la **dextrosa favorece un mayor tamaño de esclerotes** (fotografías 3.17 y 3.19) en el medio con cayhua.

De acuerdo a este resultado, es probable que la cayhua esté aportando algunos nutrientes de buena calidad para que *Sclerotinia* tolere la presencia de la dextrosa e incluso sea de ayuda para obtenerse esclerotes de mayor tamaño.



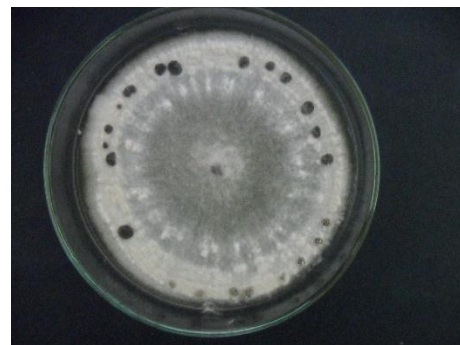
Fot. 3.16. Crecimiento de *Sclerotinia* con inóculo hifal en PDA-Cayhua a 6 días de la siembra.



Fot. 3.17. Producción de esclerotes con inóculo hifal en PDA-Cayhua a 10 días de la siembra.



Fot. 3.18. Crecimiento de *Sclerotinia* con inóculo de esclerote en PDA-Cayhua a 6 días de la siembra.



Fot. 3.19. Producción de esclerotes con inóculo de esclerote en PDA-Cayhua a 10 días de la siembra.

Si comparamos la efectividad del tipo de inóculo en la formación de esclerotes, en el medio PDACayhua, podemos indicar que la siembra con esclerotes produce mayor cantidad de nuevos esclerotes (fotografía 3.19) y de mayor tamaño, y que cuando se utilizan hifas sucede lo contrario.

Este comportamiento de *Sclerotinia* constituyó otro motivo para incluir a los esclerotes en las pruebas de antagonismo, porque generalmente el hongo sobrevive en el suelo como esclerotes y no como hifas.

**a. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Sclerotinia sclerotiorum*.**

Se comprobó las características de la especie *Sclerotinia sclerotiorum* a partir de caracteres morfológicos de esclerocios producidos en los medios de cultivo. *S. sclerotiorum* produjo esclerocios irregulares con un diámetro entre 2 - 12 mm, de consistencia dura, con una orientación y posición hacia los extremos de la placa, en el centro de la colonia una conformación radial (fotografía 3.19). Color de micelio, blanco el cual se torna blanco grisáceo al avanzar la edad de cultivo. Según Sotomayor (2011) *S. sclerotiorum* produce hifas de color blanco, esclerocios de consistencia dura, irregulares y tamaño que varía entre 2 a 10 mm.

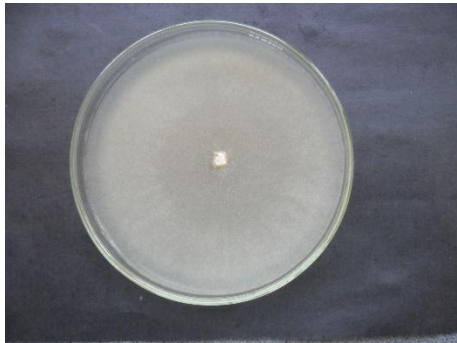
**3.1.3.3. CRECIMIENTO DE LA COLONIA Y PRODUCCIÓN DE ESCLEROTES DE *Sclerotinia sclerotiorum* EN TRES MEDIOS MODIFICADOS, MEDIANTE SIEMBRAS CON INÓCULO HIFAL Y ESCLEROTES.**

**3.1.3.3.1. SIEMBRA HIFAL EN TRES MEDIOS MODIFICADOS.**

Las pruebas iniciales de medios revelaron que la inclusión de vegetales en el medio tiene influencia significativa en el crecimiento y reproducción de *Sclerotinia* (ítem 3.1.3.1 y 3.1.3.2), pero al mismo tiempo se descubrió que la variación del medio PDA (exclusión de dextrosa) no perjudica ni limita el crecimiento ni la esporulación de las dos especies de *Trichoderma* que se utilizaron como antagonistas.

Una vez probada la dificultad que ocasiona la dextrosa en la velocidad de crecimiento de *Sclerotinia*, se incluyeron tres hortalizas para mezclarse por separado con los ingredientes papa y agar. Se incluyó, además, la peptona (aporte de proteínas y aminoácidos), el fosfato monobásico de potasio y el sulfato de magnesio heptahidratado, porque *Sclerotinia* es un hongo habitante de suelo y requiere estos nutrientes en el medio (14). La nueva propuesta de medios consideró en la técnica el uso de infusiones

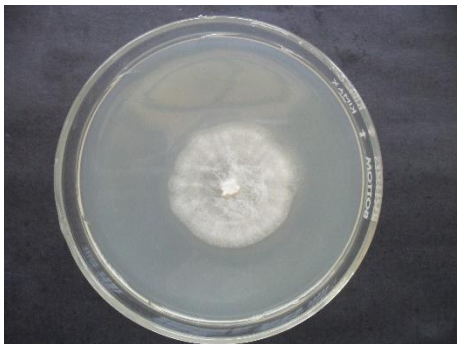
de apio, cayhua y lechuga por ser susceptibles y parasitadas normalmente en los campos de cultivo por *Sclerotinia* (36).



Fot. 3.20. Crecimiento a placa llena de *Sclerotinia* en medio PAApio a 4 días de la siembra hifal.



Fot. 3.21. Producción de esclerotes de *Sclerotinia* en medio PAApio a 8 días de la siembra hifal.



Fot. 3.22. 17% de crecimiento de *Sclerotinia* en medio PACayhua a 4 días de la siembra.



Fot. 3.23. Producción de esclerotes de *Sclerotinia* en medio PACayhua a 8 días de la siembra.



Fot. 3.24. Crecimiento a placa llena de *Sclerotinia* en medio PALechuga a 4 días de la siembra.



Fot. 3.25. Producción de esclerotes de *Sclerotinia* en medio PALechuga a 8 días de la siembra.

Otro aspecto evaluado, previo a la prueba definitiva de antagonismo, consistió en conocer la influencia de la forma de inóculo de *Sclerotinia* en

el crecimiento del micelio y la formación de esclerotes. Se sembraron **trozos de agar con micelio procedente de medio modificado con cayhua**. El inóculo se instaló en el centro de la placa. Después de 4 días de incubación a 26°C, el inóculo hifal creció favorablemente en los tres medios, pero con mayor velocidad en los medios con lechuga y apio (fotografías 3.24 y 3.20); con cayhua fue lento el crecimiento de la colonia (fotografía 3.22). Aun cuando existe diferencia de crecimiento de la colonia, a los 8 días la producción de esclerotes fue satisfactoria en los tres medios; en este caso el medio con cayhua se igualó en crecimiento hasta los 8 días, lo cual confirma la mejor utilidad nutricional de la cayhua en relación a lechuga y apio.

Lo más significativo de esta prueba es que los medios nuevos favorecieron en forma rápida y efectiva la formación de esclerotes, trabajo que fue notable en el medio con cayhua, a pesar de su lento crecimiento inicial. Los otros dos medios (lechuga y apio) también formaron esclerotes, pero con mayor lentitud y de menor tamaño.

Para confirmar la influencia de los medios, como parte de los objetivos de la presente investigación, se graficaron las tendencias del crecimiento individual de las colonias de *Sclerotinia* en los cuatro medios en prueba. Las mediciones de crecimiento diametral de las colonias revelaron la influencia retardante del medio PDA, que ya fue comentado anteriormente. Los nuevos medios muestran una influencia altamente significativa en el crecimiento de las colonias de *Sclerotinia*, con ligeras ventajas no significativas para los medios con apio y lechuga.

Por estas respuestas es que se optó por mejorar las condiciones de crecimiento para *Sclerotinia* cuando se tenga que someterlo a la severa prueba de antagonismo que ejerce *Trichoderma* ante muchos patógenos, brindando alguna posibilidad de igualdad de condiciones durante las pruebas.

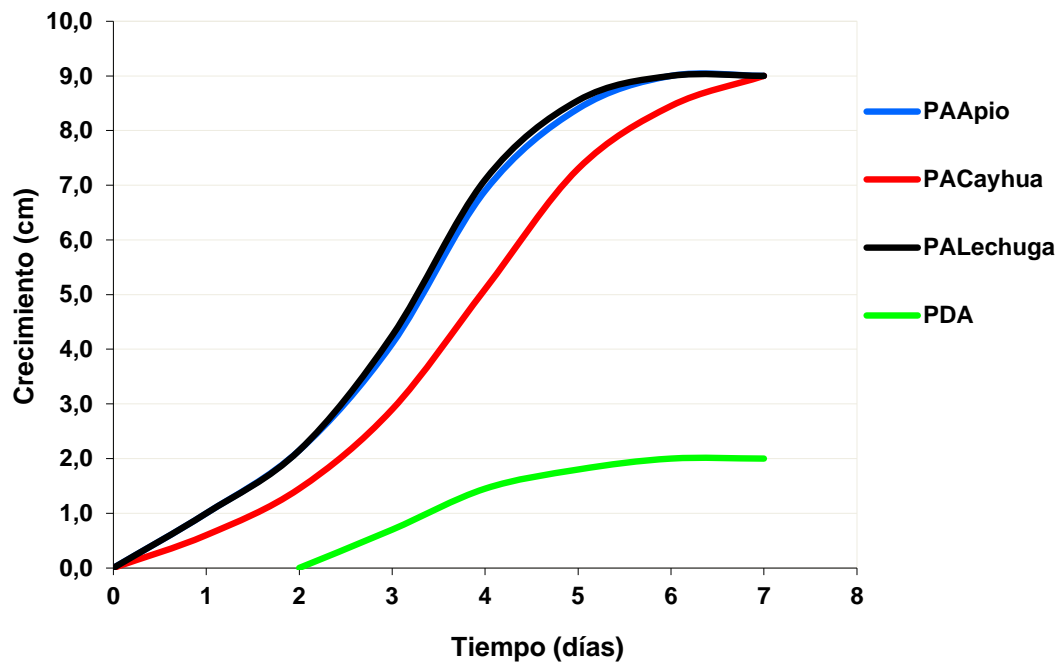


Gráfico 3.5. Tendencia de crecimiento de las colonias de *S. sclerotiorum* con inóculo hifal en medios modificados y PDA.

### 3.1.3.3.2. SIEMBRA CON ESCLEROTES EN TRES MEDIOS MODIFICADOS.

De igual modo como en la siembra hifal, se procedió a probar los esclerotes como inóculo en todas las pruebas. En primer lugar, se estableció que **el estado de madurez del esclerote** es importante en la formación de la colonia del hongo en el medio. Los esclerotes recién formados en el medio PDA con extracto de cayhua no facilitan el crecimiento en un nuevo cultivo, mientras que los **esclerotes maduros con dos semanas de edad** permiten un buen y rápido crecimiento de micelio en los medios de cultivo.

La prueba de crecimiento con esclerotes maduros, sembrados al centro de la placa evidenció su utilidad, de igual modo que con la siembra de hifas. Las pruebas indicaron que no existen diferencias en usar micelio puro o esclerotes maduros para obtener crecimiento satisfactorio de las colonias de *Sclerotinia* y producción de esclerotes nuevos. La **diferencia entre micelio y esclerote** es que con esclerotes se demora de 3 a 4 días

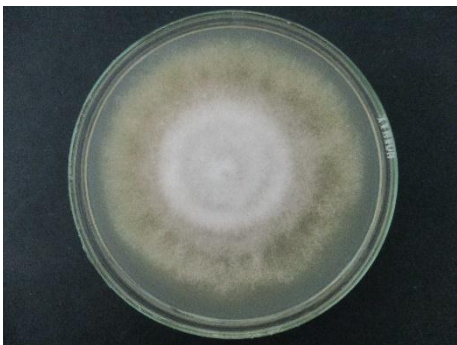
en aparecer las primeras hifas en los tres medios modificados, mientras que la siembra hifal comienza a producir las primeras hifas al día siguiente. Sin embargo, en el medio PALechuga el crecimiento a partir del esclerote es más rápido en relación a los medios PAApio y PACayhua.



Fot. 3.26. Crecimiento de *Sclerotinia* en medio PAApio a 7 días de la siembra.



Fot. 3.27. Crecimiento de *Sclerotinia* en medio PAApio a 11 días de la siembra.



Fot. 3.28. Crecimiento de *Sclerotinia* en medio PACayhua a 7 días de la siembra.



Fot. 3.29. Crecimiento de *Sclerotinia* en medio PACayhua a 11 días de la siembra.



Fot. 3.30. Crecimiento de *Sclerotinia* en medio PALechuga a 7 días de la siembra.



Fot. 3.31. Crecimiento de *Sclerotinia* en medio PALechuga a 11 días de la siembra.



Como se observa en las (fotografías 3.26, 3.28 y 3.30), las diferencias entre lechuga comparada con cayhua y apio son importantes en el crecimiento. Cuando en lechuga se cubre el 100% de la placa, en cayhua y apio se alcanzan entre 70 y 95%. Esta característica puede significar que cuando se use lechuga en el medio durante la prueba dual de antagonismo, *Sclerotinia* tendrá cierta ventaja de crecimiento que cuando se usan cayhua y apio; esto puede indicar que ambos *Trichoderma* ejercerán menos efectos represivos sobre *Sclerotinia*. Esta expresión también será de utilidad cuando se realice las pruebas con ventaja para *Sclerotinia*.

Otra diferencia entre el inóculo hifal y esclerotial se observó en la formación de esclerotes. La siembra con hifas permitió formar mayor número de esclerotes y de mayor tamaño relativo, mientras que con la siembra de esclerotes se mejora el crecimiento de la colonia pero los esclerotes se forman lentamente, en menor número y de menor tamaño.

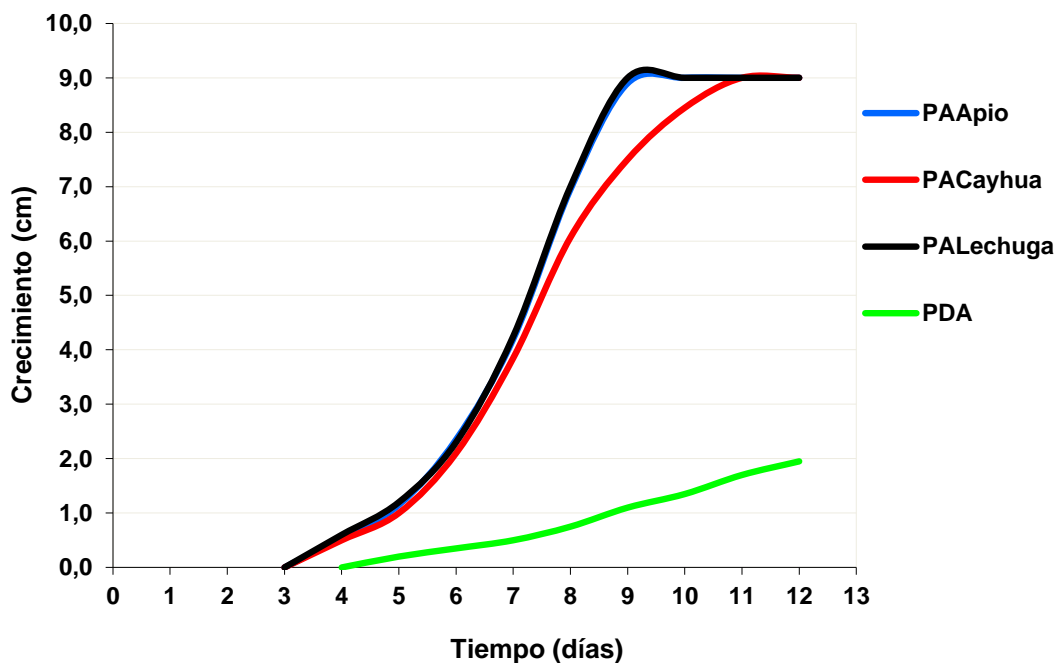


Gráfico 3.6. Tendencia de crecimiento de las colonias de *S. Sclerotiorum* con inóculo esclerotial en medios modificados y PDA.

En la siembra con esclerotes, las tendencias del crecimiento individual de las colonias de *Sclerotinia* en los cuatro medios en prueba fueron semejantes a las que se obtuvieron en la siembra hifal. Sin embargo, el llenado de la placa con las hifas fue algo más lento, pero de igual modo se confirma una influencia altamente significativa en el crecimiento de las colonias de *Sclerotinia*, y siempre con ligeras ventajas no significativas para los medios con apio y lechuga en relación al medio con cayhua. Estas respuestas de crecimiento, con siembra de esclerotes confirmó una vez más la necesidad de incluirlos como inóculo para las pruebas de antagonismo y, de igual modo, brindando posibilidades de igualdad de condiciones para el patógeno y los antagonistas durante las pruebas.

### **3.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO.**

#### **3.2.1. EFECTO DE LA SIEMBRA DUAL HIFAL EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma* CON VENTAJA DE TIEMPO DE CRECIMIENTO PARA *Sclerotinia*.**

Como se indicó en párrafos anteriores, las pruebas de **antagonismo del tipo supresivo** por parte de las dos especies de *Trichoderma*, y ante las pruebas previas de descarte del medio PDA y el mejoramiento de los medios de crecimiento a favor de *Sclerotinia*, permitió establecer la **modalidad de siembra dual con ventaja de tiempo para *Sclerotinia*** a fin de conocer la real capacidad supresiva de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*.

Se evidenció en todos los medios que la **ventaja de 3 días** de crecimiento, concedida a *Sclerotinia*, permitió a este patógeno oponer resistencia ante el avance de ambos *Trichoderma*. En el medio PAApio en efecto opositor fue más notable para *T. harzianum* que para *T. viride*, mientras que en los medios PACayhua y PALechuga la resistencia de *Sclerotinia* fue menor.

En otras investigaciones, ninguna de ellas consideró la posibilidad de ofrecer cierta ventaja al patógeno para observar o medir el efecto de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*. Delgado y Arbeláez (1990), probaron *T. viride* y *T. hamatum* sobre *Sclerotinia* en crecimiento dual en PDA, sembrando los hongos al mismo tiempo, logrando de este modo una gran inhibición del crecimiento y producción de esclerotes de *Sclerotinia*, como lo comprobamos en este ensayo. De igual modo, Martínez (2008) obtuvo semejantes resultados con *T. koningii* y *T. harzianum*.

Se determinó que es efectiva la **siembra hifal**, con 3 días de ventaja a favor de *Sclerotinia*, al permitir que el hongo avance en su crecimiento antes de la llegada de *Trichoderma*. En este caso, la presencia de *T. viride* tiene mayor efecto antagónico que *T. harzianum*. El inconveniente de esta ventaja se produjo cuando el medio con apio permitió que *Sclerotinia* crezca demasiado rápido cubriendo casi la mitad del medio al momento de inocular *Trichoderma*. Esta situación provocó que el antagonista limitara su crecimiento de manera importante por la menor superficie de crecimiento disponible; es decir, no se observó de manera contundente el efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*, como ocurre cuando no se siembra con ventaja, incluso *Sclerotinia* llegó a causar efecto retardador sobre *Trichoderma*.

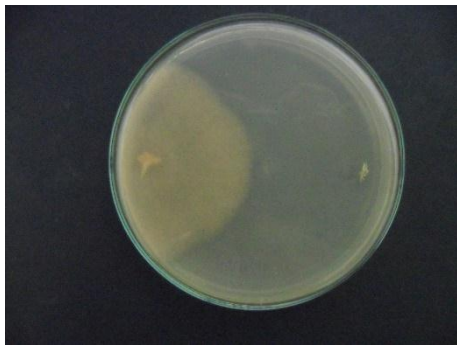
Un aspecto notable de esta **prueba con ventaja** es que la presencia de ambos *Trichoderma* indujo a *Sclerotinia* a crecer más rápido en todos los medios e incluso a formar esclerotes con mayor velocidad.

Esta prueba confirma la utilidad del cambio de medios, la anulación de la dextrosa, la inclusión de nutrientes K, PO<sub>4</sub>, Mg y SO<sub>4</sub> y peptona que favorecieron a *Sclerotinia*, pero sin perjudicar de manera importante a ambos *Trichoderma*.

En relación al cambio de medios, se observó que en el medio PDA, *T. harzianum* llena la placa a los 3 días de la siembra, mientras que en los medios modificados lo hace a los 4 días; según este resultado, parecer

ser que la ausencia de la dextrosa o azúcar en el medio retrasa en un día el crecimiento del hongo antagonista. En el caso de *T. viride* también se registró retraso en el crecimiento con mayor efecto en la velocidad, porque la placa se llena a los 4 días.

Como se indicó en párrafos anteriores, las pruebas de **antagonismo del tipo supresivo** por parte de las dos especies de *Trichoderma*, y ante las pruebas previas de descarte del medio PDA y el mejoramiento de los medios de crecimiento a favor de *Sclerotinia*, permitió establecer la modalidad de siembra dual con ventaja de tiempo para *Sclerotinia* a fin de conocer la real capacidad supresiva de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*.



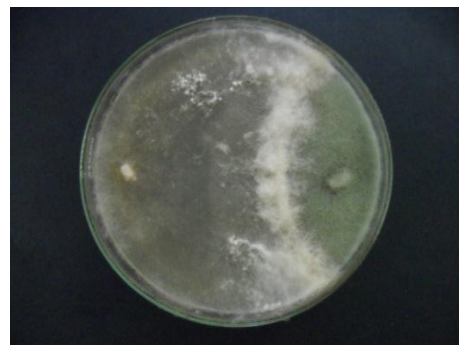
Fot. 3.32. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y siembra de *T. harzianum*, PAApio.



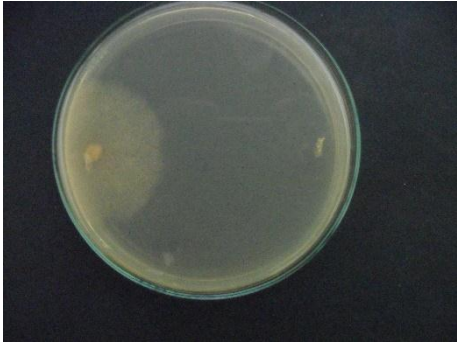
Fot. 3.33. Crecimiento de *Sclerotinia* a 10 días de la siembra y *T. harzianum* a 7 días en PAApio.



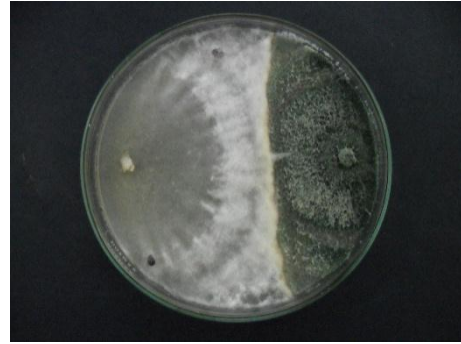
Fot. 3.34. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y siembra de *T. viride* en medio PAApio.



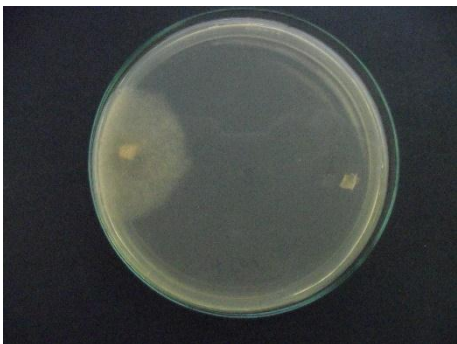
Fot. 3.35. Crecimiento de *Sclerotinia* a 10 días de la siembra y *T. viride* a 7 días en medio PAApio.



Fot. 3.36. Crecimiento de *S. s.* a 3 días de la siembra y siembra de *T. harzianum* en medio PACayhua.



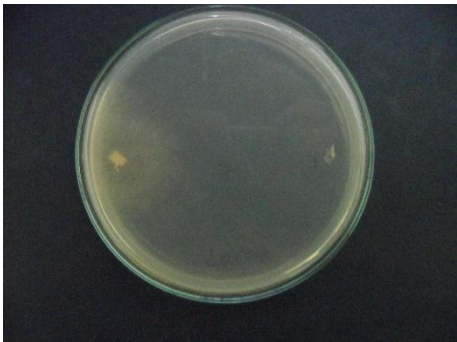
Fot. 3.37. Crecimiento de *Sclerotinia* a 10 días de la siembra y *T. harzianum* a 7 días, PACayhua.



Fot. 3.38. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y siembra de *T. viride* en medio PACayhua.



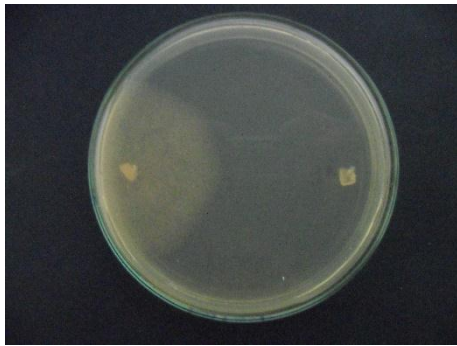
Fot. 3.39. Crecimiento de *Sclerotinia* a 10 días de la siembra y *T. viride* a 7 días en PACayhua.



Fot. 3.40. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y siembra de *T. harzianum* en medio PALechuga.



Fot. 3.41. Crecimiento de *Sclerotinia* a 10 días de la siembra y *T. harzianum* a 7 días en PALechuga.



Fot. 3.42. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y siembra de *T. viride* en medio PALechuga.



Fot. 3.43. Crecimiento de *Sclerotinia* a 10 días de la siembra y *T. viride* a 7 en medio PALechuga.

En el caso del medio con lechuga, la siembra con ventaja también produjo semejante comportamiento de *Sclerotinia*, limitando significativamente el crecimiento de ambas especies de *Trichoderma*.

En el medio con cayhua, *Sclerotinia* tuvo menor crecimiento, permitiendo que las especies de *Trichoderma* pudieran crecer mejor en el espacio disponible, pero de todos modos la acción de los antagonistas se frenó o se limitó de manera importante.

Un aspecto adicional importante de la siembra con ventaja es el hecho de que el efecto antagónico mediado por sustancias tóxicas, parece no tener efecto importante sobre *Sclerotinia*, puesto que la ventaja permitió al parásito crecer más rápido cuando llegaron los antagonistas al medio. Es decir, es evidente que *Sclerotinia* se estimuló ante la presencia de las especies de *Trichoderma*, e incluso permitiéndole iniciar la formación de esclerotes tempranamente a los 6 días de la siembra.

Sobre esta tecnología de la ventaja para el parásito, no se encontraron referencias semejantes ni a nivel nacional ni internacional, por lo que nuestra propuesta es la primera como aporte de tecnología para evaluar los procesos antagónicos entre microorganismos.

Cuadro 3.3. Análisis de variabilidad del crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Medios	2	0.07	0.03	5.73	3.22	5.16	**
Crecimiento individual	2	0.08	0.04	7.20	3.22	5.16	**
Crecimiento dual	3	92.24	30.75	5418.36	2.83	4.29	**
<i>Trichoderma</i> dual	1	0.01	0.01	2.45	4.07	7.29	NS
<i>Sclerotinia</i> dual	1	0.07	0.07	11.85	4.07	7.29	**
Error	42	0.24	0.006				
Total	62	383.63					

C.V. = 1.37%

Con la finalidad de diferenciar matemáticamente los crecimientos de las colonias en crecimiento dual, se efectuó el análisis de la variabilidad del crecimiento radial que se registraron durante las pruebas de antagonismo.

El análisis estadístico (cuadro 3.3) reveló que el crecimiento de las colonias de los hongos en estudio fue diferentes en los tres medios, es decir los tres medios propuestos ofrecieron diversas cualidades para que en las pruebas duales y crecimientos individuales las colonias tuvieran tamaños diferentes, pero probablemente existan algunas particularidades entre los medios, que se analizarán posteriormente.

Como se explicó anteriormente, la ventaja concedida a *Sclerotinia* permitió registrar diferencias estadísticas altamente significativas, entre los crecimientos radiales en placa, a favor de *Sclerotinia*. Además de la ventaja, los tres medios ofrecieron la calidad nutritiva necesaria a *Sclerotinia* para frenar a los *Trichoderma*, con ligera superioridad en el medio PAApio; de acuerdo a este resultado, *Sclerotinia* pudo aprovechar la oferta de los medios ante una ventaja no esperada por los *Trichoderma*.

Es importante indicar que, de acuerdo a lo señalado anteriormente, los medios fueron favorables para el crecimiento de los tres hongos, en razón de lo cual se encontraron diferencias significativas en menor grado entre los diámetros promedios de las colonias de los tres hongos.

En cuanto a la utilidad de los tres medios sobre el crecimiento de los *Trichoderma*, se determinó diferencias no significativas entre la influencia de estos medios en el diámetro de su colonias. En el gráfico 3.7 se evidencia estadísticamente la mejor influencia de los medios PAApio y PALechuga en el desarrollo de las colonias, en relación al medio PACayhua.

De igual modo, y de manera inversa, los medios también influyeron significativamente en el crecimiento de *Sclerotinia*; el gráfico 3.7 muestra que en *Sclerotinia* fue más importante el medio PAApio en relación a PALechuga y PACayhua, situación que resultó contraria en el caso de los *Trichoderma*.

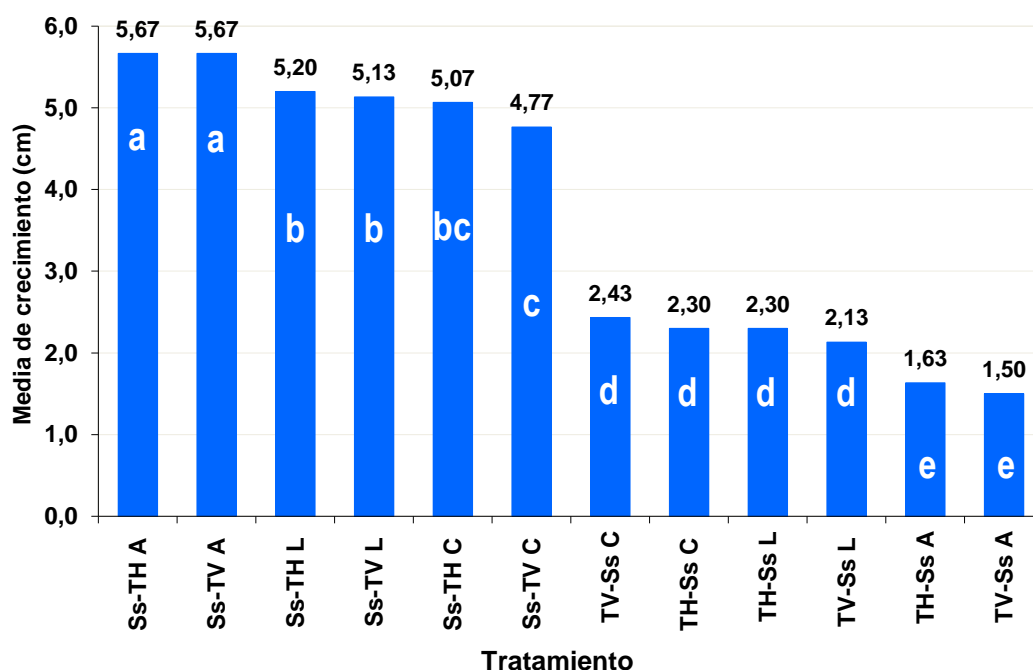


Gráfico 3.7. Prueba de Tukey para el crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.



Ss.TH.A.	:	<i>Sclerotinia</i> – <i>T. harzianum</i> – Apio.
Ss.TV.A.	:	<i>Sclerotinia</i> – <i>T. viride</i> – Apio.
Ss.TH.L.	:	<i>Sclerotinia</i> – <i>T. harzianum</i> – Lechuga.
Ss.TV.L.	:	<i>Sclerotinia</i> – <i>T. viride</i> – Lechuga.
Ss.TH.C.	:	<i>Sclerotinia</i> – <i>T. harzianum</i> – Cayhua.
Ss.TV.C.	:	<i>Sclerotinia</i> – <i>T. viride</i> – Cayhua.
TV.Ss.C.	:	<i>T. viride</i> – <i>Sclerotinia</i> – Cayhua.
TH.Ss.C.	:	<i>T. harzianum</i> – <i>Sclerotinia</i> – Cayhua.
TH.Ss.L.	:	<i>T. harzianum</i> – <i>Sclerotinia</i> – Lechuga
TV.Ss.L.	:	<i>T. viride</i> – <i>Sclerotinia</i> – Lechuga.
TH.Ss.A.	:	<i>T. harzianum</i> – <i>Sclerotinia</i> – Apio.
TV.Ss.A.	:	<i>T. viride</i> – <i>Sclerotinia</i> – Apio.

**a) Cultivo dual hifal en medio PAApio.**

En el gráfico 3.8 se muestra en forma separada las tendencias de crecimiento radial de las colonias en cultivo individual y cultivo dual en medio PAApio, dándole ventaja de tiempo a *Sclerotinia*. Se observa que en crecimiento individual el medio favoreció bien a *Sclerotinia* y *T. harzianum*, como se esperaba. Pero al mismo tiempo, en crecimiento dual con ventaja para *Sclerotinia*, el efecto antagónico de *T. harzianum* se ve significativamente disminuido al no crecer bien (1.63 cm), en tanto que el crecimiento de *Sclerotinia* se favoreció de manera importante (5.67 cm). Este resultado pone en tela de juicio la gran capacidad antagónica establecida para *T. harzianum* en algunas investigaciones por su gran producción de metabolitos que interfieren con parásitos; (4, 15, 16, 21, 28, 40).

En el caso de *T. viride*, en cultivo dual con medio PAApio (gráfico 3.9), se observa una respuesta semejante a lo que ocurrió con *T. harzianum*.; la tendencia del desarrollo de las colonias es muy parecida, así como el efecto de la ventaja otorgada a *Sclerotinia* sobre *T. viride*. La única ligera diferencia se observa en que *T. viride* expresó crecimiento más lento que *T. harzianum*, lo cual es una característica propia de ambos *Trichoderma*.

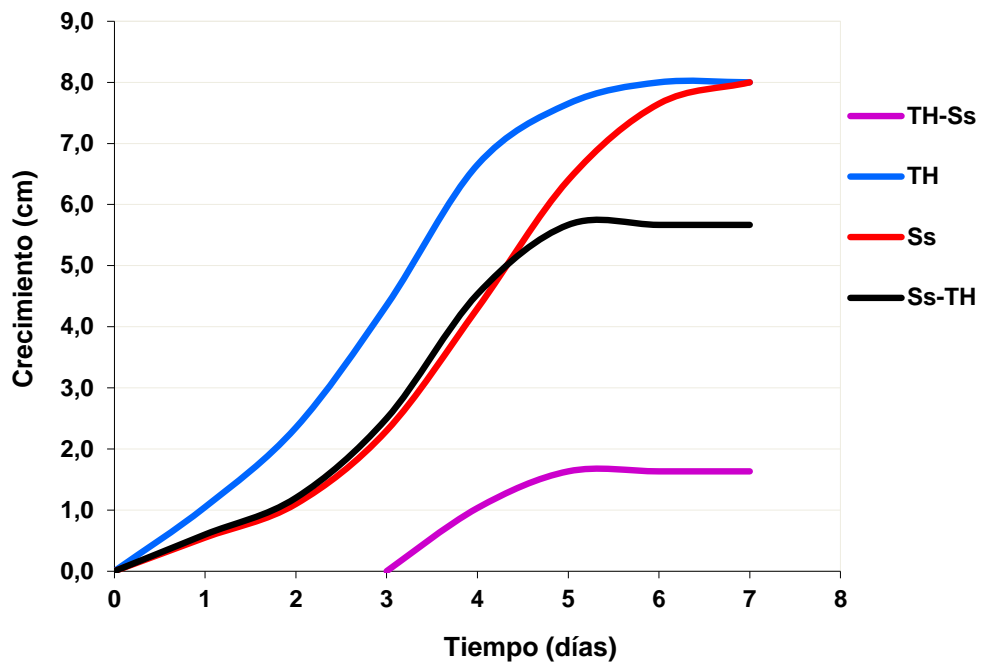


Gráfico 3.8. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

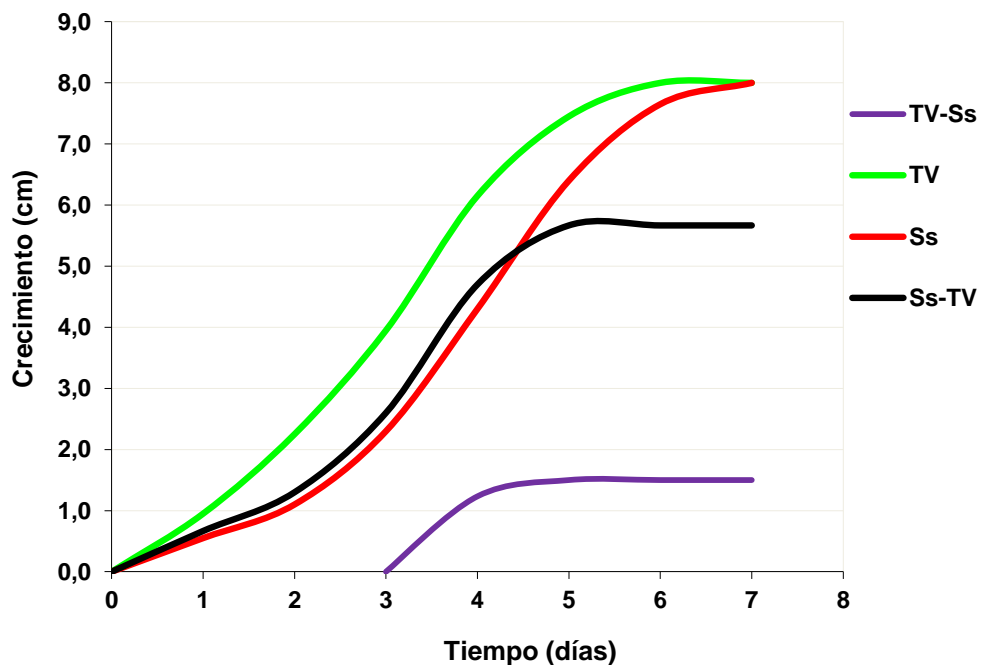


Gráfico 3.9. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

**b) Cultivo dual hifal en medio PACayhua.**

En el gráfico 3.10 podemos observar que la inclusión de cayhua en el medio fue algo más favorable para *T. harzianum*. En crecimiento dual con ventaja para *Sclerotinia*, el efecto antagónico de *T. harzianum* también se ve significativamente disminuido al crecer poco (2.30 cm), en tanto que el crecimiento de *Sclerotinia* no fue muy afectado como se esperaba pues creció bastante (5.20 cm). En este medio también se comprueba que la alta capacidad antagónica establecida para *T. harzianum* puede verse contrarrestada por algunas condiciones que favorecen al patógeno (ventaja de tiempo para crecer), como se explicó para el caso del medio PAApio; (4, 15, 21, 28, 40).

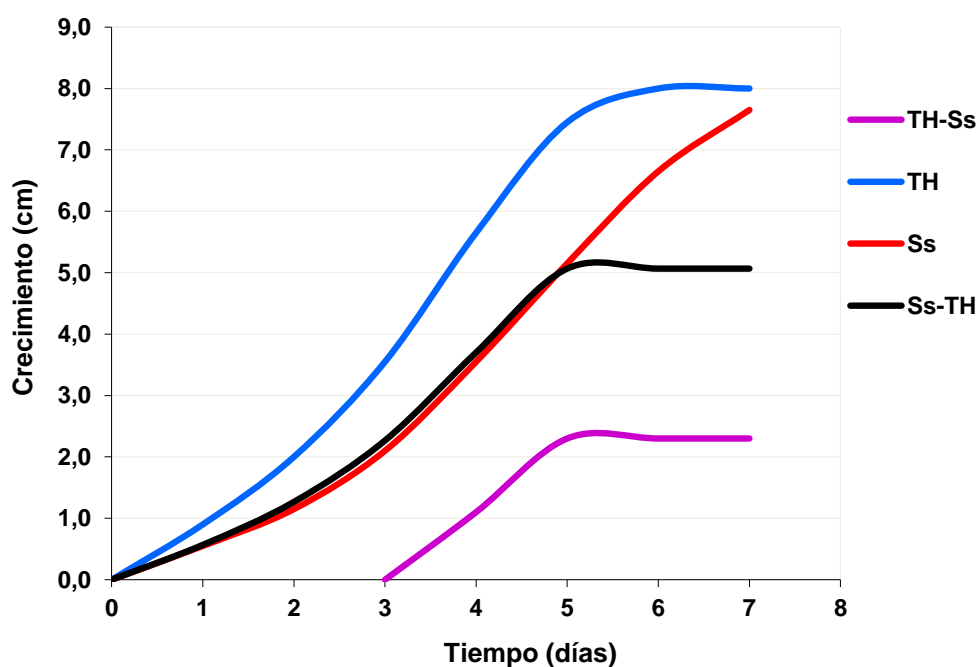


Gráfico 3.10. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

En el gráfico 3.11 podemos observar que la inclusión de cayhua en el medio de igual modo no interfirió en el crecimiento individual de *T. viride*. En crecimiento dual con ventaja para *Sclerotinia*, el efecto antagónico de

*T. viride* disminuyó significativamente, creciendo poco (2.43 cm), en relación al crecimiento de *Sclerotinia* que también disminuyó (4.77 cm). En este otro medio se comprueba así mismo que la buena capacidad antagónica establecida para *T. viride* puede verse contrarrestada cuando en cierto modo el patógeno ha logrado una ventaja de crecimiento, aspecto que es similar para el medio PAApio. Sobre uso de ventaja de tiempo para el patógeno en medio con apio, no se encontró referencias comparativas.

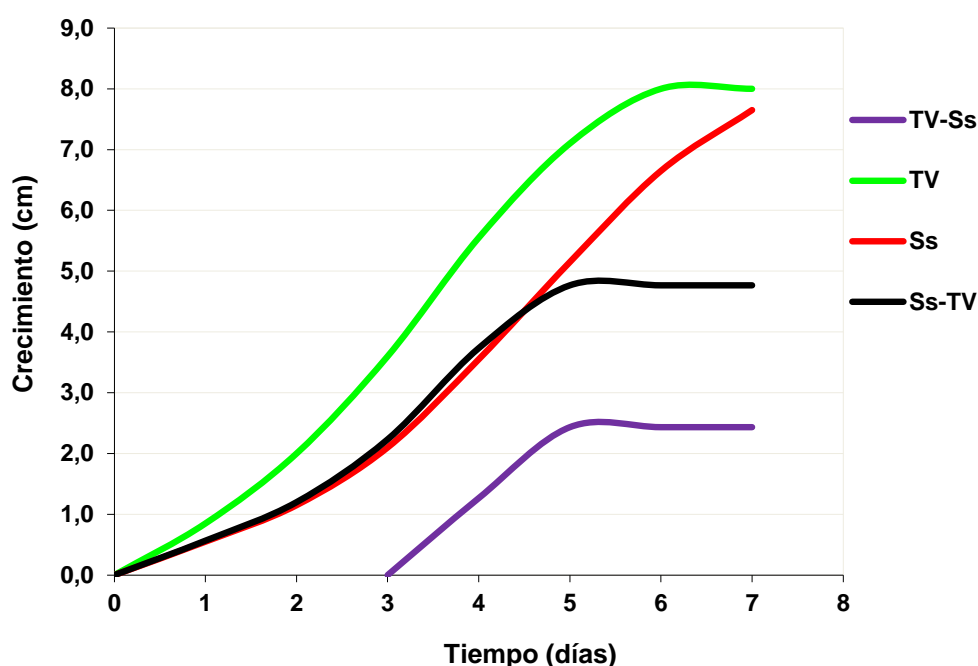


Gráfico 3.11. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

**c) Cultivo dual hifal en medio PALechuga.**

En el gráfico 3.12 puede observarse que el crecimiento de los hongos en medio PALechuga siguió una tendencia similar a lo acontecido con PACayhua, es decir no interfiere con el crecimiento individual de *T. harzianum*, pero al mismo tiempo favorece a *Sclerotinia*. De igual manera, en el crecimiento dual con ventaja para *Sclerotinia*, el efecto antagónico de *T. harzianum* fue ligeramente superior a *T. viride*, aspecto que se

observó en todas las pruebas; su crecimiento alcanzó 2.30 cm, en relación al crecimiento de *Sclerotinia* que mejoró a 5.20 cm. En este otro medio también es evidente que la ventaja de crecimiento para *Sclerotinia*, limitó el crecimiento de *T. harzianum*, es decir la actividad antagónica se ve otra vez contrarrestada. De igual modo, sobre el uso de ventaja de tiempo para el patógeno en medio con lechuga no se encontró referencias comparativas.

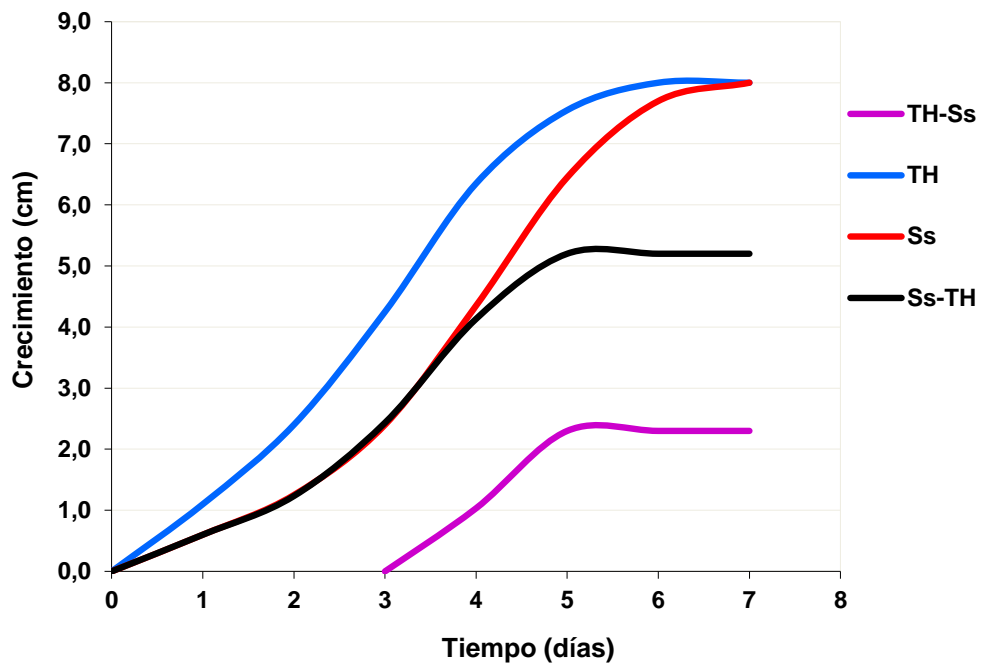


Gráfico 3.12. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAlechuga.

En el gráfico 3.13 se observa tendencias de crecimiento similares a lo ocurrido con *T. harzianum*; del mismo modo, el medio PAlechuga no interfiere con el crecimiento individual de *T. viride*, pero al mismo tiempo favorece a *Sclerotinia*. De igual manera, en el crecimiento dual con ventaja para *Sclerotinia*, el efecto antagónico de *T. viride* fue ligeramente menor a *T. harzianum*, con un crecimiento radial promedio de 2.13 cm, en relación al crecimiento de *Sclerotinia* que alcanzó a 5.20 cm hasta los 5 días de incubación. En este medio PAlechuga también es evidente que la

ventaja de crecimiento para *Sclerotinia*, limita el crecimiento de *T. viride* de manera significativa en relación al crecimiento individual, es decir la actividad antagonista se ve otra vez contrarrestada.

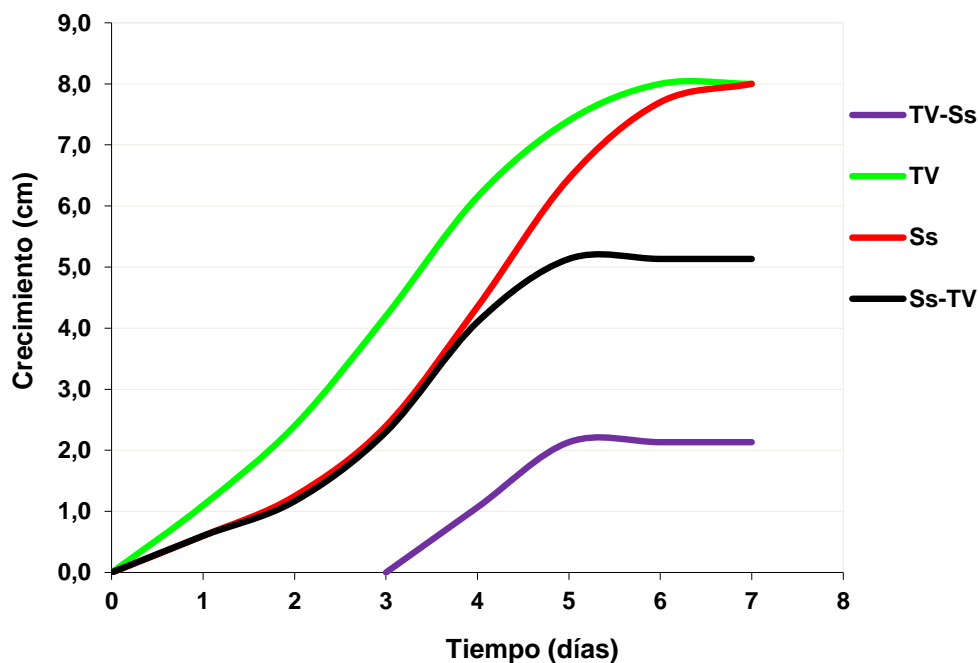


Gráfico 3.13. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PALechuga.

### 3.2.2. EFECTO DE LA SIEMBRA DUAL **ESCLEROTIAL** EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma*, **CON VENTAJA DE TIEMPO DE CRECIMIENTO PARA *Sclerotinia***.

En las pruebas iniciales se consideró incluir a los esclerotes porque la forma más habitual de existencia de *Sclerotinia* en el suelo es a través de sus estructuras de conservación y al mismo tiempo es el principal inóculo disponible para las infecciones. Además, si se plantea efectuar el control biológico de *Sclerotinia* mediante antagonistas, éstos tendrán que anular la actividad de los esclerotes y no sus estructuras hifales, porque en el suelo el hongo no vive como hifas.

Por estas consideraciones se realizó una segunda prueba de antagonismo en **siembra dual con ventaja usando esclerotes maduros**. Anteriormente, se comprobó que no existían diferencias importantes en usar hifas o esclerotes en las pruebas porque con ambos inóculos se obtenían crecimientos coloniales semejantes. En este caso, la ventaja concedida a los esclerotes fue de 4 días, como se determinó en pruebas anteriores.

A diferencia del inóculo hifal, los esclerotes de *Sclerotinia* mostraron mayor variabilidad de comportamiento en los medios ante la presencia de ambos *Trichoderma*. Su crecimiento se retardó más en los medios PAApio y PACayhua, y un poco más rápido en el medio PALechuga. Sin embargo, de igual modo que en la siembra hifal, la siembra con ventaja confirió a *Sclerotinia* la capacidad para frenar el crecimiento de ambos *Trichoderma* de manera importante. Como ocurrió en la siembra hifal, el medio PACayhua permitió esporulación temprana de *Trichoderma* y en mayor proporción que en los otros dos medios.

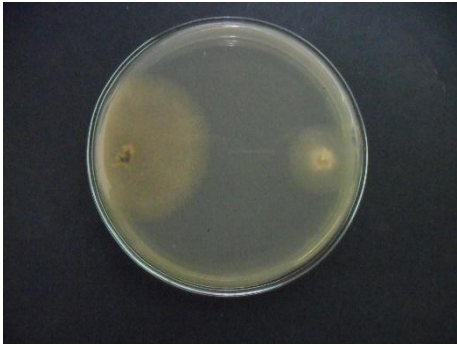
En el medio PALechuga, *Sclerotinia* creció mejor estrechando bastante bien el crecimiento de ambos *Trichoderma*, ofreciendo una respuesta inesperada ante la gran capacidad supresiva que ejercen *T. harzianum* y *T. viride* sobre *Sclerotinia* cuando crecen en medio PDA; (4, 15, 21, 28, 40).



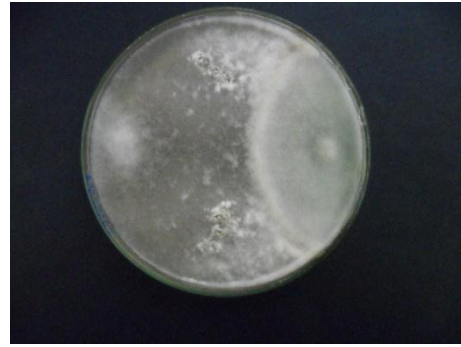
Fot. 3.44. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y 3 días de *T. harzianum* en PAApio.



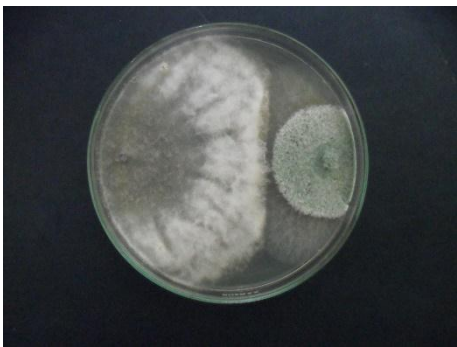
Fot. 3.45. Crecimiento de *Sclerotinia* a 11 días de la siembra y 7 días de *T. harzianum* en PAApio.



Fot. 3.46. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y 3 días de *T. viride* en PAApio.



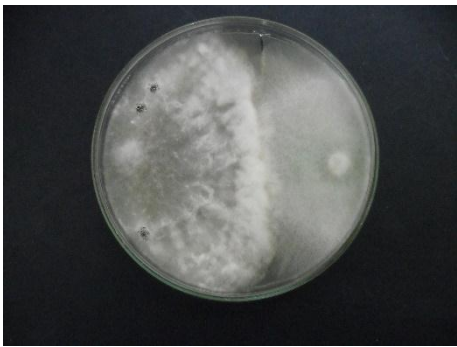
Fot. 3.47. Crecimiento de *Sclerotinia* a 11 días de la siembra y 7 días de *T. viride* en PAApio.



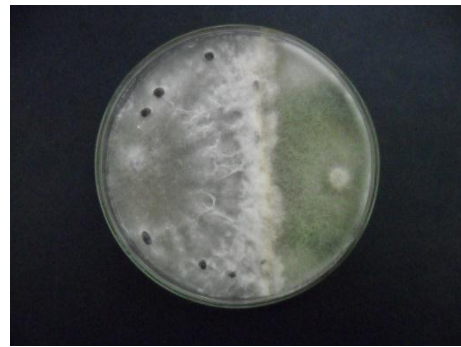
Fot. 3.48. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y 3 días *T. harzianum* en PACayhua.



Fot. 3.49. Crecimiento de *Sclerotinia* a 11 días de la siembra y 7 días *T. harzianum* en PACayhua.

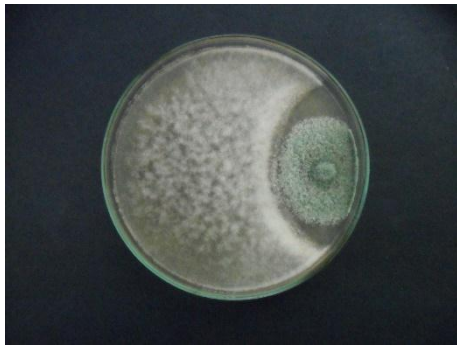


Fot. 3.50. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y 3 días de *T. viride* en PACayhua.

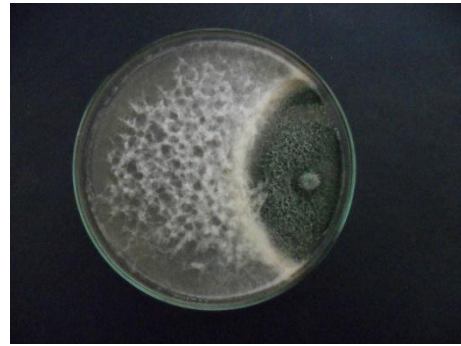


Fot. 3.51. Crecimiento de *Sclerotinia* a 11 días de la siembra y 7 días *T. viride* en PACayhua.

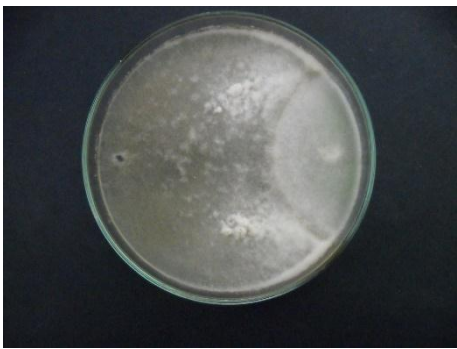




Fot. 3.52. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y 3 días *T. harzianum* en PALecheuga.



Fot. 3.53. Crecimiento de *Sclerotinia* a 11 días de la siembra y 7 días *T. harzianum* en PALecheuga.



Fot. 3.54. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y 3 días de *T. viride* en PALecheuga.



Fot. 3.55. Crecimiento de *Sclerotinia* a 11 días de la siembra y 7 días de *T. viride* en PALecheuga.

En el cuadro 3.4 se muestra el resultado del análisis estadístico del crecimiento radial de colonias durante la prueba de antagonismo, usando como inóculo a esclerotes maduros que tuvieron 4 días de ventaja de crecimiento en los tres medios modificados.

Se determinó que en los tres medios, los crecimientos radiales promedios fueron semejantes en sus dimensiones, es decir no existen diferencias estadísticamente, significativas, mientras que sí existen diferencias altamente significativas entre los crecimientos promedios registrados en los tres medios con inóculo esclerotial, los cuales formaron colonias de tamaño diferentes por crecimiento individual en los tres medios. En cuanto a los crecimientos de las colonias duales de *Trichoderma* también se determinó diferencias altamente significativas, probablemente por las influencias de los medios y la ventaja concedida a los esclerotes. El crecimiento radial de *Sclerotinia* respondió de manera diferente,

estadísticamente no significativo ante la influencia de los medios y la ventaja de tiempo establecida.

Cuadro 3.4. Análisis de variabilidad del crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Medios	2	0.02	0.01	1.96	3.22	5.16	NS
Crecimiento individual	2	0.17	0.08	21.00	3.22	5.16	**
Crecimiento dual	3	68.11	22.70	5721.40	2.83	4.29	**
<i>Trichoderma</i> dual	1	0.04	0.04	8.96	4.07	7.29	**
<i>Sclerotinia</i> dual	1	0.01	0.01	3.50	4.07	7.29	NS
Error	42	0.17	0.004				
Total	62	364.64					

C.V. = 1.16%

La prueba de Tukey para los promedios correspondientes de crecimiento radial de las colonias (gráfico 3.14), reveló que el crecimiento radial de los *Trichoderma* se vio severamente afectado por el crecimiento del esclerote con ventaja de 4 días principalmente en los medios con apio (Tv-Ss: 2.13 cm; Th-Ss: 2.10 cm) y lechuga (Th-Ss: 1.97 cm; Tv-Ss: 1.83 cm). Por su parte, *Sclerotinia* se vio favorecido por la ventaja, alcanzando crecimientos radiales no significativos en los tres medios, que varían entre 4.63 y 5.20 cm.

Estos comportamientos individuales y duales de los hongos en estudio, a partir de la siembra con esclerotes, es semejante a lo que se determinó para la siembra con hifas de *Sclerotinia*, lo cual comprueba la utilidad de usar esclerotes maduros para este tipo de pruebas y no solamente hifas. La única diferencia es que las hifas condicionan una ligera ventaja de crecimiento de las colonias en relación a los esclerotes; por lo demás, la otra influencia está en que con ambos inóculos se logran diferencias significativas en la formación de esclerotes.

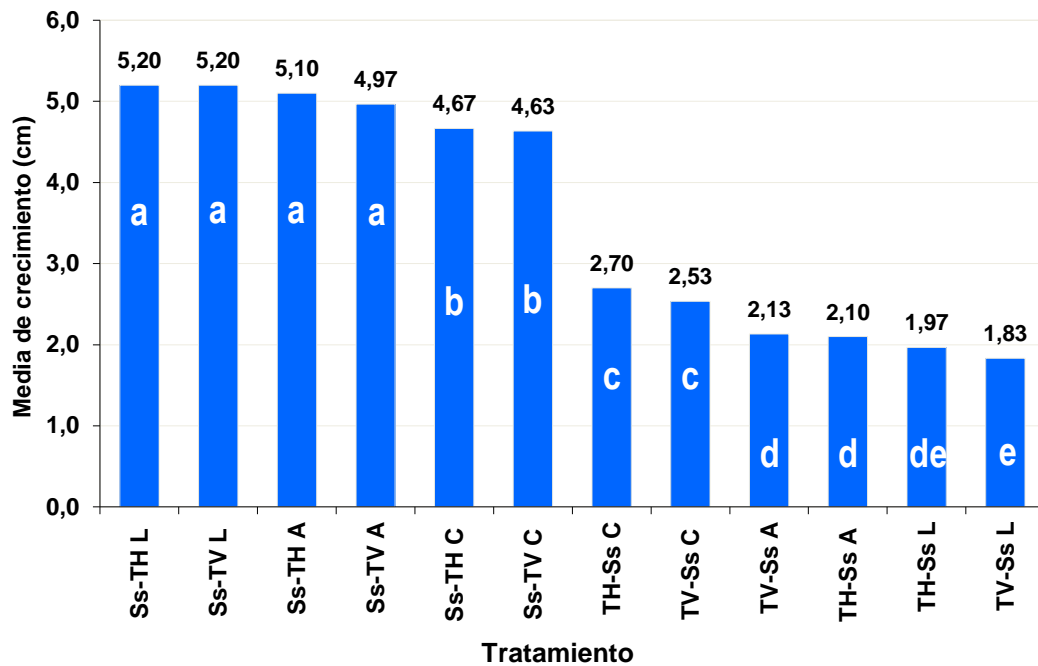


Gráfico 3.14. Prueba de Tukey para el crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

- Ss.TH.L. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Lechuga.
- Ss-TV.L. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Lechuga.
- Ss.TH.A. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Apio.
- Ss-TV.A. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Apio.
- Ss.TH.C. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Cayhua.
- Ss-TV.C. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Cayhua.
- TH.Ss.C. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Cayhua.
- TV.Ss.C. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Cayhua.
- TV.Ss.A. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Apio.
- TH.Ss.A. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Apio.
- TH.Ss.L. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Lechuga.
- TV.Ss.L. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Lechuga.

**a) Cultivo dual esclerotial en medio PAApio.**

En el gráfico 3.15 se muestra las tendencias de crecimiento individual y dual de *T. harzianum* y *Sclerotinia*, estableciéndose que el medio PAApio resulta favorable para el crecimiento individual continuo de ambos

hongos; de igual manera, en el crecimiento dual con ventaja para *Sclerotinia*, el efecto antagónico de *T. harzianum* se ve disminuido aun crecimiento radial promedio de 2.10 cm, en relación al crecimiento de *Sclerotinia* que alcanzó a 5.10 cm hasta los 9 días de incubación. En este medio PAApio también se evidencia que la ventaja del esclerote, limita de igual modo que las hifas el crecimiento de *T. harzianum* de manera significativa en relación al crecimiento individual, debido a que el inóculo esclerotial se comporta fisiológicamente igual que el inóculo hifal, de manera independiente al medio.

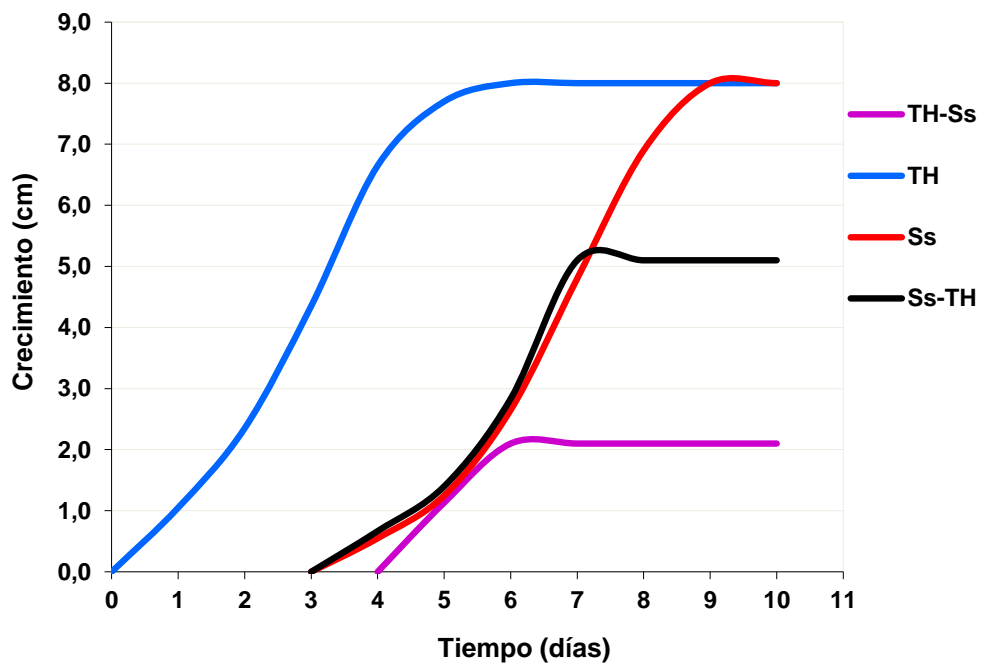


Gráfico 3.15. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

Las tendencias de crecimiento registradas para *T. viride* en el medio PAApio (gráfico 3.16) son semejantes a las de *T. harzianum*, tanto para el crecimiento individual como para el dual; así como *T. viride* creció solo hasta el sexto día alcanzando un diámetro de 2 cm, de igual modo *Sclerotinia* llegó hasta el séptimo logrando 4.97 cm. Se comprueba que el crecimiento de la colonia a partir del esclerote siempre es más lento y se

logra menor tamaño de colonia. Pero la ventaja del esclerote también limitó de manera significativa al crecimiento de *T. viride*.

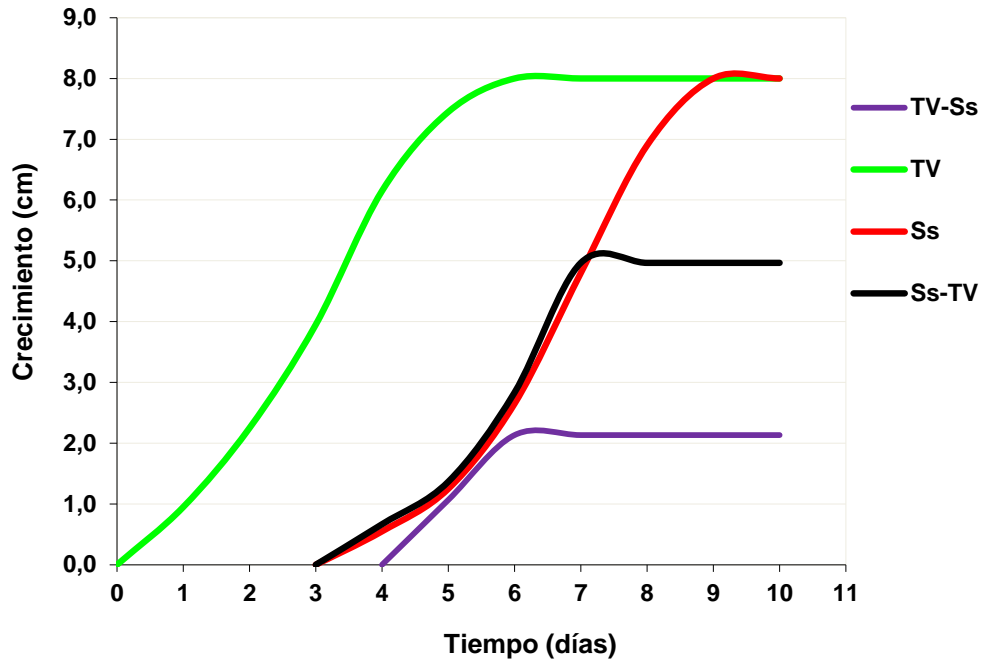


Gráfico 3.16. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

**b) Cultivo dual esclerotial en medio PACayhua.**

En los gráficos 3.17 y 3.18 podemos observar que el medio PACayhua fue favorable para ambos *Trichoderma* y ligeramente menos para *Sclerotinia* en cuanto a rapidez de crecimiento; pero en ambos casos los cultivos duales tuvieron semejante tendencia, mostrando que los *Trichoderma* lograron un crecimiento reducido (Th: 2.7 cm; Tv: 2.53 cm) hasta los 7 días; mientras tanto, la ventaja concedida al esclerote facilitó que el micelio creciera hasta los 8 días alcanzando (Th: 4.67 y Tv: 4.63 cm). Se comprueba que la ventaja a *Sclerotinia* provocó que el diámetro de las colonias de los *Trichoderma* se redujeran en (Th: 5.3 cm y en Tv: 5.5 cm). De este modo, *Sclerotinia* logró mantener un buen nivel de ocupación de la placa, pero en ligera menor proporción que cuando se usan las hifas como inóculo.

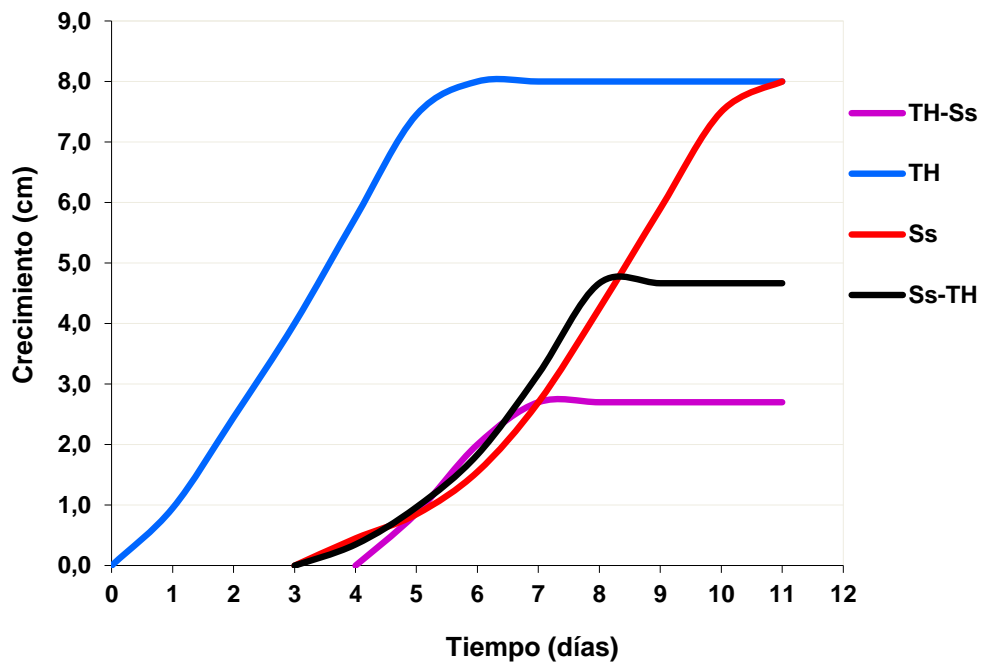


Gráfico 3.17. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

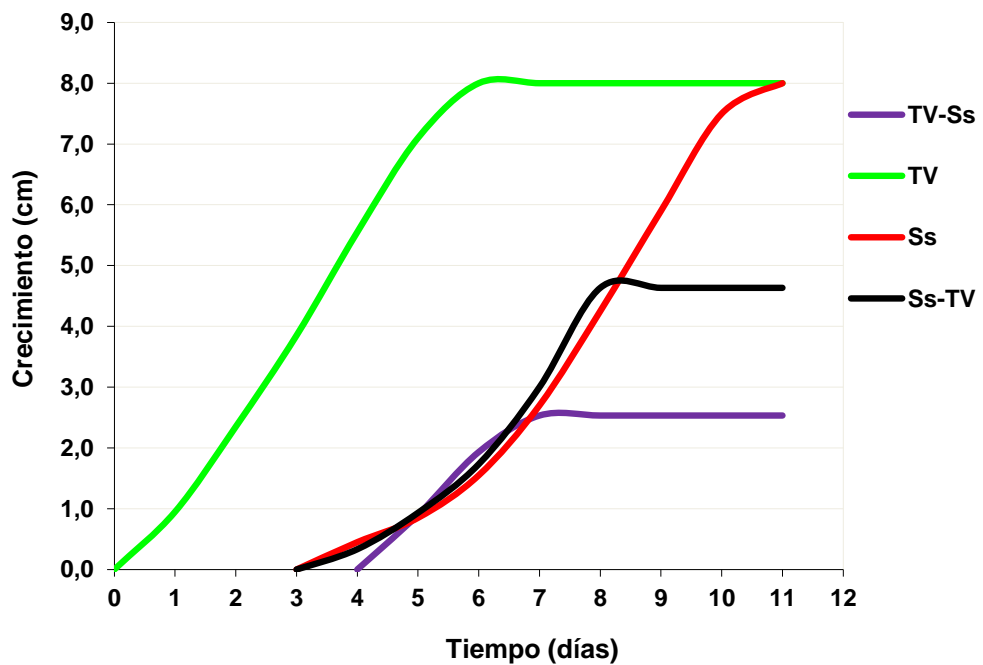


Gráfico 3.18. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

### c) Cultivo dual esclerotial en medio PALechuga.

Los gráficos 3.19 y 3.20 informan que las tendencias del crecimiento radial son semejantes a las obtenidas en los otros medios; en forma individual, tanto los *Trichoderma* como *Sclerotinia* llenaron las placas en 6 días de crecimiento, lo cual indica que el medio les fue favorable. En cultivo dual, nuevamente se hace evidente, en forma significativa, **la ventaja de 4 días** de inoculación para *Sclerotinia* antes de sembrar los *Trichoderma*. La presencia anticipada de *Sclerotinia* le permitió lograr un diámetro de 5.20 cm, mientras que *T. harzianum* solamente logró un diámetro de 1.97 cm y *T. viride* 1.83 cm.

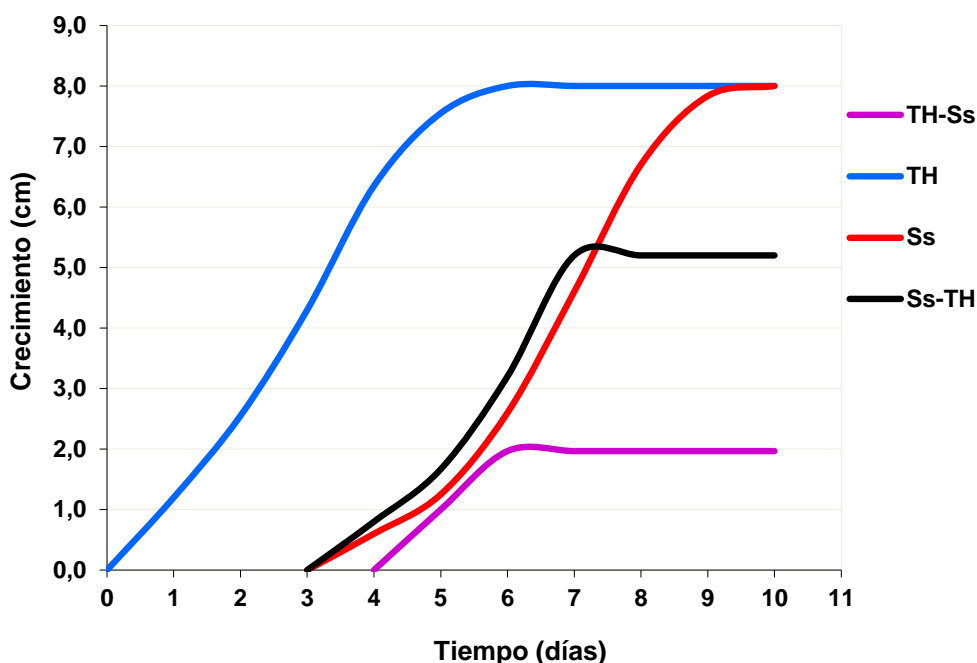


Gráfico 3.19. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PALechuga.

Luego de evaluar las relaciones entre el patógeno y los antagonistas, se puede plantear que cualquiera que sea el inóculo utilizado, las capacidades de respuesta de *Sclerotinia* ante la presencia del antagonista *Trichoderma* pueden mejorarse cuando la alta velocidad de crecimiento de *Trichoderma* es frenada por determinada población del patógeno en el

medio de cultivo. De este modo, podemos indicar que no es suficiente favorecer al antagonista en el medio de cultivo para medir sus capacidades, mientras no se ha considerado las posibilidades de defensa natural del patógeno ante el antagonista. Por ello, la investigación considera justo evaluar la susceptibilidad del patógeno en condiciones que el antagonista no puede superar por sí mismo.

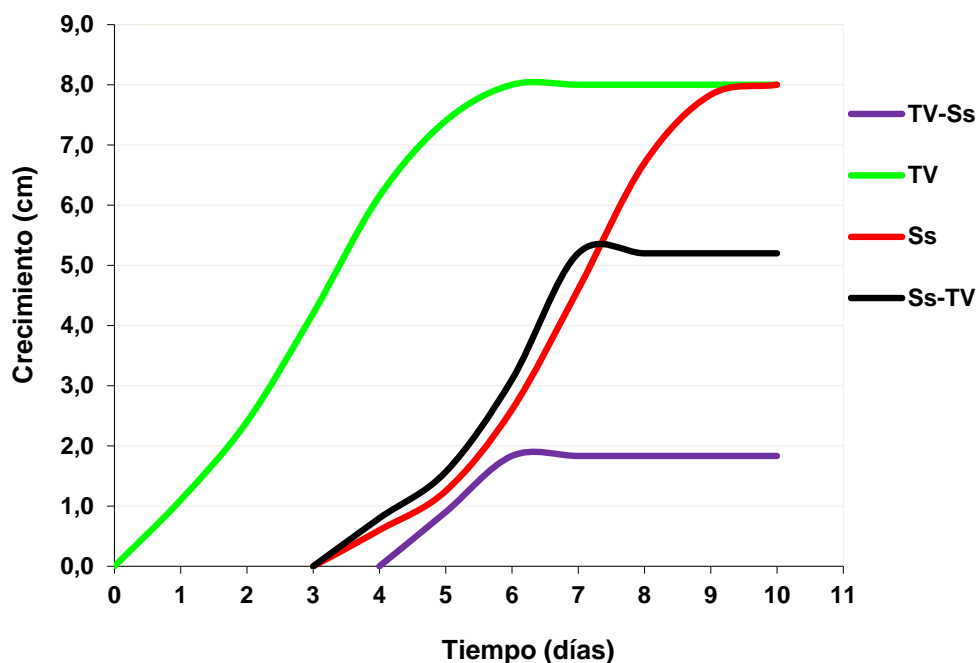


Gráfico 3.20. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PALechuga.

### 3.2.3. EFECTO DE LA SIEMBRA DUAL CON INÓCULO HIFAL EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma*, SIN VENTAJA DE TIEMPO DE CRECIMIENTO PARA *Sclerotinia*, EN TRES MEDIOS MODIFICADOS.

Esta tercera parte de la discusión trata de la propuesta frecuente de las pruebas de antagonismo, cuando el patógeno y antagonista se encuentran al mismo tiempo en el ambiente de la placa. Para nuestro caso, la diferencia solamente radicaré en el cambio de medios al reducir la desventaja, en especial para *Sclerotinia*, al excluir a la dextrosa del



medio de cultivo y la adición de sustancias favorables para su crecimiento (peptona, sulfato de magnesio y fosfato de potasio monobásico).

El evento comparativo de antagonismo supresivo, que permitirá dilucidar el comportamiento biológico de ambos *Trichoderma* ante *Sclerotinia*, en el mismo momento de siembra en la placa, se estableció efectuándose las mismas pruebas anteriores de crecimiento dual e individual.

En cuanto al comportamiento de *Trichoderma*, Almaraz (2012) indica que este antagonista invade colonias de los patógenos por competencia y a veces con micoparasitismo, destruyendo el micelio, cuando no se ofrece ventaja al patógeno. En nuestro caso, **no se evidenció certeramente la competencia porque los medios en prueba fueron lo suficiente nutritivos para todos y la competencia por nutrientes no fue el motivo para reducir el crecimiento de las colonias de *Sclerotinia***, sino más bien como se demostró en la siembra con ventaja, fue el crecimiento anticipado lo que motivó cambios en las capacidades de ambos hongos.

En otras condiciones de trabajo, Agrios (2004), citado por Chávez (2006) informa que *Trichoderma* ejerce parasitismo sobre *Sclerotinia*. Martínez (2013) informa que aunque *Trichoderma* produce enzimas hidrolíticas, éstas no siempre afectan a todos los patógenos, porque existe selectividad de acción. Lo mismo ocurre con el antagonismo de *Trichoderma* en *Rhizoctonia solani*, como lo indica Rodríguez (2002) cuando en el hongo patógeno sí se ejerce parasitismo mediante enzimas gluconasas y quitinasas, es decir también existe una selectividad de acción por parte del antagonista. Por su parte, Romero (2014) también evidenció en otros *Trichoderma* la acción selectiva de quitinasas y glucanasa sobre *Phytophthora* y *Fusarium* en medio PDA sin ventaja para los patógenos. En otro contexto, Carlie y Watkinson (1997) y Fernández (2001), citados por Roselló (2003) informan que *Trichoderma* ejerce parasitismo alimentándose del patógeno, utilizando enzimas hidrolíticas.

Por otra parte, Michel et al. (2013) pusieron en evidencia que los diversos aislamientos de *Trichoderma* muestran un comportamiento heterogéneo en su actividad antagónica, que se relaciona con el tipo de patógeno con el cual interacciona el antagonista. Harman (2000) citado por Leyva (2006) informa que además de afectar enzimáticamente, *Trichoderma* coloniza superficialmente la colonia del patógeno en medio de cultivo; este aspecto también se observó ligeramente en cultivo dual con ventaja en los tres medios probados, pero sin que afecte de manera importante a *Sclerotinia*.

Rubio y Fereres (2005) también hace referencia a que un mismo microorganismo antagonista puede ejercer acción controladora simultáneamente por varios mecanismos. Considera que *Trichoderma* ocasiona fungistasis significativa en el ambiente, al anular la germinación de esporas o crecimiento micelial del patógeno. De lo observado en nuestro experimento, es probable que esto no haya ocurrido debido a que *Sclerotinia* no forma esporas o conidias; pero si se tiene evidencias de que puede inhibir la germinación miceliogénica del esclerote cuando *Trichoderma* entra en contacto directo con él.

De acuerdo a estas referencias, es probable que sea frecuente la selectividad enzimática del antagonista ante el patógeno y que en nuestro caso pudo haber restricción del uso de las enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* cuando el patógeno toma ventaja de crecimiento en el medio de cultivo.

Es probable que estas condiciones de parasitismo hayan estado presentes en los cultivos duales sin ventaja de tiempo para *Sclerotinia*, como lo han observado los autores indicados.

En el cuadro 3.5 se muestra los resultados del análisis estadístico de las mediciones radiales del crecimiento de colonias, con la misma finalidad anterior de evidenciar las diferencias de comportamiento de los tres

hongos en estudio, durante la prueba de antagonismo, cuando *Sclerotinia* no tiene ventaja de crecimiento.

Se determinó que el crecimiento de las colonias en los tres medios fue diferente, es decir no ofrecieron limitaciones para ninguno de los tres hongos, tanto en crecimiento individual como dual.

En el crecimiento dual se registró diferencias altamente significativas entre crecimientos radiales promedio, confirmándose que el crecimiento de los *Trichoderma* superó al crecimiento de *Sclerotinia*, independientemente de los medios. De igual modo, los crecimientos de *Trichoderma* variaron significativamente de acuerdo a los medios, siendo más favorable para los antagonistas los medios con cayhua y apio (gráfico 3.21).

En cuanto a los *Trichoderma* en cultivo dual, se encontró diferencias estadísticas altamente significativas entre sus crecimientos en los tres medios, es decir aparentemente se comportan diferentes en los tres medios (gráfico 3.21).

Cuadro 3.5. Análisis de variabilidad del crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Medios	2	0.08	0.04	8.37	3.22	5.16	**
Crecimiento individual	2	0.08	0.04	8.37	3.22	5.16	**
Crecimiento dual	3	141.75	47.25	9680.18	2.83	4.29	**
<i>Trichoderma</i> dual	1	0.06	0.06	11.38	4.07	7.29	**
<i>Sclerotinia</i> dual	1	0.08	0.08	16.39	4.07	7.29	**
Error	42	0.21	0.005				
Total	62	437.64					

C.V. =1.28%

Por su parte, *Sclerotinia* tuvo una respuesta de crecimiento altamente significativa ante los medios. El patógeno creció mejor en el medio con lechuga durante la prueba de antagonismo; los medios con apio y cayhua tuvieron menor influencia en el crecimiento (gráfico 3.21).

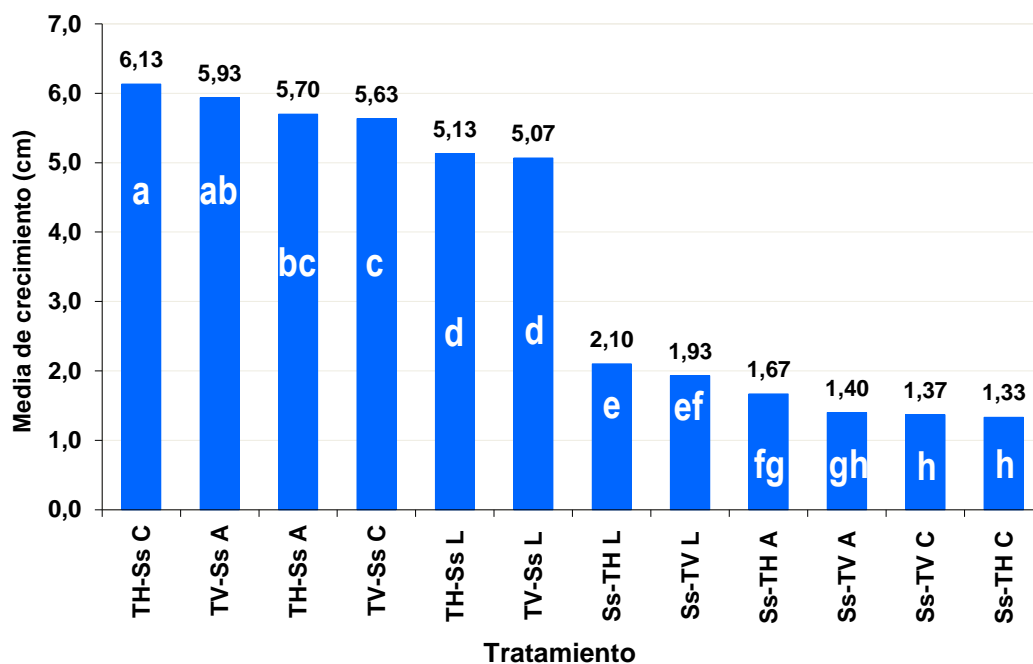


Gráfico 3.21. Prueba de Tukey para el crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

- TH.Ss.C. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Cayhua.
- TV.Ss.A. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Apio.
- TH.Ss.A. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Apio.
- TV.Ss.C. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Cayhua.
- TH.Ss.L. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Lechuga.
- TV.Ss.L. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Lechuga.
- Ss.TH.L. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Lechuga.
- Ss-TV.L. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Lechuga.
- Ss.TH.A. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Apio.
- Ss-TV.A. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Apio.
- Ss-TV.C. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Cayhua.
- Ss.TH.C. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Cayhua.

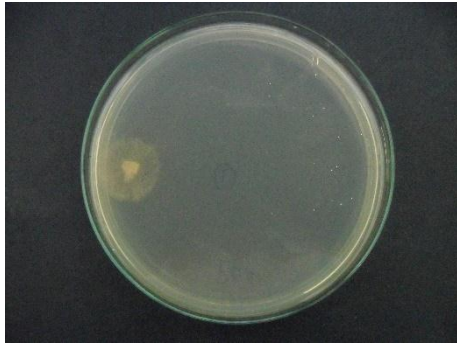
### 3.2.3.1. Siembras individuales y siembras duales sin ventaja.

Para fines de comparar y comprobar que la ventaja ofrecida al parásito cambia las relaciones entre antagonistas y el parásito, de manera independiente al tipo de medio, se discutirán por separado las siembras pareadas como se procedió en los capítulos anteriores.

#### a) *Siembra hifal en medio PAApio.*

Los resultados de crecimiento indicaron que *Sclerotinia* crece bien en forma rápida e incluso con algunos esclerotes incipientes, en el medio PAApio hasta los 7 días de la siembra. Por su parte, en este mismo medio, ambos *Trichoderma* no tienen dificultades de crecer bien y esporular, de igual modo, hasta los 7 días (fotografías 3.57, 3.59 y 3.61). Estas características fueron de gran valor en la evaluación y análisis de los comportamientos de *Sclerotinia* y *Trichoderma* en la siembra dual con los tres medios modificados.

En las siembras duales, se determinó la mayor capacidad de los *Trichoderma* para crecer en forma rápida como ocurrió en la siembra individual; en este contexto de confrontación, *Sclerotinia* se vio muy limitado de crecer probablemente por la influencia de sustancias secretadas por *Trichoderma* (2, 9, 11, 38, 41) que limitaron o restringieron el crecimiento de *Sclerotinia* de manera significativa y rápida. Debido al crecimiento acelerado de *Trichoderma* el patógeno *Sclerotinia* no pudo avanzar en la forma como lo hizo en crecimiento individual. Por otra parte, en esta situación **sin ventaja, se nota claramente que *Sclerotinia* no opone ninguna resistencia ante *Trichoderma***, mostrando en esta condición su alta susceptibilidad ante los antagonistas.



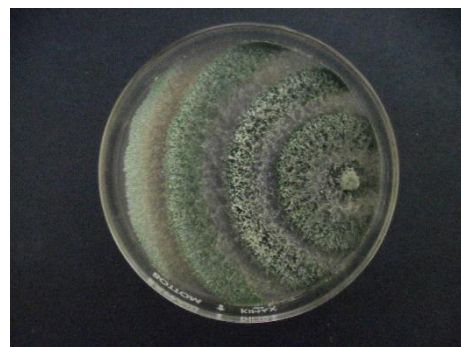
Fot. 3.56. Crecimiento de *Sclerotinia* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



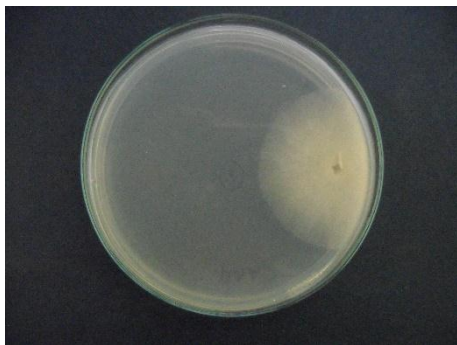
Fot. 3.57. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra en medio PAApio.



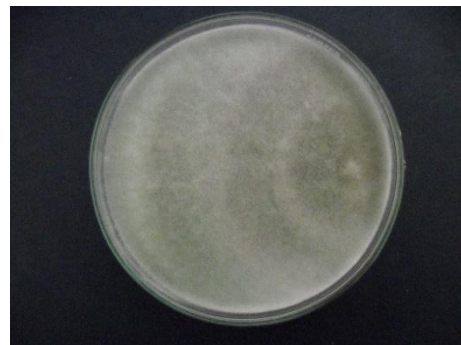
Fot. 3.58. Crecimiento de *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.59. Crecimiento de *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.60. Crecimiento de *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.61. Crecimiento de *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PAApio.

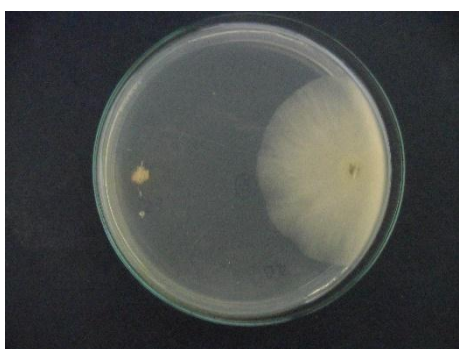
Las tendencias de los crecimientos radiales en el medio PAApio, observados en las fotografías anteriores, se muestran en el gráfico 3.22, para destacar la gran dificultad que tuvo *Sclerotinia* para crecer ante los *Trichoderma*, aún cuando el medio le es favorable para su crecimiento.



Fot. 3.62. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.63. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.64. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.65. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PAApio.

En cultivo individual, los hongos aprovecharon bien las cualidades del medio. En cultivo dual *Trichoderma* creció bien reduciendo su diámetro en 2 cm por la presencia de *Sclerotinia*. Por su parte, *Sclerotinia* se vio limitado a crecer solamente 1.7 cm de diámetro, reduciendo su crecimiento en 6.3 cm por la acción supresiva de *T. harzianum*.

Este comportamiento fue diferente cuando se le ofreció ventaja de tiempo a *Sclerotinia*; prácticamente, los *Trichoderma* fueron restringidos en su crecimiento por la mayor actividad metabólica de *Sclerotinia*, aquí probablemente no se cumpla cabalmente la actividad parasítica que se plantea por otros autores (2, 9, 11, 38, 41).

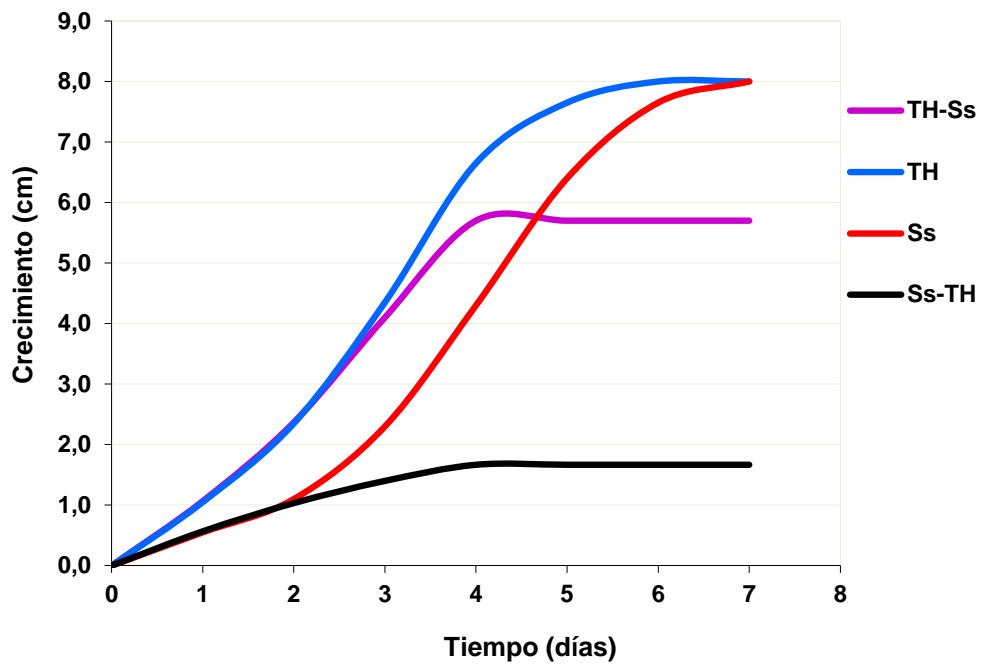


Gráfico 3.22. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

Como en el caso de *T. harzianum*, las relaciones de *Sclerotinia* y *T. viride* en el medio PAApio son semejantes, pero es necesario destacar para ambos casos, que la supresión del crecimiento de *Sclerotinia* ocurre tempranamente, casi desde el inicio de la siembra en la placa, lo cual es una clara señal de que este modo de probar el antagonismo de los *Trichoderma* en *Sclerotinia* (sin ventaja de tiempo) tiene su contraparte discutible a favor de *Sclerotinia* por la injusticia técnica interpuesta en la prueba.



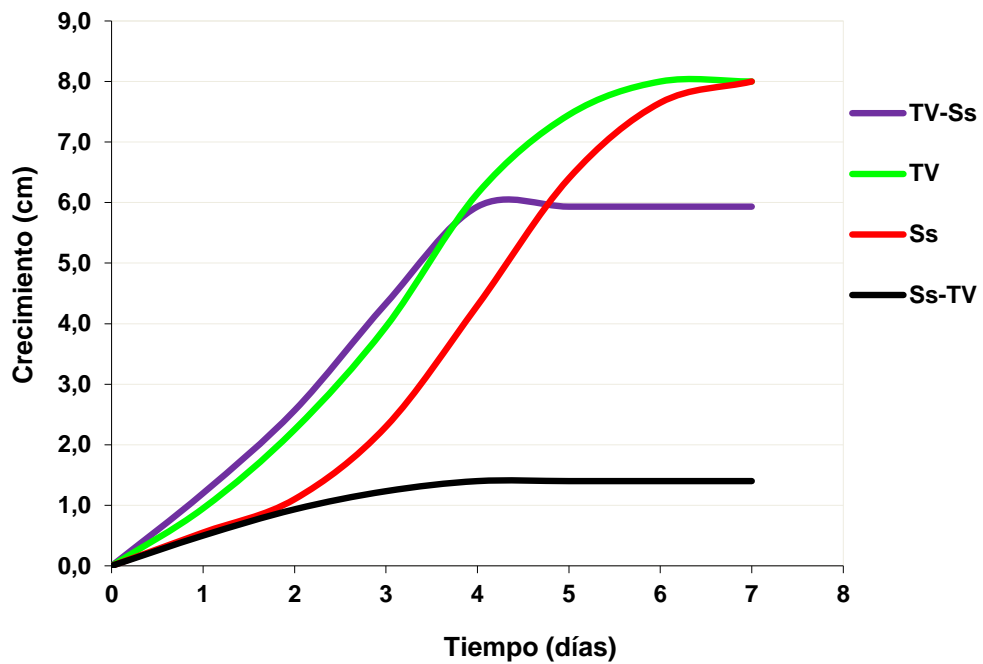
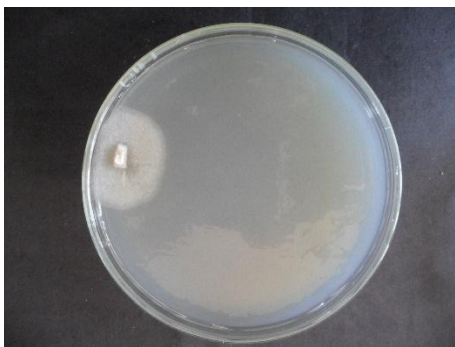


Gráfico 3.23. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

**b) Siembra hifal en medio PACayhua.**

En este medio se observó un ligero menor crecimiento de los tres hongos hasta los 7 días comparado con el medio PAApio, que favoreció tempranamente al crecimiento de las colonias.



Fot. 3.66. Crecimiento individual de *Sclerotinia* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.

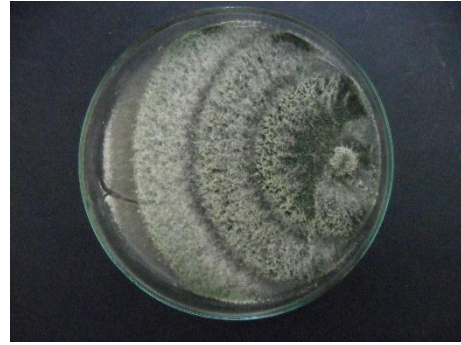


Fot. 3.67. Crecimiento individual de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.

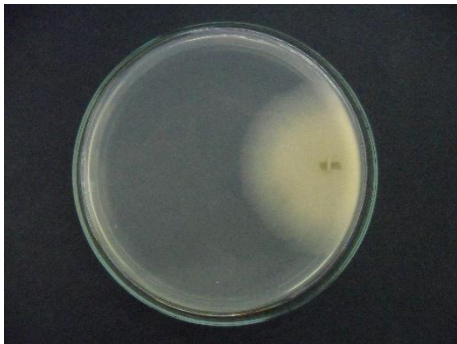
El crecimiento del micelio de *Sclerotinia* y la producción de esclerotes fue más lento y retardado. En los *Trichoderma* la influencia se observó en un menor llenado de la placa, pero no se perjudicó la esporulación de manera semejante que en el medio con apio.



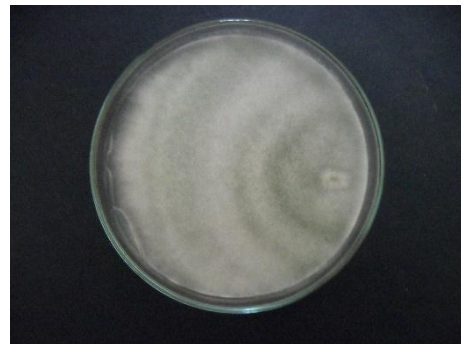
Fot. 3.68. Crecimiento de *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.69. Crecimiento de *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.70. Crecimiento de *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.



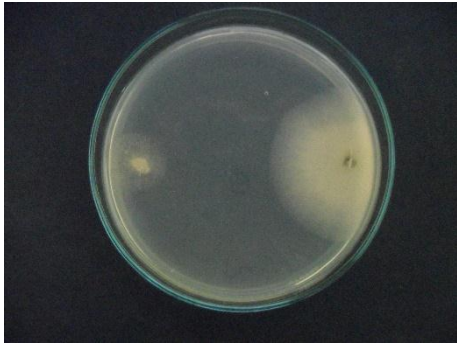
Fot. 3.71. Crecimiento de *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.



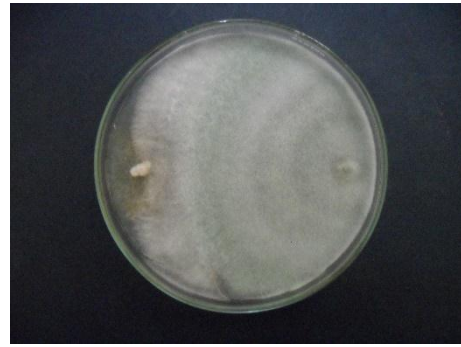
Fot. 3.72. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.73. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.74. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.75. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.

En la siembra dual se observó semejante intensidad de supresión de los *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Sclerotinia*, en relación al medio con apio. Resultó evidente una vez más que en iguales condiciones de momento de siembra, *Sclerotinia* no tiene posibilidades de contrarrestar el crecimiento de los *Trichoderma*, como ocurre de manera importante cuando se da dos o tres días de ventaja a *Sclerotinia*. En esta prueba se evidenció un mayor efecto supresivo de *T. viride* sobre *Sclerotinia*., tal como fue observado por Delgado y Arbeláez (1990) cuando trabajaron con este patógeno, el cual fue inhibido en gran medida en el crecimiento de su micelio en medio PDA.

Las tendencias de crecimiento, expuestas en el gráfico 3.24 muestran que el medio PACayhua fue bastante favorable para *T. harzianum* así como para *Sclerotinia* que creció algo más lento. Cuando se establece el cultivo dual se comprueba una vez más la alta capacidad restrictiva que opone *T. harzianum* al patógeno, anulando prácticamente su actividad de crecimiento. La presencia de *Sclerotinia* de algún modo limita el crecimiento de *T. harzianum*, por falta de espacio para ocupar o quizás reducción de nutrientes en el medio.

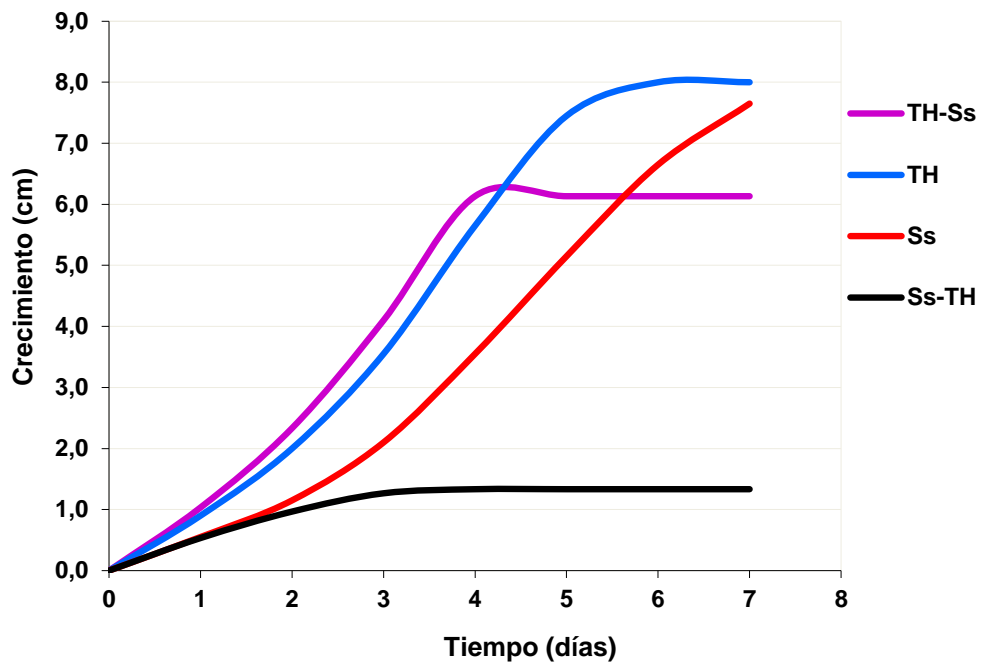


Gráfico 3.24. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

En el caso de *T. viride*, el medio PACayhua también le es favorable, creciendo más rápido que *Sclerotinia*, pero participando de igual modo que *T. harzianum*, con su capacidad para restringir el crecimiento del parásito casi desde el comienzo de la relación dual en el medio. Es también explícita la desventaja que tiene *Sclerotinia* ante el rápido crecimiento de *T. viride* (15).

Hasta este momento podemos poner en discusión si los *Trichoderma* interfieren con *Sclerotinia* mediante sustancias tóxicas o enzimáticas, u oponiendo restricción solamente al crecimiento por mayor velocidad, puesto que cuando se le da ventaja a *Sclerotinia*, éste es capaz de limitar a ambos *Trichoderma* en su crecimiento en la placa. Por ello, nuestra investigación contribuye en plantear la idea de que es necesario efectuar una revisión de procedimientos para comprobar in vitro las capacidades antagónicas sobre los microorganismos indeseados.

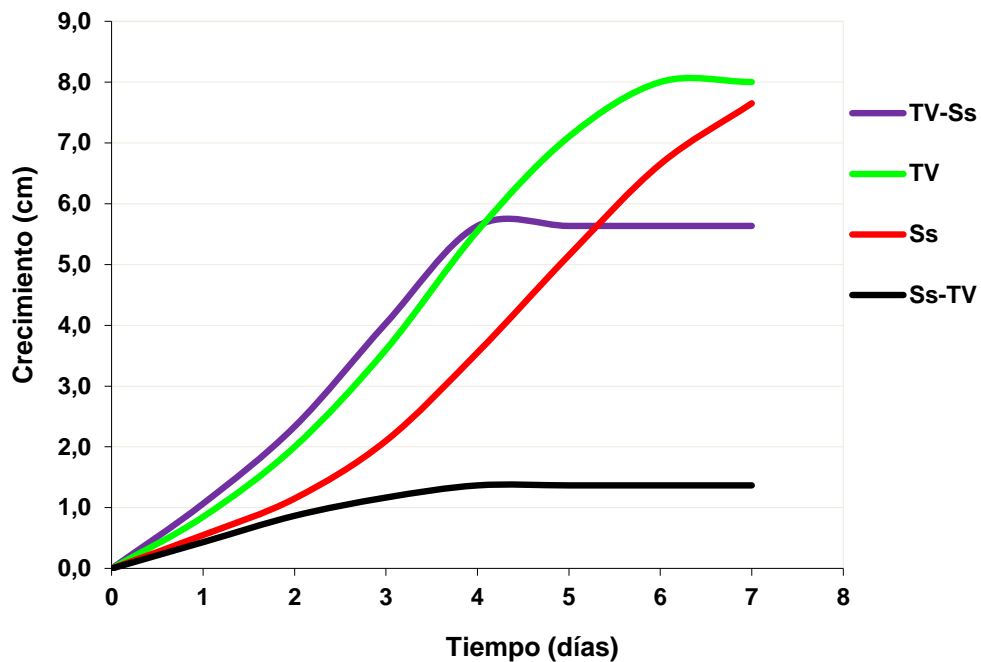


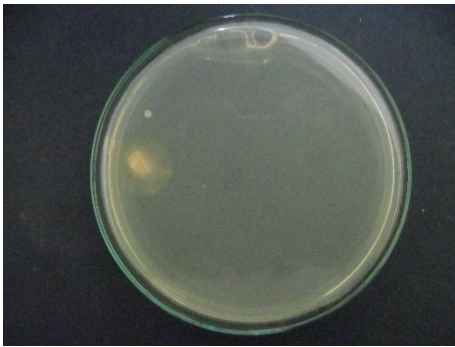
Gráfico 3.25. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

### c) **Siembra hifal en medio PALechuga.**

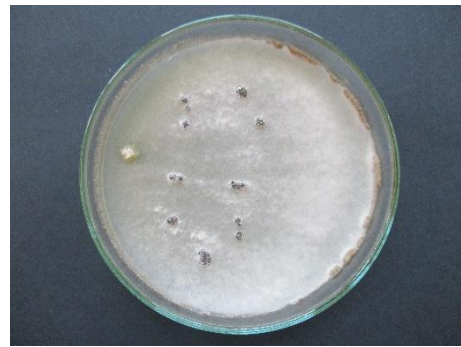
En este medio se observaron algunas diferencias importantes en los tres hongos en prueba. En primer lugar, **en cultivos individuales** ninguno de los hongos tuvo dificultades en crecer y esporular. *Sclerotinia* creció bien hasta los 7 días produciendo mayor cantidad de esclerotes, es decir el medio con lechuga le indujo mayor precocidad. Los *Trichoderma* se manifestaron de manera semejante que en los medios anteriores.

De los resultados de la **siembra dual**, se puede deducir que la precocidad y mejor capacidad de crecimiento inducida por el medio con lechuga en crecimiento individual, también se expresó de alguna manera en las placas, cuando *Sclerotinia* logra crecer más en presencia de los *Trichoderma*, es decir logra contrarrestar ligeramente el avance de *Trichoderma*, con mejor manifestación en la placa con *T. viride*. El crecimiento de la colonia de *Sclerotinia* en presencia de *T. harzianum* alcanza a cubrir un 27% de superficie de la placa, mientras que el

antagonista ocupa el 73%. En el caso con *T. viride*, el patógeno *Sclerotinia* logró ocupar el 30% de la placa, demostrándose así que aun cuando no exista ventaja para *Sclerotinia*, el contenido nutricional del medio (presencia de lechuga) puede otorgar cierta ventaja a favor del patógeno, ofreciendo cierta oposición al crecimiento del antagonista.



Fot. 3.76. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.77. Crecimiento de *Sclerotinia* a 14 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.78. Crecimiento de *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.79. Crecimiento de *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.80. Crecimiento de *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PALechuga.



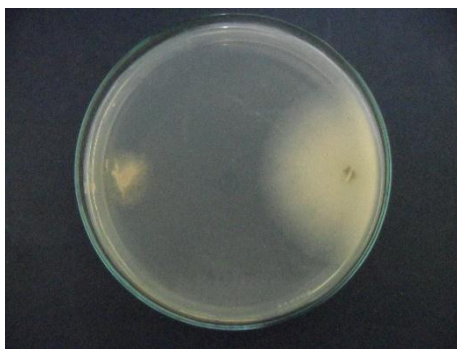
Fot. 3.81. Crecimiento de *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PALechuga.



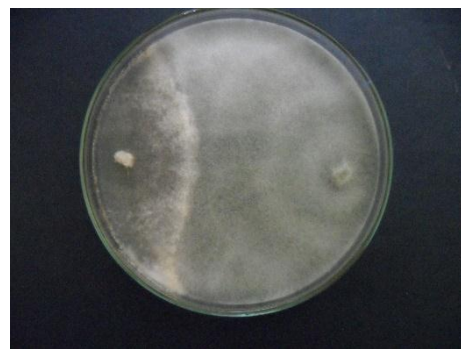
Fot. 3.82. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.83. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.84. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PALechuga.



Fot. 3.85. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PALechuga.

En el gráfico 3.26 se muestra lo manifestado anteriormente, con las diferencias frecuentes en crecimiento individual y los efectos correspondientes en cultivo dual. La siembra con hifas siempre otorga alguna ventaja inicial de crecimiento, pero posteriormente cuando avanza el tiempo la influencia toma un rumbo al azar conforme a las interacciones con el antagonista. Desde el inicio de crecimiento la influencia de *T. harzianum* es evidente sobre *Sclerotinia*; más adelante, de algún modo, el patógeno logra establecerse y competir débilmente con el antagonista, pero finalmente es superado.

En cuanto a *T. viride*, en el gráfico 3.27 ocurre similar tendencia de crecimientos y de restricción del crecimiento de *Sclerotinia*. Como se observa en la figura, en todos los casos, a partir del cuarto día de incubación ambos hongos detienen su crecimiento, pero no se estabiliza

la interacción porque los *Trichoderma* tienen facilidad para avanzar remontando ligeramente la colonia de *Sclerotinia*, situación que también fue observada en otras investigaciones (9, 11, 12, 28, 41). También se determinó que en este medio (PALechuga) se manifestó un comportamiento muy parecido de ambos *Trichoderma* en su actividad individual y en cultivo dual.

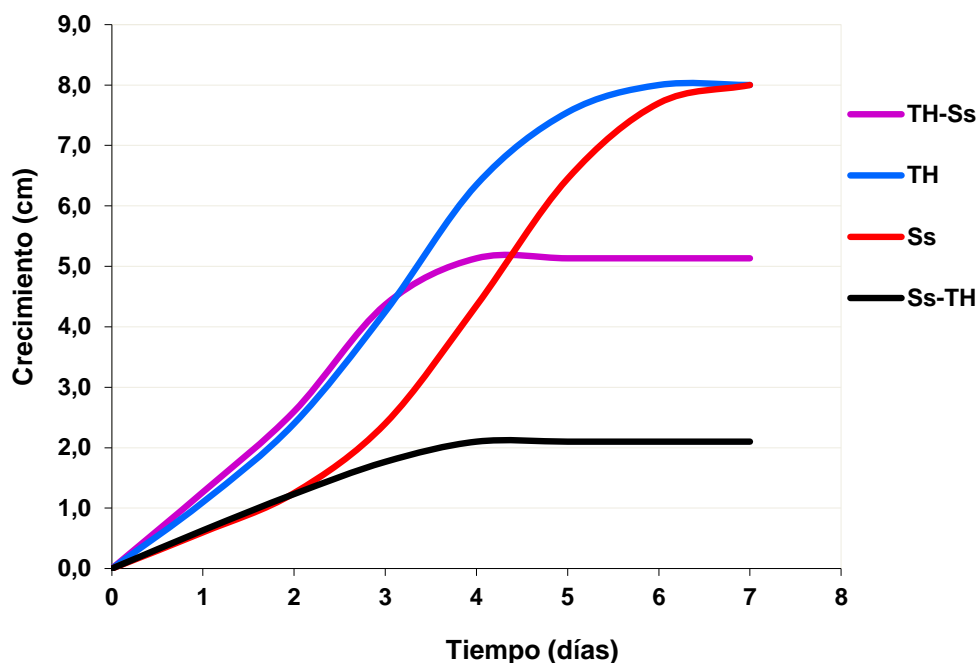


Gráfico 3.26. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PALechuga.

En cuanto a la capacidad de *Trichoderma harzianum*, en cultivo dual en PDA y sin ventaja para los patógenos, Rodríguez y Venero (2011) informan que este antagonista desarrolla una velocidad superior de crecimiento alcanzando un diámetro promedio de 6.3 cm al décimo día de cultivo. Esta es la misma respuesta que obtuvimos en nuestro experimento con *T. harzianum* y *T. viride* en cultivos duales con los tres medios evaluados, evidenciándose así la desventaja por la que pasan los patógenos durante la prueba, puesto que el medio (PDA) favoreció ampliamente a *Trichoderma*.



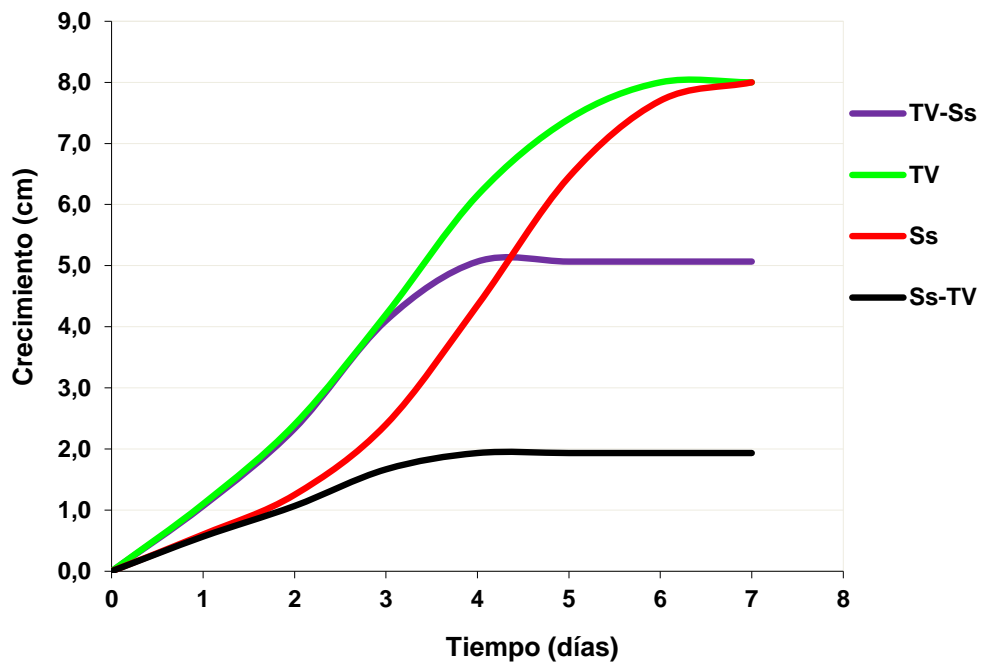


Gráfico 3.27. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo hifal y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PALechuga.

### 3.2.4. EFECTO DE LA SIEMBRA DUAL **ESCLEROTIAL** EN LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE *Trichoderma*, **SIN VENTAJA** DE TIEMPO DE CRECIMIENTO PARA *Sclerotinia*, EN TRES MEDIOS MODIFICADOS.

En relación al uso de esclerotes, como inóculo para pruebas duales de antagonismo, no se encontraron referencias que puedan usarse como comparación, puesto que los trabajos realizados por diversos autores usaron porciones de hifas como inóculo en medio PDA.

Para fines de detallar el comportamiento del esclerote en estas pruebas duales de antagonismo, podemos indicar que según Schwartz y Pastor (1988) y Ramos (2014) los esclerocios necesitan de un periodo de pre acondicionamiento para iniciar su germinación carpogénica o miceliogénica. Esta referencia permitió incluir en la prueba de antagonismo, un tiempo de ventaja de 4 días para el esclerote en el

medio a fin de que se adecúe para germinar miceliogénicamente en los tres medios en prueba, antes de interactuar con los *T. harzianum* y *T. viride*.

#### 3.2.4.1. SIEMBRAS INDIVIDUALES Y SIEMBRAS DUALES SIN VENTAJA.

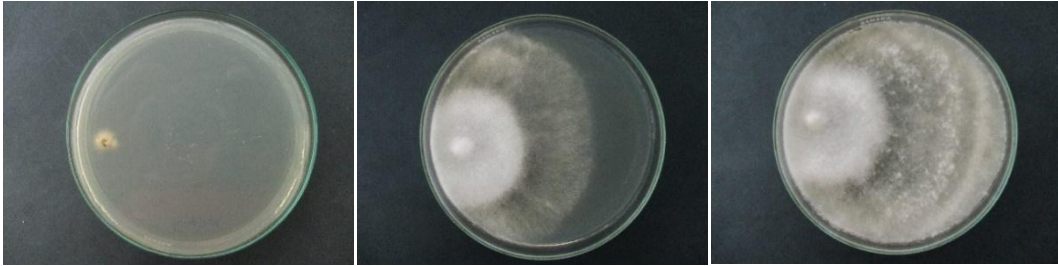
##### a) Siembra individual (testigos pre siembra dual).

Luego de observar las relaciones entre patógeno y antagonista, en siembras con ventaja de tiempo para *Sclerotinia*, usando los tres medios modificados e hifas, el desarrollo de la prueba con esclerotes reveló aspectos importantes que se destacan a continuación.

En la siembra individual, que servirá como testigo antes de la siembra dual, se constató que cada medio ofrece posibilidades de **crecimiento micelial a partir del esclerote**, pero en forma más lenta que con solo micelio, e incluso los esclerotes se forman tardíamente en comparación a la siembra hifal. Esta diferencia de crecimiento fue semejante en los tres medios, principalmente más lento en cayhua. Por ello, y para observar el efecto de la presencia de los *Trichoderma* en el medio, la prueba individual nos permitirá observar cómo es el efecto del antagonista sobre el crecimiento micelial a partir del esclerote cuando *Sclerotinia* no tiene ventaja de tiempo.



Fot. 3.86. (Izquierda) Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra. Fot. 3.87. (Centro) a 7 días de la siembra. Fot. 3.88. (Derecha) a 10 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.89. (Izquierda) Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra. Fot. 3.90. (Centro) a 7 días de la siembra. Fot. 3.91. (Derecha) a 10 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.92. (Izquierda) Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra. Fot. 3.93. (Centro) a 7 días de la siembra. Fot. 3.94. (Derecha) a 10 días de la siembra en medio PALechuga.

El crecimiento de la colonia a partir del esclerote fue mejor en los medios con apio y lechuga; esto permitirá observar si los *Trichoderma* ejercen mayor o menor alteración del patógeno en estos medios. Esto indica que cuando no está presente el antagonista, el crecimiento micelial de *Sclerotinia* sigue su forma habitual según lo que ofrece el medio nutritivo, conforme se evidenció en las pruebas anteriores.

Las siembras duales modificaron notablemente el comportamiento del esclerote y el posterior crecimiento micelial, observándose que el esclerote se retarda en crecer en todos los medios, de modo que a los dos días de la siembra, ambos *Trichoderma* han superado ventajosamente a *Sclerotinia*, en los tres medios.

En el medio PAApio, *T. harzianum* y *T. viride* ocuparon una superficie promedio del 26.8% de las placas (fotografías 3.95 y 3.97), mientras que *Sclerotinia* apenas se asomaba con el 1% de superficie cubierta. A los 7 días, prácticamente los *Trichoderma* impidieron el avance del micelio de *Sclerotinia* casi en su totalidad.

En los medios con apio y lechuga, *Sclerotinia* logró establecerse ligeramente a los 7 días, ocupando 3.3% de la superficie del medio PAApio, mientras que en el medio con PALechuga alcanzó a cubrir el 9.4% de la superficie del medio. Por lo demás, en el medio PACayhua, *Sclerotinia* fue anulado por completo en su crecimiento.



Fot. 3.95. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.96. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PAApio.



Fot. 3.97. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PAApio.



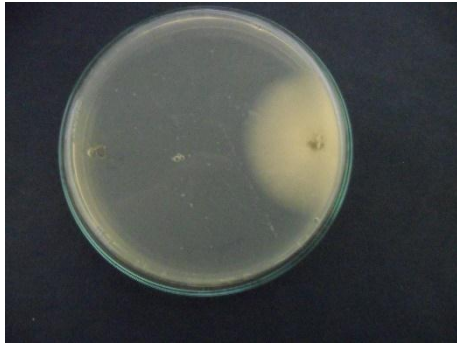
Fot. 3.98. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PAApio.



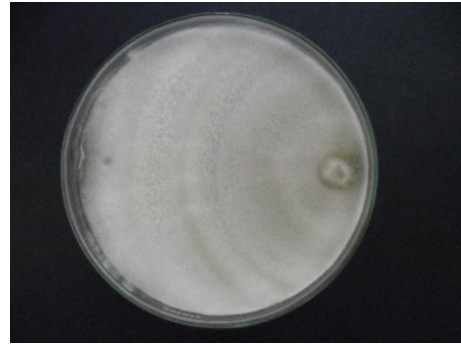
Fot. 3.99. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.100. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.



Fot. 3.101. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PACayhua.



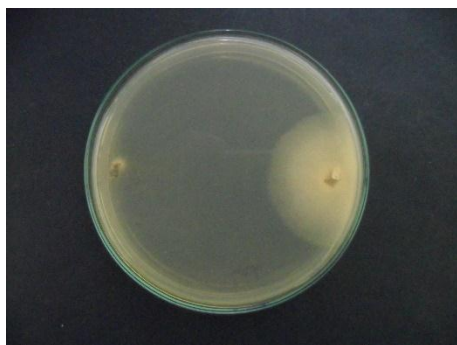
Fot. 3.102. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PACayhua.



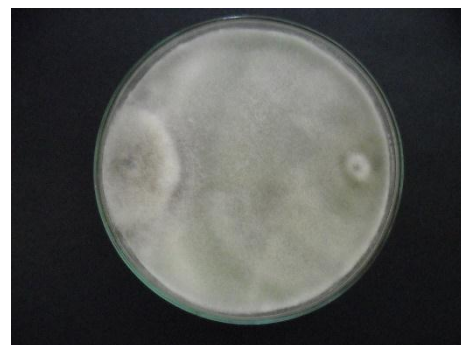
Fot. 3.103. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 2 días de la siembra en medio PAlechuga.



Fot. 3.104. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. harzianum* a 7 días de la siembra en medio PAlechuga.



Fot. 3.105. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 2 días de la siembra en medio PAlechuga.



Fot. 3.106. Crecimiento de *Sclerotinia* y *T. viride* a 7 días de la siembra en medio PAlechuga.

Estos resultados vuelven a evidenciar la enorme dificultad de *Sclerotinia* ante los *Trichoderma* cuando no tiene ventaja de crecimiento previo, como se demostró en la siembra con ventaja. De este modo, **el comportamiento de *Sclerotinia* sin ventaja muestra mejores posibilidades de crecimiento cuando la siembra es con hifas**, debido

a que el establecimiento de *Sclerotinia* mediante el esclerote es **significativamente tardío** (36, 43), lo cual va en mucha desventaja cuando se los usa en las pruebas duales.

El análisis estadístico reveló que el crecimiento de las colonias de los hongos en estudio fue diferentes en los tres medios, mientras que en crecimiento dual las diferencias de crecimiento de las colonias son altamente significativas, determinado probablemente por la ausencia de ventaja de tiempo de crecimiento en *Sclerotinia*. En cuanto a la siembra individual (testigos), el crecimiento de los tres hongos fueron diferentes estadísticamente, logrando cubrir toda la placa al no encontrar limitaciones nutricionales en los tres medios.

Cuadro 3.6. Análisis de variabilidad del crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum*, *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Medios	2	0.09	0.04	18.60	3.22	5.16	**
Crecimiento individual	2	0.17	0.08	35.00	3.22	5.16	**
Crecimiento dual	3	220.73	73.58	30901.54	2.83	4.29	**
<i>Trichoderma</i> dual	1	0.20	0.20	84.23	4.07	7.29	**
<i>Sclerotinia</i> dual	1	0.002	0.00	0.93	4.07	7.29	NS
Error	42	0.10	0.002				
Total	62	513.38					

C.V. = 0.89%

También se determinó que los dos *Trichoderma* crecieron de manera favorable obteniendo diámetros similares de sus colonias en los tres medios, durante el cultivo dual. Por su parte, el crecimiento de *Sclerotinia* respondió de manera semejante en los medios, sin diferencias.

En las pruebas duales quedó evidente que el crecimiento radial de los *Trichoderma* supera al de *Sclerotinia* con alta significación, aspecto que

puede observarse en el gráfico 3.28; de igual modo, la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento dual de los *Trichoderma* se debe a que ambos hongos crecieron de manera diferente en los medios.

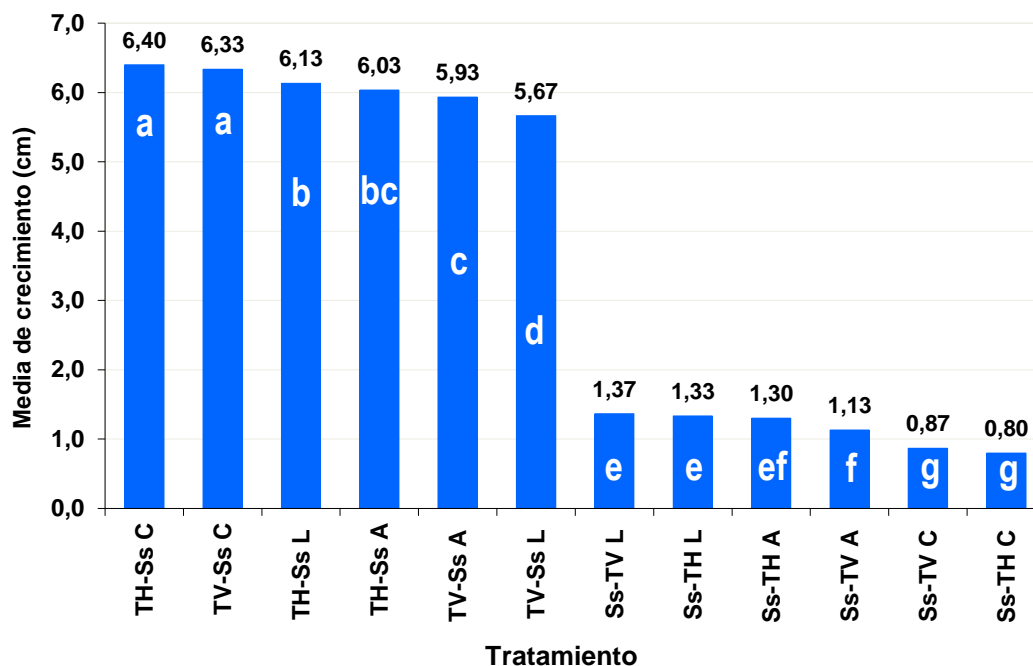


Gráfico 3.28. Prueba de Tukey para el crecimiento dual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medios modificados.

- TH.Ss.C. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Cayhua.
- TV.Ss.C. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Cayhua.
- TH.Ss.L. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Lechuga.
- TH.Ss.A. : *T. harzianum* – *Sclerotinia* – Apio.
- TV.Ss.A. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Apio.
- TV.Ss.L. : *T. viride* – *Sclerotinia* – Lechuga.
- Ss-TV.L. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Lechuga.
- Ss-TH.L. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Lechuga.
- Ss-TH.A. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Apio.
- Ss-TV.A. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Apio.
- Ss-TV.C. : *Sclerotinia* – *T. viride* – Cayhua.
- Ss-TH.C. : *Sclerotinia* – *T. harzianum* – Cayhua.

Por otra parte, la siembra con esclerotes sin ventaja motivó que el crecimiento radial de *Sclerotinia* mostrara crecimientos no significativos entre los medios, siendo relativamente mejor el medio con lechuga y adicionalmente con cayhua.

**a) Siembra dual esclerotial sin ventaja en medio PAApio.**

En los gráficos 3.29 y 3.30 se muestra las tendencias del crecimiento radial de los hongos en este medio; es necesario resaltar que el esclerote demora más tiempo en producir hifas a partir de 3 días (36, 43), respecto a los *Trichoderma* que al día siguiente ya ocuparon un espacio en el medio. Este retardo de crecimiento de *Sclerotinia* es provechoso fácilmente por los *Trichoderma* para avanzar sin dificultad ni oposición del patógeno; por ello el diámetro promedio de la colonia de *Sclerotinia* apenas alcanza entre 1.13 y 1.30 cm, mientras que los *Trichoderma* lograron 6.03 y 5.93 cm, de acuerdo al (gráfico 3.28).

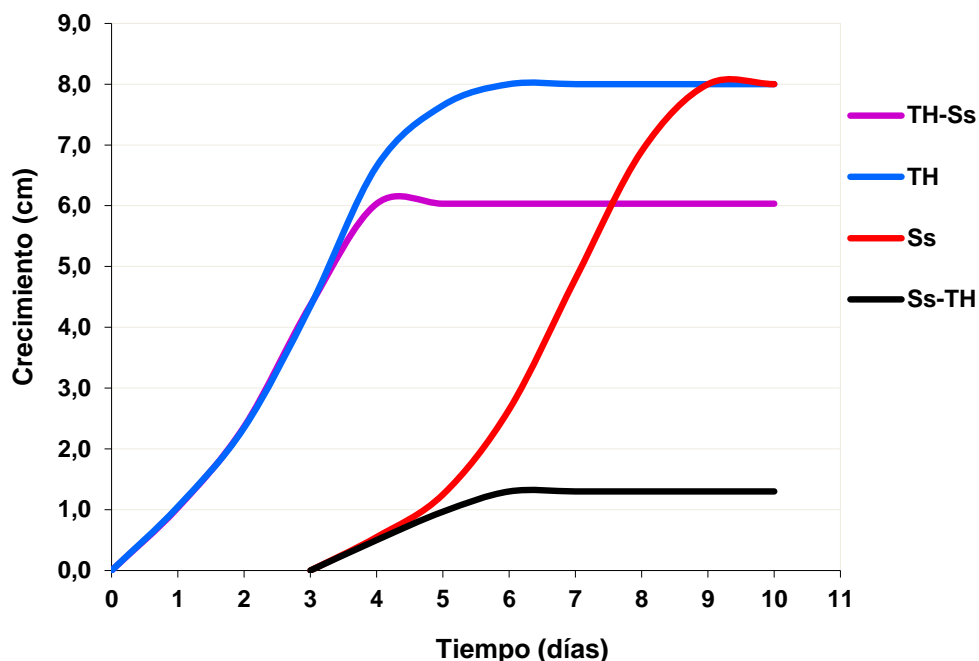


Gráfico 3.29. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.



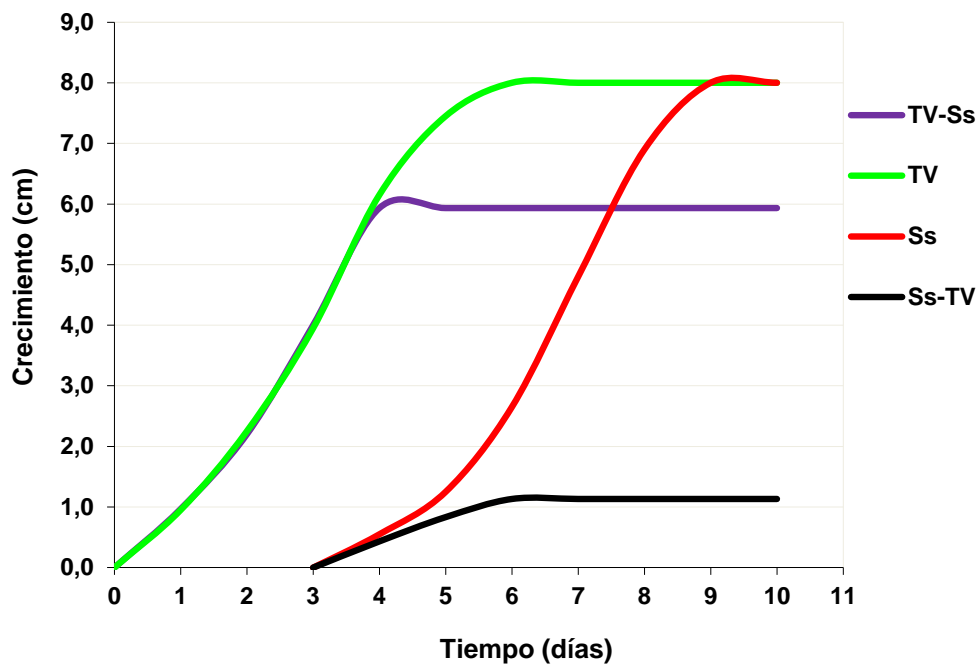


Gráfico 3.30. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PAApio.

Los crecimientos individuales no tuvieron limitación alguna en crecer en este medio, aunque con el consiguiente retraso del esclerote de tres días.

Debido al crecimiento en condición dual, ambos *Trichoderma* redujeron su diámetro de colonia solo en 2 cm, respecto a los crecimientos individuales. Como se indicó anteriormente estas diferencias son significativas y en mayor proporción cuando se trata de siembras con esclerotes.

**a) Siembra dual esclerotial sin ventaja en medio PACayhua.**

Para el medio PACayhua se procedió de modo semejante, registrándose tendencias semejantes en los comportamientos, con algunas diferencias de crecimiento por influencias del medio. Se observa que en ambos cultivos duales, el crecimiento radial de la colonia producida por esclerote, también tardío, fue menor (0.80 y 0.87 cm) que en PAApio lo cual fue

aprovechado por los *Trichoderma* para aumentar el diámetro de sus colonias (Th: 6.4 cm; Tv: 6.33 cm).

En crecimiento individual es evidente el crecimiento lento de *Sclerotinia* a partir de esclerote, mientras que los *Trichoderma* tampoco tuvieron dificultades de crecer en medio con cayhua. La limitación del espacio en la placa, hace que un hongo aproveche la deficiencia del otro para crecer mejor; ahora también se comprueba que el medio con cayhua hace lento el crecimiento del esclerote.

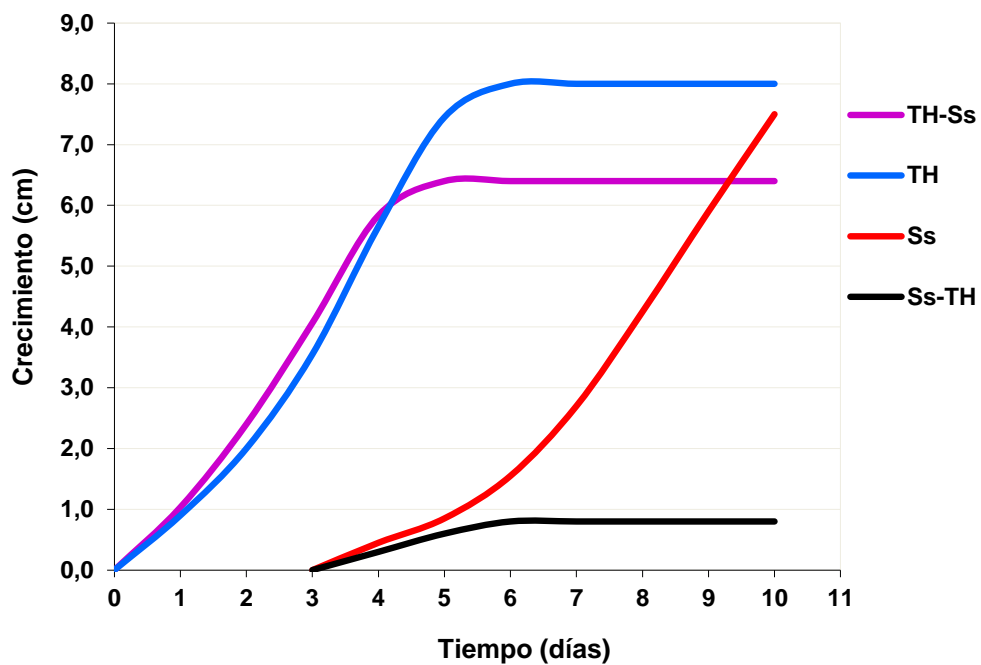


Gráfico 3.31. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

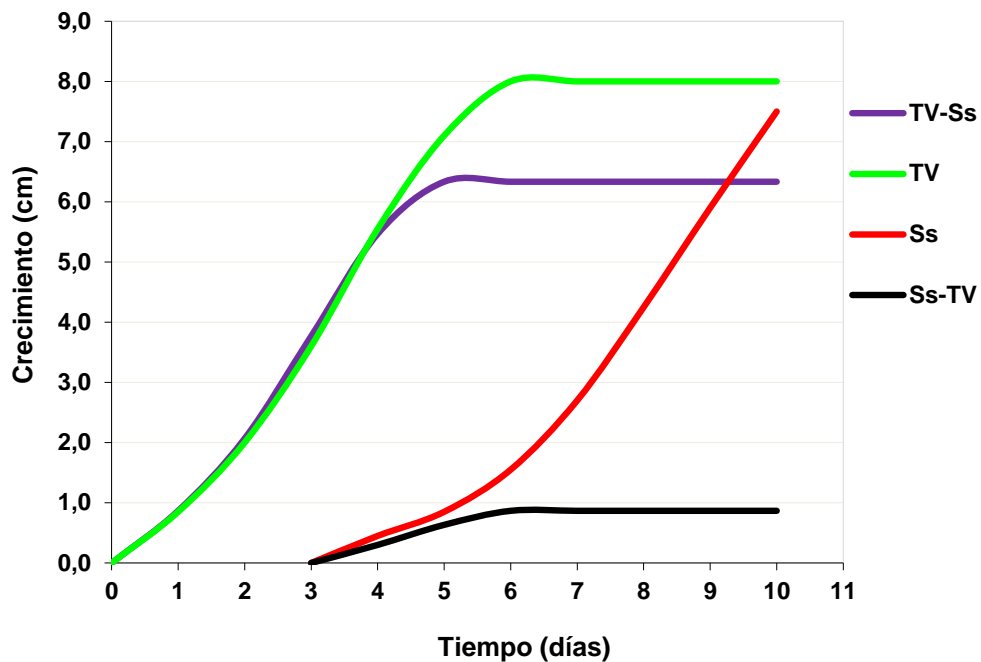


Gráfico 3.32. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PACayhua.

**b) Siembra dual esclerotial sin ventaja en medio PALechuga.**

En los gráficos 3.33 y 3.34 se evidencia de igual modo similar comportamiento de los hongos en el medio PALechuga, pero con ligera mejora en el crecimiento del esclerote, como se determinó en las pruebas preliminares de medios. Ante las tendencias similares, podemos indicar que los tres medios ofrecieron semejantes condiciones de crecimiento a los tres hongos, pero con la amplia diferencia de que la existencia de ventaja de crecimiento para *Sclerotinia* cambia de manera significativa los resultados del crecimiento dual e incluso disminuye o no permite la expresión completa de los *Trichoderma* como cuando no se ofrece ventaja al patógeno. Además, en cierto modo la siembra con hifas de *Sclerotinia* ofrece mejores posibilidades de crecimiento que cuando se utilizan esclerotes.

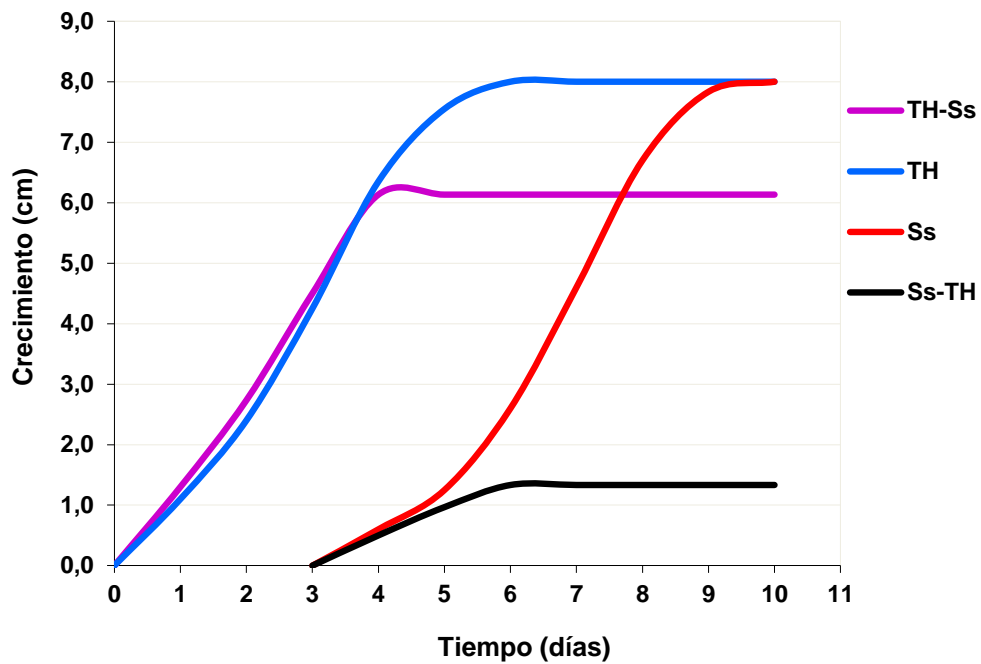


Gráfico 3.33. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. harzianum* y *S. sclerotiorum* con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia*, medio modificado PALechuga.

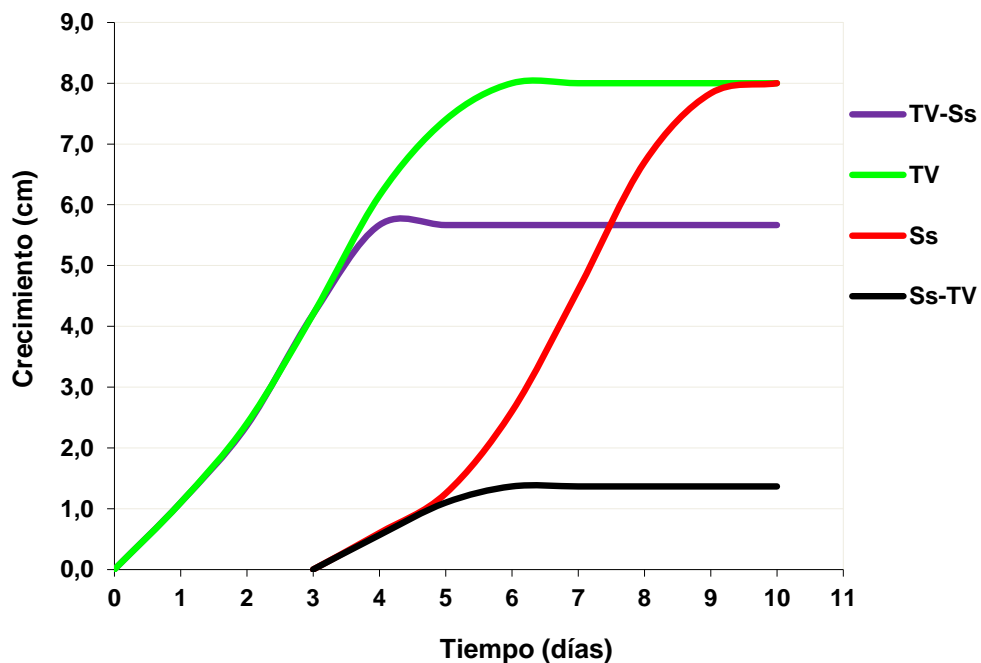


Gráfico 3.34. Tendencia de crecimiento dual e individual de las colonias de *T. viride* y *S. sclerotiorum*, con inóculo esclerotial y sin ventaja para *Sclerotinia* en medio modificado PALechuga.

Todas estas diferencias de expresiones antagónicas y de crecimiento de los hongos en los medios, como una forma de revelar las relaciones entre controlador y patógeno, nos permitieron proponer una extensión teórica de propuesta de observaciones de trabajo antagónico de los *Trichoderma* sobre *Sclerotinia*, que se desarrolla más adelante.

### 3.3. EVALUACIÓN ADICIONAL DEL CRECIMIENTO DUAL DE *Sclerotinia sclerotiorum* CON Y SIN VENTAJA DE TIEMPO, EN RELACIÓN A LOS ANTAGONISTAS EN TRES MEDIOS DE CULTIVO.

En el siguiente sub título se expone el resumen de las relaciones antagónicas y de crecimiento de los tres hongos en crecimiento dual observadas en las pruebas discutidas anteriormente, para observar por separado más de cerca lo ocurrido.

Un primer análisis de resultados de crecimiento por parejas (sin ventaja versus con ventaja), prescindiendo del tipo de medio, revela lo contradictorio de la capacidad antagónica de los *Trichoderma* ente *Sclerotinia*.

Un segundo análisis de medios de indica que los tres medios fueron importantes para caracterizar las capacidades de crecimiento y de las relaciones antagónicas.

Un tercer análisis sobre el tipo de inóculo muestra que la siembra con hifas tiene una ligera ventaja, a veces importante, sobre los resultados del crecimiento en cultivo dual, especialmente en la formación de esclerotes, lo cual supone que *Sclerotinia* puede sacar ventaja ante la presencia de los *Trichoderma*. La siembra con esclerotes tiene la desventaja de formar colonias algo lentas, situación que es aprovechada por los *Trichoderma* para ejercer mejor supresión de las colonias de *Sclerotinia*.

Un cuarto análisis sobre el trabajo de las dos especies de *Trichoderma*, revela que ambas se comportaron de manera diferente durante su

relación son el patógeno en medio dual y en interacción con el medio de cultivo. Podemos indicar que *T. harzianum* utilizó mejor el medio con cayhua y *T. viride* el medio con apio.

También se puede indicar que en la siembra con esclerotes, el crecimiento tardío de *Sclerotinia* favoreció para que ambos *Trichoderma* utilizaron mejor los medios, especialmente el medio con cayhua.

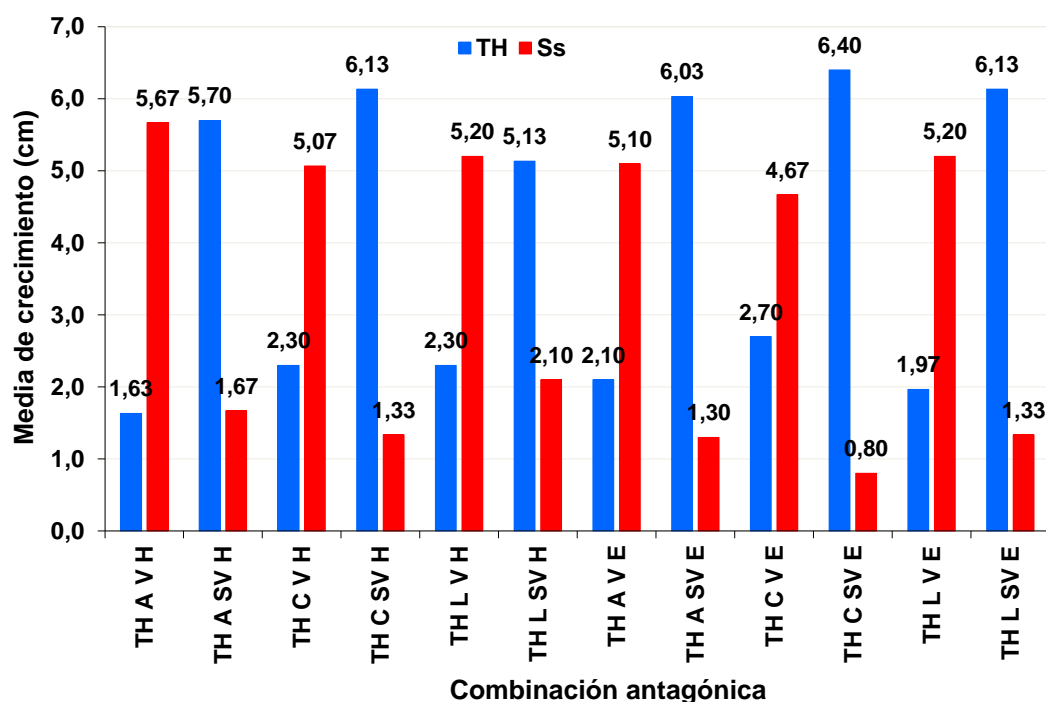


Gráfico 3.35. Crecimiento dual de las colonias de *S. sclerotiorum* y *T. harzianum* con y sin ventaja de tiempo para el patógeno en medios modificados.

- TH.A.V.H. : *T. harzianum* – Apio – Con Ventaja – Siembra Hifal.
- TH.A.SV.H. : *T. harzianum* – Apio – Sin Ventaja – Siembra Hifal.
- TH.C.V.H. : *T. harzianum* – Cayhua – Con Ventaja – Siembra Hifal.
- TH.C.SV.H. : *T. harzianum* – Cayhua – Sin Ventaja – Siembra Hifal.
- TH.L.V.H. : *T. harzianum* – Lechuga – Con Ventaja – Siembra Hifal.
- TH.L.SV.H. : *T. harzianum* – Lechuga – Sin Ventaja – Siembra Hifal.
- TH.A.V.E. : *T. harzianum* – Apio – Con Ventaja – Siembra Esclerotial.
- TH.A.SV.E. : *T. harzianum* – Apio – Sin Ventaja – Siembra Esclerotial.
- TH.C.V.E. : *T. harzianum* – Cayhua – Con Ventaja – Siembra Esclerotial.
- TH.C.SV.E. : *T. harzianum* – Cayhua – Sin Ventaja – Siembra Esclerotial.

TH.L.V.E. : *T. harzianum* – Lechuga – Con Ventaja – Siembra Esclerotial.

TH.L.SV.E. : *T. harzianum* – Lechuga – Sin Ventaja – Siembra Esclerotial.

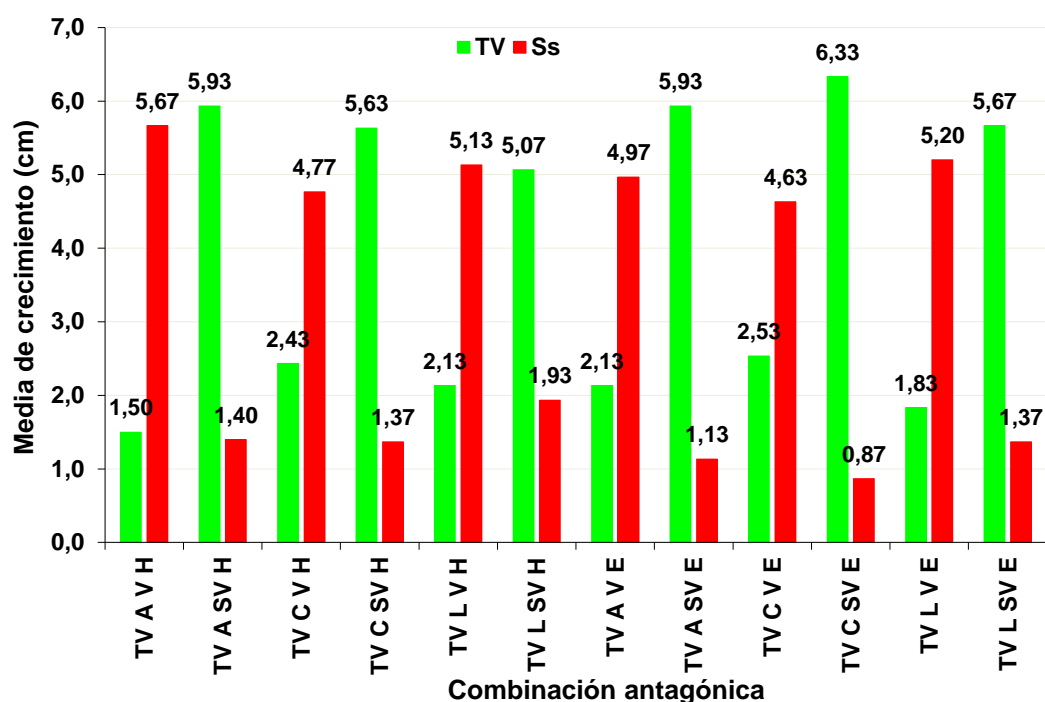


Gráfico 3.36. Crecimiento dual de las colonias de *S. sclerotiorum* y *T. viride* con y sin ventaja de tiempo para el patógeno en medios modificados.

TV.A.V.H. : *T. viride* – Apio – Con Ventaja – Siembra Hifal.

TV.A.SV.H. : *T. viride* – Apio – Sin Ventaja – Siembra Hifal.

TV.C.V.H. : *T. viride* – Cayhua – Con Ventaja – Siembra Hifal.

TV.C.SV.H. : *T. viride* – Cayhua – Sin Ventaja – Siembra Hifal.

TV.L.V.H. : *T. viride* – Lechuga – Con Ventaja – Siembra Hifal.

TV.L.SV.H. : *T. viride* – Lechuga – Sin Ventaja – Siembra Hifal.

TV.A.V.E. : *T. viride* – Apio – Con Ventaja – Siembra Esclerotial.

TV.A.SV.E. : *T. viride* – Apio – Sin Ventaja – Siembra Esclerotial.

TV.C.V.E. : *T. viride* – Cayhua – Con Ventaja – Siembra Esclerotial.

TV.C.SV.E. : *T. viride* – Cayhua – Sin Ventaja – Siembra Esclerotial.

TV.L.V.E. : *T. viride* – Lechuga – Con Ventaja – Siembra Esclerotial.

TV.L.SV.E. : *T. viride* – Lechuga – Sin Ventaja – Siembra Esclerotial.

### 3.4. CRECIMIENTO DE LA COLONIA DE *Sclerotinia sclerotiorum* POR CULTIVO DUAL EN TRES MEDIOS, CON Y SIN VENTAJA Y USO DE HIFAS Y ESCLEROTES.

El gráfico 3.37 muestra la evidente capacidad de crecimiento de la colonia cuando se le otorgó ventaja a *Sclerotinia*, ante la presencia de ambos *Trichoderma*, e incluso usando hifas o esclerotes; prácticamente, es la ventaja de tiempo lo que se confiere a hifas o esclerotes aprovechar ese tiempo para sobreponerse a los *Trichoderma* y tolerar o superar su presencia.

En razón a estas respuestas, el análisis estadístico adicional para estos datos exclusivos de *Sclerotinia*, indicaron diferencias altamente significativas entre los diámetros radiales obtenidos con y sin ventaja, favoreciendo proporcionalmente a los que se obtuvieron durante el crecimiento con ventaja.

Cuadro 3.7. Análisis de la variabilidad del crecimiento de las colonias de *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivo dual con *T. harzianum* y *T. viride*, con y sin ventaja en tres medios modificados.

Fuente de variabilidad	GL	SC	CM	Fc	Ft (0.05)	Ft (0.01)	Signif.
Medios	2	3.48	1.74	38.78	3.21	5.12	**
Tratamientos	23	252.55	10.98	244.70	1.80	2.31	**
Error	46	2.06	0.04				
Total	71	258.10					

C.V. = 2.60%

En el cuadro 3.7 se muestra las diferencias estadísticas altamente significativo que evidenciaron el crecimiento dual en los tres medios de los tratamientos evaluados, resultando el crecimiento de *Sclerotinia* en medio PAApio, con inóculo hifal y ventaja de tiempo 5.67 cm, el más alto en promedio; comparado en medio PACayhua, en las mismas condiciones *Sclerotinia* creció solo 4.63 cm.



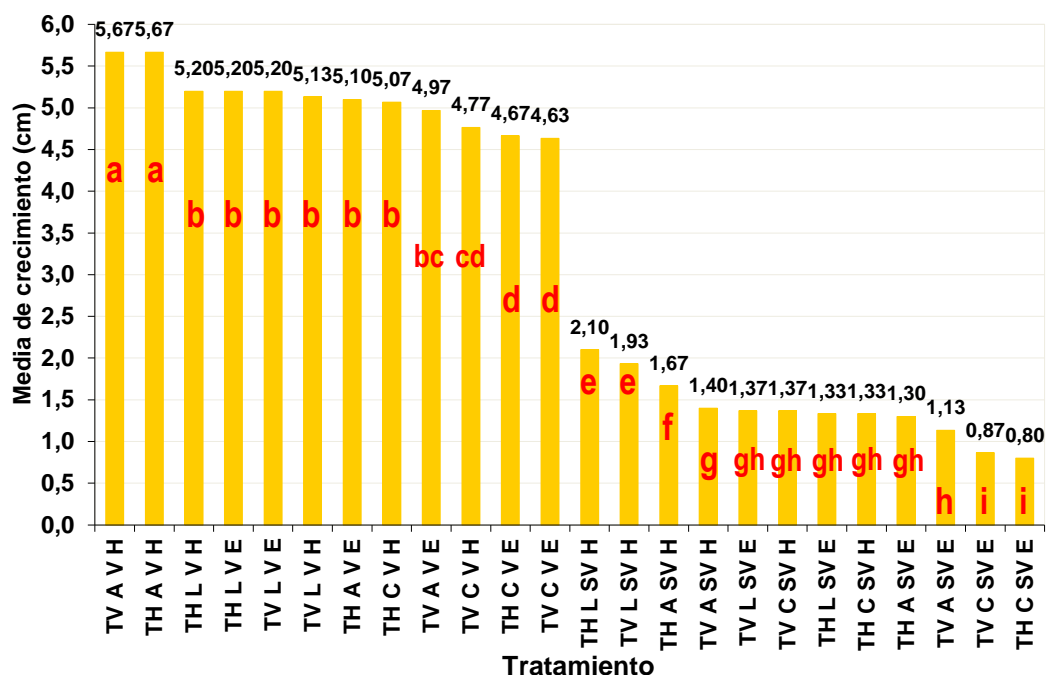
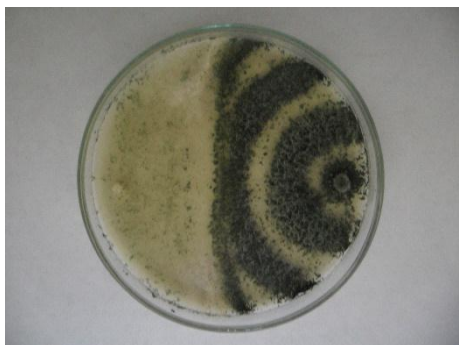


Gráfico 3.37. Prueba de Tukey para el crecimiento dual de *S. sclerotiorum* con *T. harzianum* y *T. viride* con y sin ventaja de tiempo para *Sclerotinia* en tres medios modificados.

### 3.5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESULTADOS DE ANTAGONISMO EN CRECIMIENTO DUAL CON Y SIN VENTAJA PARA *Sclerotinia sclerotiorum* MEDIANTE SIEMBRA CON HIFAS.

Se observó que existe influencia importante del medio en la interacción entre el hongo parásito y los antagonistas. El medio con **infusión de apio** induce o favorece un crecimiento acelerado de *Sclerotinia* cuando se **siembra a nivel de hifas**, tanto **con ventaja y sin ella**, de modo que las dos especies de *Trichoderma* no logran suprimir por completo a *Sclerotinia*; solamente *T. harzianum* llega a cubrir parcialmente al micelio de *Sclerotinia* en la siembra sin ventaja, pero no cuando existe ventaja (fotografías 3.107 y 3.108). En este medio, *Sclerotinia* llega a frenar mejor el crecimiento de *T. harzianum* y es capaz de iniciar la formación de esclerotes a los 14 días. En cuanto a *T. viride*, *Sclerotinia* es suprimido de manera significativa, entendiéndose que *Sclerotinia* no puede limitar el

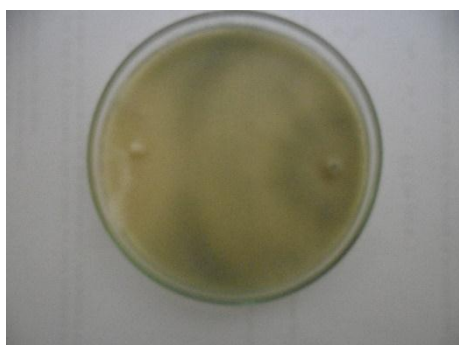
crecimiento de *T. viride*, como lo hace con *T. harzianum*, cuando crece sin ventaja. Cuando existe ventaja, *Sclerotinia* muestra mayor efecto de reducción del crecimiento de *T. viride*, e incluso hasta los 14 días ya formó algunos esclerotes (fotografías 3.109 y 3.110).



Fot. 3.107. Crecimiento de *S. s.* sin ventaja ante *T. harzianum* a 14 días de la siembra en PAApio.



Fot. 3.108. Crecimiento de *S. s.* con ventaja ante *T. harzianum* a 14 días de la siembra en PAApio.



Fot. 3.109. Crecimiento de *Sclerotinia* sin ventaja ante *T. viride* a 14 días de la siembra en PAApio.



Fot. 3.110. Crecimiento de *Sclerotinia* con ventaja ante *T. viride* a 14 días de la siembra en PAApio.

En la siembra **sin ventaja**, el **medio con cayhua** ofreció menos posibilidad de crecimiento a *Sclerotinia*, a diferencia de lo que ocurrió en los medios con apio y lechuga. Ambos *Trichoderma* crecieron más rápido y limitaron el avance micelial de *Sclerotinia*, incluso *T. harzianum* remontó el micelio de *Sclerotinia* para crecer y esporular ligeramente sobre el patógeno, evidenciándose así la capacidad de este *Trichoderma* de suprimir de manera significativa al patógeno cuando éste se encuentra con desventaja de crecimiento en la placa. *T. viride* también suprime a *Sclerotinia*, pero sin remontar su colonia.

En la **siembra con ventaja** en el **medio con cayhua**, *Sclerotinia* frena el crecimiento de ambos *Trichoderma* en menor proporción, pero solo *T. harzianum* logra remontar la colonia de *Sclerotinia*, y éste forma pocos esclerotes a los 14 días. En *T. viride* se observó menor limitación en su crecimiento, y no logra sobrepasar a *Sclerotinia*, quedando limitado a una tercera parte de la placa (fotografía 3.114), con la ventaja, *Sclerotinia* logra producir dos esclerotes.



Fot. 3.111. Crecimiento de S. s. **sin ventaja** a *T. harzianum* a 14 días de la siembra en PACayhua.



Fot. 3.112. Crecimiento de S. s. **con ventaja** a *T. harzianum* a 14 días de la siembra en PACayhua.



Fot. 3.113. Crecimiento de S. s. **sin ventaja** a *T. viride* a 14 días de la siembra en medio PACayhua.



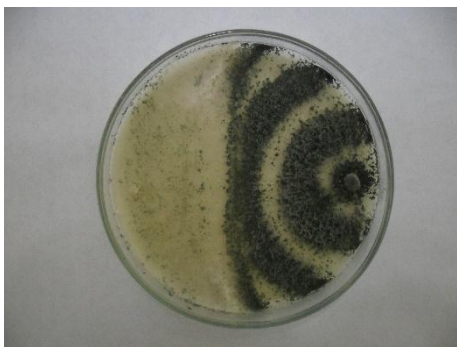
Fot. 3.114. Crecimiento de S. s. **con ventaja** a *T. viride* a 14 días de la siembra en medio PACayhua.

En la siembra **con ventaja**, el **medio con lechuga** se comporta semejante al medio con apio, es decir *Sclerotinia* frena el crecimiento de *T. harzianum* y éste no logra remontar el micelio de *Sclerotinia*, el cual alcanza a formar algunos esclerotes. En *T. viride* se observó mayor limitación en su crecimiento, al mismo tiempo que el antagonista no sobrepasa al micelio de *Sclerotinia*, es decir queda limitado a un sector de

tamaño mediano a pequeño (fotografías 3.116 y 3.118). Por su parte *Sclerotinia*, inicia buena formación de esclerotes.

En cuanto a la **siembra sin ventaja**, se registró diferencias importantes en el **medio con lechuga**; el hongo *T. harzianum* superó ampliamente a *Sclerotinia* limitándole casi totalmente su crecimiento, e incluso las hifas de *T. harzianum* cubrieron el micelio de *Sclerotinia* con hifas que permitieron ligera o mediana esporulación sobre el micelio de *Sclerotinia*. Se evidencia, de este modo, que el medio con lechuga no favorece a *Sclerotinia* cuando éste **no tiene ventaja de crecimiento** respecto a *T. harzianum*.

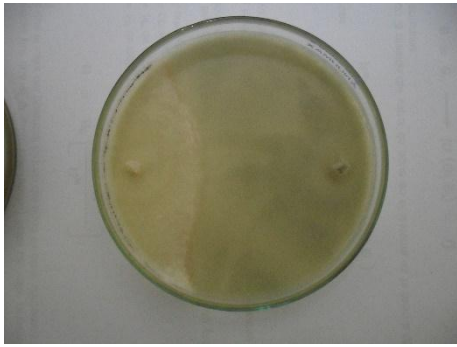
En la **siembra sin ventaja**, usando **medio con lechuga**, el hongo *T. viride* limitó a *Sclerotinia* a ocupar solamente 1/4 - 1/5 del espacio en la placa (fotografía 3.117), pero no pudo anularlo de mejor manera como ocurre con *T. harzianum* en este medio. Por otra parte, *T. viride* no logra remontar o cubrir la colonia de *Sclerotinia* como ocurrió con *T. harzianum*. Lo notable es que aún sin ventaja, *Sclerotinia* logra mantenerse sin que *T. viride* lo anule, incluso no permite que lo cubra con micelio y logre esporular sobre él. Se comprueba una vez más que *T. viride* **interacciona con el medio** para mostrarse más o menos efectivo en su antagonismo ante *Sclerotinia*, según exista o no ventaja para el patógeno.



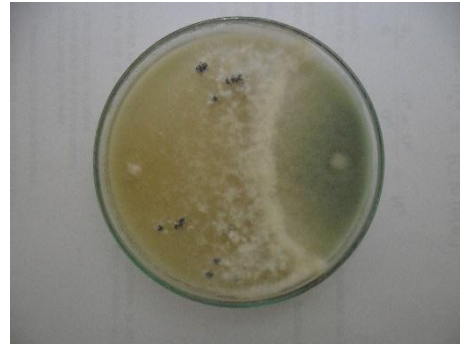
Fot. 3.115. Crecimiento de *S. s.* **sin** ventaja ante *T. harzianum* a 14 días de la siembra en PALechuga.



Fot. 3.116. Crecimiento de *S. s.* **con** ventaja ante *T. harzianum* a 14 días de la siembra en PALechuga.



Fot. 3.117. Crecimiento de *S. s.* sin ventaja ante a *T. viride* a 14 días de la siembra en medio PALechnuga.



Fot. 3.118. Crecimiento de *S. s.* con ventaja ante a *T. viride* a 14 días de la siembra en PALechnuga.

### 3.6. EFECTO DE ANTAGONISMO SUPRESIVO POR INOCULACIÓN DIRECTA DEL PATÓGENO CON ESPORAS DE LAS DOS ESPECIES DE *Trichoderma*.

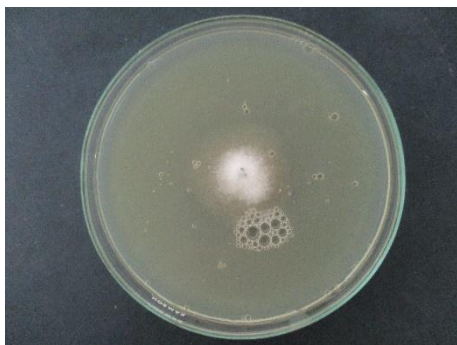
Ante la variabilidad de respuestas de antagonismo en los medios de cultivo en siembra con y sin ventaja para *Sclerotinia*, la tercera prueba de cultivo dual se orientó a probar la inoculación de ambos *Trichoderma* sobre las estructuras del patógeno utilizadas como inóculo (hifas y esclerotes) utilizando medio modificado PACayhua. Al respecto no se encontraron referencias para comparación, por lo que esta es la primera información que se ofrece a manera de complemento para probar la actividad antagónica de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia* en el medio PACayhua.

Una de las dificultades observadas en las pruebas de antagonismo supresivo fue la diversidad de comportamientos en las relaciones entre *Sclerotinia* y los *Trichoderma*, de modo que se planteó otra vía técnica para evaluar una vez más la efectividad de *Trichoderma* sobre el patógeno *Sclerotinia*. Lo complicado se presentó al aplicar una metodología donde existan iguales condiciones o semejantes durante la prueba de antagonismo para ambos, aun cuando las pruebas in vitro no reflejen las situaciones que ocurren en el suelo o dentro de la planta parasitada.

Como idea primigenia, el procedimiento sugerido considera poner en contacto directo al patógeno y al antagonista, colocando esporas sobre el esclerote maduro y sobre un trozo de medio de cultivo con hifas. Para este propósito se establecieron dos dosis intermedias promedio de esporas (25,000 y 50,000 conidias de ambos *Trichoderma* por inoculación), que se transportaron al medio PACayhua con ayuda de una aguja estéril de punta fina.

a) INOCULACIÓN A HIFAS EN SIEMBRA CON VENTAJA DE DOS DÍAS PARA *Sclerotinia sclerotiorum*, A LA DOSIS DE 25,000 ESPORAS DE *Trichoderma*.

Las pruebas iniciales de esta forma de inoculación, indicaron que *Sclerotinia* necesita de algunos días de ventaja de crecimiento, tal como se hizo en las otras pruebas, porque de otro modo, el rápido crecimiento de los *Trichoderma* sembrados al mismo tiempo, impiden que *Sclerotinia* pueda iniciar su crecimiento. En ese caso, el establecimiento de una cantidad fija de inóculo (25,000 esporas) de *Trichoderma* y ofreciendo 2 días de ventaja a *Sclerotinia*, permitió observar mejor la capacidad antagónica de los *Trichoderma* y el nivel de respuesta de *Sclerotinia*.



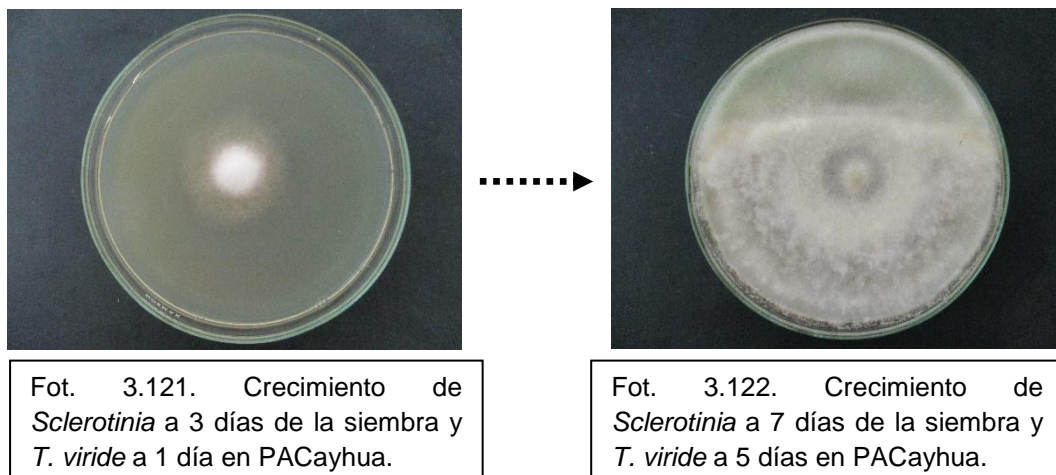
Fot. 3.119. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y *T. harzianum* a 1 día en PACayhua.



Fot. 3.120. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y *T. harzianum* a 5 días PACayhua.

En las placas anteriores (fotografías 3.119 y 3.120), se evidencia notoriamente que *Sclerotinia* no se deja dominar por completo por *T. harzianum*, alcanzando a crecer hacia los bordes y limitando a *Trichoderma* a quedar ubicado al centro de la placa. En cierto modo, *T.*

*harzianum* suprime una parte de la colonia de *Sclerotinia*, pero la ventaja concedida a *Sclerotinia* le permite sobrevivir en una parte de la placa. Las 25,000 esporas inoculadas fueron suficiente para que *Trichoderma* pueda establecerse en una parte del medio.



En las placas siguientes (fotografías 3.121 y 3.122) a los 3 días de la siembra, *Sclerotinia* muestra buen crecimiento y *T. viride* ya sembrado sobre el patógeno todavía no asoma su micelio. Después de 4 días, *Sclerotinia* logró crecer mucho más que *T. viride*, mientras que el antagonista quedó limitado a un extremo de la placa. En esta relación, *Sclerotinia* logró superar la presencia y crecimiento de *T. viride* con mayor fortaleza que en el caso de *T. harzianum*.

Estas dos manifestaciones, son una clara muestra de que la capacidad supresiva extrema que expresan los *Trichoderma* cuando no se le da ventaja a *Sclerotinia*, es frenada significativamente cuando el patógeno tiene ventaja de crecimiento en la placa.

b) INOCULACIÓN A HIFAS EN SIEMBRA CON VENTAJA DE DOS DÍAS PARA *Sclerotinia sclerotiorum*, A LA DOSIS DE 50,000 ESPORAS DE *Trichoderma*.

La siguiente prueba utilizó una doble cantidad de esporas, para determinar si la cantidad puede ofrecer alguna ventaja, esta vez a *Trichoderma*, teniendo en cuenta la ventaja que ya tiene *Sclerotinia*.

Siempre en las mismas condiciones de inoculación e incubación, se observó que a un día de la inoculación 50,000 esporas de *Trichoderma* sobre las hifas de *Sclerotinia*, el antagonista *T. harzianum* comenzó a ocupar en el cultivo un espacio ocho veces mayor que *Sclerotinia* (fotografía 3.123); esta es la primera evidencia que la cantidad de esporas es importante en la colonización del medio.



Fot. 3.123. Crecimiento de *S. s.* a 3 días de la siembra y *T. harzianum* a 1 día en PACayhua.



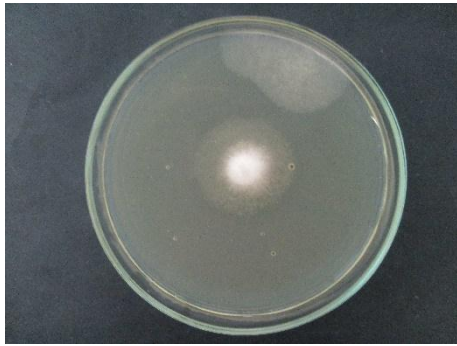
Fot. 3.124. Crecimiento de *S. s.* a 7 días de la siembra y *T. harzianum* a 5 días en PACayhua.

Después de 7 días de la siembra de *Sclerotinia* y 5 días de *T. harzianum*, el antagonista ocupó la mayor parte de la placa (70%), quedando el patógeno limitado a un sector de 30% en la placa. El crecimiento de *T. harzianum* fue rápido, alcanzando a remontar una parte de la colonia de *Sclerotinia*.

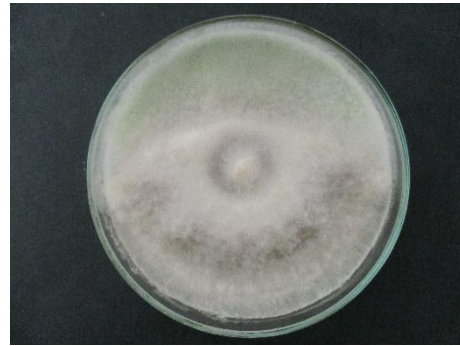
En el caso de *T. viride*, a un día de la siembra, también mejoró su crecimiento, pero más limitado, ocupando un 12.5% de la placa junto con *Sclerotinia* (fotografía 3.125); el halo en la colonia es el crecimiento de *T. viride* que se separa del micelio de la pequeña colonia de *Sclerotinia*.

Después de 7 días de la siembra de *Sclerotinia* y 5 días de *T. viride*, el patógeno prácticamente desplazó o aisló al antagonista a un sector de la placa, mientras que *Sclerotinia* creció favorablemente, ocupando 65% de la placa. Esta es otra evidencia de que en *T. viride*; el aumento de esporas al doble (50,000), no fue suficiente para bloquear a *Sclerotinia*, como lo hizo *T. harzianum*.





Fot. 3.125. Crecimiento de *Sclerotinia* a 3 días de la siembra y de *T. viride* a 1 día en PACayhua.



Fot. 3.126. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y de *T. viride* a 5 días en PACayhua.

Como conclusión de estas pruebas podemos indicar que el aumento de inóculo de *T. harzianum* es importante en su trabajo de supresión del crecimiento de *Sclerotinia*, cuando se usan hifas en la siembra; en el caso de *T. viride* parece ser que la reducción de su efecto de supresión puede deberse a su menor capacidad ante *Sclerotinia* y porque el medio es ampliamente favorable para el crecimiento del patógeno.

c) INOCULACIÓN A ESCLEROTES EN SIEMBRA CON VENTAJA DE TRES DÍAS PARA *Sclerotinia sclerotiorum*, A LA DOSIS DE 25,000 ESPORAS DE *Trichoderma*.

La contraparte de la investigación, sobre el efecto de la inoculación directa del antagonista, fue usar esta vez los esclerotes de *Sclerotinia* para la siembra. En la placa (fotografía 3.127), se observó que a los 4 días de la siembra del esclerote, el antagonista *T. harzianum* comenzó a crecer rápidamente cubriendo al esclerote, que apenas pudo formar algo de micelio; en este momento se expresa nuevamente la lentitud de crecimiento del esclerote de *Sclerotinia*, que no puede evadir a las 25,000 esporas del antagonista, como lo hizo la siembra hifal. Por ello, después de 3 días más (a 7 días de la siembra), prácticamente el antagonista *T. harzianum* suprimió en forma total a *Sclerotinia* ocupando toda la placa (fotografía 3.128).



Fot. 3.127. Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra y *T. harzianum* a 1 día en PACayhua.



Fot. 3.128. Crecimiento de *S. s.* a 7 días de la siembra y de *T. harzianum* a 4 días en PACayhua.

En cuanto a *T. viride*, a los 4 días de la siembra y a un día de la colocación del antagonista sobre el esclerote, el crecimiento de *T. viride* también fue importante, registrándose un ligero crecimiento del esclerote, pero también se comenzó a mostrar mejor capacidad de *T. viride* cuando la siembra es con esclerote. A los 7 días de la siembra, el esclerote logró cierto crecimiento producto de la ligera aparición al comienzo, tratando de escapar del antagonista, quedando confinado a un pequeño sector de la placa. Esta vez, *T. viride* mostró que tiene mayor capacidad de supresión de *Sclerotinia* cuando la siembra dual es a nivel de esclerote (fotografía 3.130).



Fot. 3.129. Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra y de *T. viride* a 1 día en PACayhua.



Fot. 3.130. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y de *T. viride* a 4 días en PACayhua.

- d) INOCULACIÓN A ESCLEROTES EN SIEMBRA CON VENTAJA DE TRES DÍAS PARA *S. sclerotiorum*, A LA DOSIS DE 50,000 ESPORAS DE *Trichoderma*.

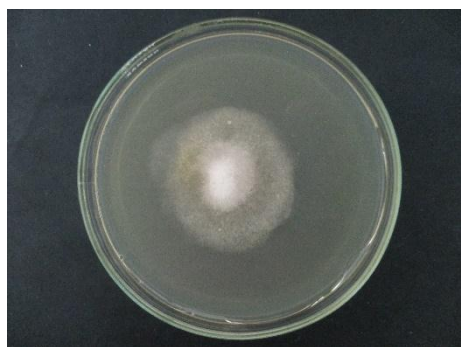
La inoculación de esclerotes con 50,000 esporas de *Trichoderma harzianum*, permitió comprobar que, aún con ventaja de 3 días, *Sclerotinia* no tiene ninguna posibilidad de superar el crecimiento del antagonista, incluso mucho menos que cuando se inocula con 25,000 esporas.



Fot. 3.131. Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra y *T. harzianum* a 1 día en PACayhua.



Fot. 3.132. Crecimiento de *S. s.* a 7 días de la siembra y *T. harzianum* a 4 días en PACayhua.



Fot. 3.133. Crecimiento de *Sclerotinia* a 4 días de la siembra y *T. viride* a 1 día en PACayhua.



Fot. 3.134. Crecimiento de *Sclerotinia* a 7 días de la siembra y *T. viride* a 4 días en PACayhua.

De igual modo que en *T. harzianum*, la mayor densidad de inóculo de *T. viride* sobre el esclerote impidió que éste pueda mostrar algunos rasgos de crecimiento junto al antagonista. Se evidencia así que, la capacidad de antagonismo supresivo depende también de la densidad de inóculo que hace contacto con el patógeno, y en este caso el esclerote tiene mucho más desventaja que cuando se siembra hifas.

## IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. CONCLUSIONES

- **Prueba de medios: PDA y modificados.**
  1. La dextrosa en el medio PDA tiene efecto retardador del crecimiento de hifas y formación de esclerotes en *Sclerotinia* y es favorable para los *Trichoderma*.
  2. En crecimiento dual en PDA a partir de hifas, con siembra al mismo tiempo, *Trichoderma* perjudicó el crecimiento micelial de *Sclerotinia* y la producción de esclerotes.
  3. En cultivo dual con PDA, ventaja para *Sclerotinia* y uso de esclerotes, mejoró el crecimiento de las colonias de *Sclerotinia*, disminuyendo en los *Trichoderma*.
  
- **Antagonismo con ventaja para *Sclerotinia* en tres medios.**
  - A. **Siembra hifal.**
    4. En medio PAApio el efecto opositor de *Sclerotinia* fue más notable para *T. harzianum* que para *T. viride*.
    5. En medio PAApio, *T. viride* tiene mayor efecto antagónico que *T. harzianum*.
    6. La presencia de ambos *Trichoderma* estimuló a *Sclerotinia* a crecer más rápido en todos los medios formando esclerotes tempranamente.

## **B. Siembra esclerotial.**

7. Con ventaja de 4 días para *Sclerotinia* en el medio PAApio, el crecimiento de los *Trichoderma* se redujo (Tv/Ss: 2.13/4.97 cm; Th/Ss: 2.10/5.10 cm), de igual modo que en el medio PACayhua, (Tv/Ss: 2.53/4.63 cm; Th/Ss: 2.70/4.67 cm).
8. En medio PALechuga el crecimiento de *Sclerotinia* se vio favorecido con crecimientos radiales altamente significativos (Th/Ss: 1.97/5.20 cm; Tv/Ss: 1.83/5.20 cm).
9. En los tres medios de cultivo, la formación de esclerotes disminuyeron significativamente.

### **• Antagonismo sin ventaja para *Sclerotinia* en tres medios.**

#### **A. Siembra hifal.**

10. En PAApio, los *Trichoderma* crecieron favorablemente (Tv. 5.93 y Th. 5.7 cm), mientras que *Sclerotinia* redujo su crecimiento radial entre (6.3 y 6.6 cm), por la acción supresiva de los *Trichoderma* desde el inicio de la siembra.
11. En PACayhua y siembra al mismo tiempo, *Sclerotinia* no tuvo posibilidades de contrarrestar el crecimiento de los *Trichoderma*.
12. En PALechuga, *Sclerotinia* creció entre (27 y 30% de superficie de la placa) en presencia de los *Trichoderma*, contrarrestando el avance de *Trichoderma*; mientras los antagonistas ocuparon entre 73 y 70%.

#### **B. Siembra esclerotial.**

13. En los medios PAApio y PALechuga, *Sclerotinia* tuvo mejor crecimiento. En PACayhua, *Sclerotinia* fue anulado por completo.
14. Por el crecimiento retardado del esclerote, en PAApio los *Trichoderma* crecieron sin oposición en relación a *Sclerotinia*, con dimensiones (Th/Ss: 6.03/1.13 y Tv/Ss: 5.93/1.30 cm) de diámetro.

15. En medio PACayhua en cultivo dual, el crecimiento de las colonias a partir del esclerote, registraron (Th/Ss: 6.4/0.80 cm. y Tv/Ss: 6.33/0.87 cm), en PALechuga los *Trichoderma* crecieron (Th/Ss: 6.13/1.33 y Tv/Ss: 5.67/1.37 cm) de diámetro.
- **Antagonismo por inoculación directa a hifas y esclerotes en PACayhua.**
    - A. **En hifas con dos días de ventaja para *Sclerotinia*.**
      16. Las 25,000 esporas inoculadas fue suficiente para que los *Trichoderma* puedan establecerse en una parte del medio, pero no para suprimir por completo a *Sclerotinia*.
      17. Después de 7 días de la siembra *Sclerotinia* ocupó el 65% de la placa aislando a *T. viride* a un sector de la placa. Las 50,000 esporas de *T. viride* no lograron suprimir a *Sclerotinia*, como lo hizo *T. harzianum*.
    - B. **En esclerotes con tres días de ventaja para *Sclerotinia*.**
      18. El esclerote de *Sclerotinia*, no puede evadir a las 25,000 esporas del antagonista, como ocurrió en la siembra hifal. A 7 días de la siembra, el antagonista *T. harzianum* suprimió en forma total a *Sclerotinia* ocupando toda la placa. *T. viride* expresó mejor capacidad de supresión de *Sclerotinia* a nivel de esclerote, pero no de hifas.
      19. Con la inoculación de 50,000 esporas de *T. harzianum* sobre esclerotes de *Sclerotinia*, aún con ventaja de 3 días, *Sclerotinia* no tiene ninguna posibilidad de superar el crecimiento del antagonista.
  - **Sobre la metodología de cultivo dual en medio nutritivo.**
    20. La evidencia de que *Sclerotinia* muestra posibilidades de contrarrestar el crecimiento de ambos *Trichoderma* en cultivo dual,

cuando se le da ventaja en la siembra, indica que el método de prueba de antagonismo in vitro tiene sus limitaciones y no es apropiado en el estudio de relaciones entre estos tres hongos.

#### **4.2. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar variabilidad de medios de cultivo para *Trichoderma* en relación a la diversidad patógenos con requerimientos nutricionales específicos.
2. Promover el uso de especies de *Trichoderma* en la supresión de hongos de importancia agrícola en cultivos de la región.

## LITERATURA CITADA

1. AGUAYSOL, N. C.; ROBLES, L.; GONZÁLES, V.; LOBO, R. y PLOPER, L. D. (2014). Detección de *Sclerotinia sclerotiorum* en Cultivos de Chía (*Salvia hispana*) en Tucumán durante la Campaña 2014. Avance Agroindustrial 35 (4). EEAOC. 2014. Argentina.  
[http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/479/20150122\\_101431000000.pdf](http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/479/20150122_101431000000.pdf)
2. ALMARAZ, S. A.; ALVARADO, R. D.; TLAPAL, B. B. y ESPINOZA, V. D. (2012). Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino de El Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, pp. 341-355.
3. ARIAS, L. A.; TAUTIVA, L. A.; PIEDRAHÍTA, W. y CHAVES B. (2007). Evaluación de tres métodos de control del Moho Blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ingenieros agrónomos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Agronomía Colombiana 25(1), pp. 131-141.
4. ASTORGA, Q. K.; MENESES, M. K.; ZÚÑIGA, V. C.; BRENES, M. J. y RIVERA, M. J. (2013). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tecnología en Marcha. Vol. 27, N° 2, pp. 82-91.
5. BARNETT, H. L. y HUNTER, B. B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company Mineapolis Minnesota - USA. 241 p.
6. BETALLELUZ, M. A. (2002). Control Microbiológico de *Phytophthora infestans* en el Tomate a través de Hongos Antagonistas (*Trichoderma lignorum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Gliocladium virens*) Bajo Condiciones Controladas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela de Formación Profesional de Biología. Tesis. Ayacucho - Perú. 78 p.



7. CAIZA, V. E. (2013). Colección, Identificación y Pruebas de Eficacia in vitro de (*Trichoderma* spp.). En el Control Biológico de (*Botrytis cinerea*) en la Finca Florícola Picasso Roses. Universidad Politécnica Salesiana. Sede Quito. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Ecuador. 100 p.  
<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456/5073/1/UPSCYT00104.pdf>
8. CAMARENA, J. A. (2012). Efecto de la Actividad Metabólica de Cepas de Hongos Antagonistas sobre *Alternaria alternata* (fr.). Causante de la Mancha Parda en Cítricos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela Profesional de Ciencias Biológicas. Tesis. Lima - Perú. 84 p.  
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1418/1/CamarenaJ.pdf>
9. CASTILLO, L. E. (2004). Evaluación in vitro de la Capacidad Biocontroladora de tres Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. a tres Temperaturas de Incubación, sobre *Sclerotium rolfsii*; Agente Causal de Pudrición Blanca en Remolacha. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Agronomía. Tesis. Talca - Chile. 67 p.  
<http://dspace.utalca.cl:8888/ciencias agrarias/41872.pdf>
10. CASTRO, A. M. y RIVILLAS, C. A. (2012). *Trichoderma* spp. Modos de Acción, Eficacia y usos en el Cultivo de Café. Centro de Investigaciones de Café. Boletín Técnico - Cenicafé. Caldas - Colombia. 31 p.  
<http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/577/1/038.pdf>
11. CHAVEZ M. P. (2006). Producción de *Trichoderma* spp. y Evaluación de su Efecto en Cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Microbiología Industrial - Agrícola y Veterinaria. Tesis. Bogotá - Colombia. 178 p.  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
12. CORREA, S.; MELLO, M.; ÁVILA, Z. R.; MINARÉ, B. L.; PÁDUA, R. R. y GOMES, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control

- biológico de *Sclerotium rolfsii*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. Fitosanidad. Vol. 11, Núm. 1, pp. 3-9.
13. CUNDOM, M. A.; MAZZA DE GAIAD, S. M.; MAZZANTI DE CASTAÑÓN, M. A.; GUTIÉRREZ DE ARRIOLA, S. A. y COUTINHO, M. (1997). Actividad Antagónica in vitro de Hongos Saprófitos sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE Corrientes Argentina.  
<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/agrarias/a-037.pdf>
  14. CURVELO, L. y ROJAS, J. A. (2010). Revisión Preliminar de Medios de Cultivo Empleados en Estudios de Microorganismos de los Phylums: Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como Agentes Causantes de Enfermedades en Plantas. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial - Agrícola y Veterinaria. Bogotá - Colombia. 86 p.  
<http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8741/1/tesis680.pdf>
  15. DELGADO, K. L. y ARBELAEZ, T. G. (1990). Control de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en crisantemo y habichuela con diferentes aislamientos de *Trichoderma* y con fungicidas. Agronomía de Colombia. Volumen 7: pp. 33-39.
  16. DHINGRA, O. D. and J. B. SINCLAIR. (2003). Basic Plant Pathology Methods. Lewis Publishers, CRC. Second Edition. London, England. 484 p.
  17. EZZIYYANI, M.; PÉREZ, S. C.; AHMED, S. A.; REQUENA M. E. y CANDELA, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. España. Anales de Biología 26, pp. 35-45.
  18. FRENCH, H. (1985). Métodos de investigación en laboratorio. Turrialba, San José, Costa Rica, 345 p.
  19. GONZALES, J. E. (2002). Control Biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* Schlecht: Mediante Bacterias Antagonistas, *Trichoderma*

- spp. y Humus de Lombriz. Universidad Nacional la Molina. Escuela de Post Grado. Especialidad de Fitopatología. Tesis. Lima - Perú. 87 p.
20. GONZALES, C. R. (2012). Evaluación Antagónica in vitro e Invernadero de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Formación Profesional de Agronomía. Tesis. Ayacucho - Perú. 97 p.
  21. GUILCAPI, P. E. D. (2009). Efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad caturra a nivel de vivero. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Agronómica. Tesis. Riobamba - Ecuador. 73 p.
  22. HEFFER, V. y KENNETH, B. J. (2002). El Moho Blanco (*Sclerotinia*). El Instructor Fitosanitario. DOI. 10.1094/PHI-I-2007-0809-01. Universidad Estatal de Oregón.
  23. HOWELL, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. The American Phytopathological Society. Vol. 87 N°. 1, pp. 4-10.
  24. HOYOS, L.; DUQUE, G. y ORDUZ, S. (2008). Antagonismo in vitro *Trichoderma* spp. sobre Aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Bogotá - Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas Vol. 2, N° 1, pp. 76-86.  
<http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/Vol2/vol.2%20no.1/Vol.2.No.1.Art.7.pdf>
  25. LEYVA, Y. A. (2006). Evaluación *in vitro* de la Eficacia Biocontroladora de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, Aislada de Brócoli. Universidad de Talca. Escuela de Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias. Tesis. Talca - Chile. 28 p.  
<http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/4023/1/leivasantosyaine.pdf>

26. LÓPEZ, O. D. (2010). Microorganismos que Utilizan Oxalato de Calcio como Antagonistas Potenciales a *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación. Para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR - Sinaloa. México. 72 p.  
<http://tesis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/10419/1/365.pdf>
27. MARTÍNEZ, Z. A. (2008). Algunos Aspectos Epidemiológicos del Moho Blanco de la Lechuga (*Lactuca sativa* L.) en dos Municipios Productores de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Tesis. Bogotá - Colombia. 99 p.  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis110.pdf>
28. MARTÍNEZ, B.; INFANTE, D. y REYES, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Universidad Agraria de La Habana. Cuba. Rev. Protección Veg. Vol. 28 N° 1, pp. 1-11.  
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
29. MICHEL, A. C. (2001). Cepas Nativas de *Trichoderma* spp., (Euscomycetes: Hypocreales), su Antibiosis y Micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Universidad de Colima. Tesis. Colima - México. 176 p.  
<http://digeset.ucol.mx/tesisposgrado/Pdf/Alejandro%20Casimiro%20Michel%20Aceves.pdf>
30. MICHEL, A. C.; OTERO, M. A.; ARIZA, R.; BARRIOS, A. y ALARCÓN, N. (2013). Eficiencia Biológica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc., en cacahuate. Avances en Investigación Agropecuaria, 17(3), pp. 89-107.
31. MINAG - CHILE. (2008). Resultados y Lecciones en Biocontrol de Enfermedades Fungosas con *Trichoderma* spp. Proyecto de Innovación en O'Higgins y del Maule. Fundación para la Innovación Agraria - MINAG. Chile.  
<http://itas.cl/wp/wp-content/uploads/2014/04/62LibroTrichoderma.pdf>

32. MORA, R. G. A.; LÓPEZ, M. M.; RAMÍREZ, D. C. M.; MARTÍNEZ, V. M. C.; ROMERO, U. C. A.; HERRERA, R. G. y FÉLIX, G. R. (2016). Evaluación de la susceptibilidad a *Sclerotinia sclerotiorum* en cuatro genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) micorrizados. Interciencia. Caracas - Venezuela. Vol. 41, Núm. 2, pp. 127-132.
33. PELUFFO, L. (2010). Caracterización de los Mecanismos de Defensa a *Sclerotinia sclerotiorum*, Agente causal de la Podredumbre Húmeda del Capítulo de Girasol a través del Estudio de Perfiles Metabólicos y Transcripcionales. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. INTA - Castelar Argentina. 122 p. Consultado 10 de agosto 2016.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4765Peluffo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4765Peluffo.pdf)
34. ORDÓÑEZ, C. (2014). Interacción de *Trichoderma viride* y Agentes Químicos Antifúngicos en el Crecimiento y Desarrollo de *Sclerotinia sclerotiorum*. Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco - México. 108 p.  
<http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/2267/1/Ordonez%20ValenciaCDCEdafologia2014.pdf>
35. PÉREZ, S.; PIEDRAHÍTA, W. y ARBELÁEZ, G. (2009). Patogénesis de la Pudrición Blanda de la Lechuga (*Lactuca sativa* L.) en la Sabana de Bogotá causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *Sclerotinia minor* Jagger. Una Revisión. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. Vol. 3, N° 2. Colombia, pp. 261-274.  
<http://www.soccolhort.com/revista/pdf/magazin/vol3/vol.3.%20no.2/patogenesis%20lettuce%20sclerotinia%20lechuga.pdf>
36. RAMOS, F. (2014). Cultivo de *Bacillus subtilis* cepa 105 en Biorreactor y su Actividad Antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Biotecnología. Tesis. Yautepec, Morelos - México. 39 p.

<http://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/12795/1/Tesis%20Floren%20Ramos%20G%C3%B3mez.pdf>

37. ROBLES, C. A. R. (2012). Uso de Microorganismos Antagonistas y Sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. Revista Centro de Biotecnología, pp. 34-43.
38. RODRÍGUEZ, V. J. (2002). Efecto Antagónico y Biocontrolador de Algunos Microorganismos Saprofíticos contra *Rhizoctonia solani* un Fitopatógeno causante del (Damping off) en plantas de Tomate. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis. Lima - Perú. 92 p. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Rodríguez/Introduccion.pdf>
39. RODRÍGUEZ, L. M. y VENEROS, T. R. (2011). Control biológico de *Trichoderma harzianum* sobre hongos patógenos de frutos postcosecha de *Carica papaya* procedente de zonas de distribución del distrito de Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo. Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas.
40. ROMERO, R. T. (2014). Cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con Jamaica, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum*. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Tesis. México. 84 p.
41. ROSELLÓ, J. L. (2003). Capacidad Antagónica de *Penicillium oxalicum* Currie y Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai Frente a Diferentes Agentes Fitopatógenos. Estudios Ecofisiológicos. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Tesis Doctoral. Valencia - España. 242 p. <file:///C:/Users/Usuario/Download/tesisUPV1934.pdf>
42. RUBIO, S. V. y FERERES, C. A. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA - CSIC). Departamento de Protección Vegetal. Madrid - España. 16 p.

43. SCHWARTZ, H. F. y PASTOR, C. M. (1988). El moho blanco del frijol y su manejo. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Serie: 04SB - 06.13. Cali - Colombia. 38 p.
44. SEPÚLVEDA, R. P. y REBUFEL, A. P. (2009). Detectan Fase Sexual del Hongo *Sclerotinia sclerotiorum*: Un Problema Adicional para el Control de la Enfermedad en Lechuga. INIA - Colombia. 53 p.  
<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR36253.pdf>
45. SERRANO, L. y GALINDO, E. (2007). Control Biológico de Organismos Fitopatógenos: un Reto Multidisciplinario. Revista UNAM. México, pp. 77-88.  
<http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control20Biologico%20Ciencia.pdf>
46. SMITH, A. (2007). Caracterización, Análisis Espacial y Manejo Integrado del Moho Blanco (*Sclerotinia minor* Jagger y *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en Lechuga Batavia (*Lactuca sativa* L. Var. *capitata* L.). En la Vereda la Moya (Cota Cundinamarca). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá - Colombia. 143 p.  
<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis292.pdf>
47. SOTO, L. J.; PÉREZ, M. A.; PEREREA, E.; CASTAÑEDA, R.; RODRÍGUEZ, N.; GONZALES, J.; GONZALES, L. A.; VIZA, R.; MACIAS, D. y GONZALES, N. (2005). Desarrollo y utilización de *Trichoderma viride* y *Gliocladium virens* como antagonistas de hongos fitopatógenos. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. INIFAT. Revista Agrotecnia. La Habana - Cuba.
48. SUÁREZ, M. C. L.; FERNÁNDEZ, B. R. J.; OSVALDO, V. N.; GÁMEZ, C. R. M. y PÁEZ, R. A. R. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. X, N°. 2, pp. 35-43.
49. TORRES, R. P. y GUERRERO, G. O. (2008). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* y preparados microbiales sobre patógenos en cultivos. Facultad de Ingeniería. Universidad de Nariño. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Colombia.

50. TOVAR, J. C. (2008). Evaluación de la Capacidad Antagonista “in vivo” de Aislamientos de *Trichoderma* spp., frente al Hongo Fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Tesis. Bogotá - Colombia. 81 p. Consultado 25 de julio 2016. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>



**ANEXO**

Colonias de *Trichoderma harzianum* y *T. viride* en tres medios modificados y PDA.



Fot. 01. Crecimiento de *T. harzianum* en medio PDA.



Fot. 02. Crecimiento de *T. viride* en medio PDA.



Fot. 03. Crecimiento de *T. harzianum* en medio PAApio.



Fot. 04. Crecimiento de *T. viride* en medio PAApio.



Fot. 05. Crecimiento de *T. harzianum* en medio PACayhua.



Fot. 06. Crecimiento de *T. viride* en medio PACayhua.



Fot. 07. Crecimiento de *T. harzianum* en medio PALechuga.



Fot. 08. Crecimiento de *T. viride* en medio PALechuga.

Colonias de *Sclerotinia sclerotiorum* en tres medios modificados y PDA.



Fot. 09. Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio PAApio.



Fot. 10. Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio PACayhua.



Fot. 11. Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio PACayhua.



Fot. 12. Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* en medio PACayhua.

Fruto de cayhua colonizado por *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fot. 13. Crecimiento de *S. sclerotiorum* en fruto cayhua a 14 días de inoculación hifal.



Fot. 14. Esclerotes de *S. sclerotiorum* obtenidos de fruto cayhua a 14 días de inoculación.

Fruto de cayhua infectada por *Sclerotinia sclerotiorum* con inóculo esclerotial.



Fot. 15. Infección de frutos de cayhua por *S. sclerotiorum* a 10 días de inoculación esclerotial.



Fot. 16. Infección de frutos de cayhua por *Sclerotinia* bañado con esporas de *T. viride* a 10 días.



Fot. 17. Infección de frutos de cayhua por *Sclerotinia* bañado con esporas de *T. harzianum* a 10 días.



Fot. 18. Infección de frutos de cayhua por *Sclerotinia* bañado con esporas de *T. harzianum* a 10 días.























Cuadro 07. Registro de crecimiento individual de las colonias de *Sclerotinia sclerotiorum*, con inóculo hifal en tres medios modificados y PDA.

PAApio				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	03/08/2016			
Crec. (cm/día)	SS	SS	SS	SS
04/08/2016	1.00	1.00	1.00	1.00
05/08/2016	2.20	2.10	2.15	2.15
06/08/2016	4.20	4.00	4.10	4.10
07/08/2016	7.00	6.80	6.90	6.90
08/08/2016	8.40	8.40	8.40	8.40
09/08/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
10/08/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
11/08/2016				

PACayhua				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	03/08/2016			
Crec. (cm/día)	SS	SS	SS	SS
04/08/2016	0.60	0.60	0.60	0.60
05/08/2016	1.40	1.50	1.45	1.45
06/08/2016	3.00	2.80	2.90	2.90
07/08/2016	5.20	5.00	5.10	5.10
08/08/2016	7.20	7.40	7.30	7.30
09/08/2016	8.50	8.40	8.45	8.45
10/08/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
11/08/2016				

PALchuga				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	03/08/2016			
Crec. (cm/día)	SS	SS	SS	SS
04/08/2016	1.00	1.00	1.00	1.00
05/08/2016	2.10	2.20	2.15	2.15
06/08/2016	4.20	4.30	4.25	4.25
07/08/2016	7.20	7.00	7.10	7.10
08/08/2016	8.50	8.60	8.55	8.55
09/08/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
10/08/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
11/08/2016				

PDA				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	03/08/2016			
Crec. (cm/día)	SS	SS	SS	SS
04/08/2016				0.00
05/08/2016				0.00
06/08/2016	0.60	0.80	0.70	0.70
07/08/2016	1.50	1.40	1.45	1.45
08/08/2016	1.80	1.80	1.80	1.80
09/08/2016	2.00	2.00	2.00	2.00
10/08/2016	2.00	2.00	2.00	2.00
11/08/2016				

Cuadro 08. Registro de crecimiento individual de las colonias de *Sclerotinia sclerotiorum*, con inóculo hifal en tres medios modificados y PDA.

PAApio				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	30/08/2016			
Crec. (cm/día)	Ss	Ss	Ss	Ss
03/09/2016	0.60	0.50	0.55	0.55
04/09/2016	1.20	1.10	1.15	1.15
05/09/2016	2.40	2.30	2.35	2.35
06/09/2016	4.20	4.20	4.20	4.20
07/09/2016	6.90	7.00	6.95	6.95
08/09/2016	8.90	8.90	8.90	8.90
09/09/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
10/09/2016				
11/09/2016				

PACayhua				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	30/08/2016			
Crec. (cm/día)	Ss	Ss	Ss	Ss
03/09/2016	0.50	0.50	0.50	0.50
04/09/2016	1.10	0.90	1.00	1.00
05/09/2016	2.20	2.00	2.10	2.10
06/09/2016	3.80	3.90	3.85	3.85
07/09/2016	6.00	6.10	6.10	6.07
08/09/2016	7.40	7.60	7.50	7.50
09/09/2016	8.50	8.40	8.45	8.45
10/09/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
11/09/2016				

PALchuga				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	30/08/2016			
Crec. (cm/día)	Ss	Ss	Ss	Ss
03/09/2016	0.60	0.60	0.60	0.60
04/09/2016	1.20	1.20	1.20	1.20
05/09/2016	2.20	2.40	2.30	2.30
06/09/2016	4.30	4.20	4.25	4.25
07/09/2016	7.00	7.00	7.00	7.00
08/09/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
09/09/2016	9.00	9.00	9.00	9.00
10/09/2016				
11/09/2016				

PDA				
Tratamiento	T1			Prom.
Repetición	r1	r2	r3	
Diámetro	30/08/2016			
Crec. (cm/día)	Ss	Ss	Ss	Ss
04/09/2016	0.20	0.20	0.20	0.20
05/09/2016	0.30	0.40	0.35	0.35
06/09/2016	0.50	0.50	0.50	0.50
07/09/2016	0.70	0.80	0.75	0.75
08/09/2016	1.00	1.20	1.10	1.10
09/09/2016	1.30	1.40	1.35	1.35
10/09/2016	1.80	1.60	1.70	1.70
11/09/2016	2.00	1.90	1.95	1.95
12/09/2016	2.30	2.20	2.25	2.25
13/09/2016	2.60	2.50	2.55	2.55
14/09/2016	2.60	2.50	2.55	2.55



Cuadro 09. Contenido nutricional de hortalizas utilizadas en la preparación de medios modificados.

APIO	
NUTRIENTES	100 g
Agua (g)	94.70
Proteínas (g)	1.19
Grasa (g)	0.20
Carbohidratos (g)	2.47
Fibra (g)	1.40
Sodio (mg)	100.00
Calcio (mg)	41.00
Hierro (mg)	0.40
Vitamina A (ug)	8.33
Vitamina B12 (ug)	0.00
Colesterol (mg)	0.00
Vitamina C (mg)	7.00
Azúcares (g)	2.47
Vitamina B3 (mg)	0.48
Calorias (Kcal)	19.20

CAYHUA	
NUTRIENTES	100 g
Agua (g)	94.00
Proteína (g)	0.70
Grasa (g)	0.10
Carbohidratos totales (g)	44.00
Fibra cruda (g)	0.70
Ceniza (g)	0.80
Calcio (mg)	13.00
Fósforo (mg)	20.00
Hierro (mg)	0.80
Actividad de vitamina A (ug)	15.00
Tiamina (mg)	0.05
Riboflavina (mg)	0.04
Niacina (mg)	0.29
Acido ascórbico (mg)	14.00
Valor energético (Kcal)	19.00

LECHUGA	
NUTRIENTES	100 g
Agua (g)	95.10
Proteína (g)	1.37
Grasa total (g)	0.60
Hidratos carbono (g)	1.40
Fibra (g)	1.50
Potasio (mg)	220.00
Calcio (mg)	34.70
Fósforo (mg)	0.00
Hierro (mg)	1.00
Vit. A Eq. Retincl (ug)	187.00
Vit. B1 Tiamina (mg)	0.06
Vit. B2 Riboflavina (mg)	0.07
Eq. niacina (mg)	0.80
Vit. C Ac. ascórbico (mg)	13.00
Energía (Kcal)	19.60