

36

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

“EVALUACION *In vitro* DEL POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Trichoderma*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE INGENIERA AGRICOLA

P R E S E N T A :

LETICIA DE PAZ HERNANDEZ

ASESORES:

M. en C. EDVINO J. VEGA ROJAS
ING. ANGEL C. LOPEZ CORTES

268139

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. MÉX.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 25 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación *in vitro* del Potencial Biocontrolador de Tres Especies del Género *Trichoderma*".

que presenta la pasante: Leticia De Paz Hernández
con número de cuenta: 5155900-2 para obtener el TITULO de:
Ingeniera Agrícola

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 10 de agosto de 1993

| | | |
|------------------|--|--|
| PRESIDENTE | <u>M. en C. Edvino Josefát Vega Rojas</u> | |
| VOCAL | <u>Dra. Rosa Navarrete Maya</u> | |
| SECRETARIO | <u>M. en C. Ma. del Vazmín Cuervo Usón</u> | |
| PRIMER SUPLENTE | <u>Biol. Elva Martínez Holguín</u> | |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>Ing. Guillermo Basante Butrón</u> | |

A las dos personas más importantes de mi vida.

Mis padres

Daz Hernández Martínez

Fernando De Paz Miguel

*Gracias a su amor, confianza y apoyo incondicional he
logrado alcanzar una meta más*

A mis mejores amigos y compañeros de juegos y peleas.

Mis hermanos

Eduardo y Norma

*A mis Tíos y Primos por el afecto y convivencia que nos ha
unido en todo momento*

*A mis Amigos, sin decir nombres por temor a omitir alguno.
Por los mejores momentos que hemos compartido*

AGRADECIMIENTOS

A Nancy Mendez Flores le agradezco el haber compartido la idea de trabajar juntas en esta investigación, fue una idea que germinó de la cual hemos cosechado los mejores frutos. Una vez más GRACIAS.

Agradecemos a NUESTRO ASESOR EXTERNO

Dr. Leónides Castellanos González.

Director General del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Cienfuegos, Cuba.

La dirección de este trabajo y sobre todo el apoyo incondicional que nos ha brindado al transmitirnos sus conocimientos. Así mismo extendemos el agradecimiento a su grandioso equipo de investigadores.

Un agradecimiento muy especial para: El Ingeniero Sergio Trueba Castillo, La Profesora Esperanza Elizalde Miranda, La Ingeniero Valentina Trueba Elizalde y La Bióloga Erika Trueba Elizalde. GRACIAS POR CREER EN NUESTRO PROYECTO E IMPULSARLO. Juntos llegaremos hasta sus últimas consecuencias.

Agradezco las observaciones y todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo a MIS ASESORES INTERNOS M. en C. Edvino J. Vega Rojas e Ing. Angel C. López Cortes.

Le agradezco a los Miembros del Jurado sus observaciones y sugerencias para mejorar el trabajo.

Rossy, Angeles y Alfredo. Les agradezco su apoyo con la asesoría, equipo y programas de computación facilitados para la captura de este trabajo.

A las señoras laboratoristas Silvia Estrada y Margarita Copete les agradecemos las atenciones que nos brindaron durante nuestra estancia en el Laboratorio L 103

INDICE GENERAL

| | Pág |
|---|-----|
| Indice de figuras | I |
| Indice de cuadros | II |
| | |
| RESUMEN. | |
| | |
| I. INTRODUCCION. | 1 |
| 1.1 Objetivos | 2 |
| | |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA. | |
| 2.1 Concepto de control biológico de enfermedades | 3 |
| 2.2 Antecedentes históricos | 4 |
| 2.3 Mecanismos de acción | 5 |
| 2.3.1 Antagonismo | 7 |
| 2.3.1.1 Antibiosis | 7 |
| 2.3.1.2 Competencia | 8 |
| 2.3.1.3 Hiperparasitismo | 8 |
| 2.3.2 Resistencia inducida | 9 |
| 2.4 Factores ambientales que influyen en el control biológico | 10 |
| 2.4.1 Nutrición | 10 |
| 2.4.2 Temperatura | 10 |
| 2.4.3 pH del suelo | 11 |
| 2.4.4 Humedad y textura del suelo | 11 |
| 2.5 Prácticas culturales en el control biológico | 12 |
| 2.5.1 Supresión del suelo | 12 |
| 2.5.2 Inducción a fungistasis | 13 |
| 2.5.3 Incorporación de materia orgánica | 14 |

| | Pág. |
|---|------|
| 2.5.4 Solarización | 14 |
| 2.5.5 Sequía e inundación | 14 |
| 2.5.6 Microclima | 15 |
| 2.6 Métodos de producción masiva de agentes biocontroladores | 15 |
| 2.6.1 Fermentación líquida | 15 |
| 2.6.2 Fermentación sólida | 16 |
| 2.6.3 Técnicas de aplicación de agentes biocontroladores | 17 |
| 2.6.3.1 Liberación en el suelo | 17 |
| 2.6.3.1.1 Riego | 17 |
| 2.6.3.1.2 Incorporación de sustratos orgánicos | 18 |
| 2.6.3.1.3 Incorporación de sustratos sintéticos | 18 |
| 2.6.3.2 Liberación en el follaje | 19 |
| 2.6.3.3 Incorporación en la semilla | 19 |
| 2.6.3.4 Tiempo de liberación | 20 |
| 2.7 Generalidades del género <i>Trichoderma</i> | 20 |
| 2.7.1 Clasificación taxonómica | 20 |
| 2.7.2 Descripción taxonómica | 20 |
| 2.7.3 Biología | 24 |
| 2.7.3.1 Desarrollo, morfogénesis y esporulación <i>In vitro</i> | 24 |
| 2.7.3.2 Producción de metabolitos secundarios | 25 |
| 2.7.4 Distribución | 26 |
| 2.7.5 <i>Trichoderma</i> spp como agente biocontrolador | 27 |
| 2.7.5.1 Antecedentes | 27 |
| 2.7.5.2 Mecanismos de acción | 27 |
| 2.7.5.2.1 Micoparasitismo | 28 |
| 2.7.5.2.2 Antibiosis | 28 |
| 2.7.5.2.3 Competencia | 29 |
| 2.7.6 Producción masiva de <i>Trichoderma</i> spp | 30 |
| 2.7.6.1 Métodos de aplicación | 32 |

| | Pág. |
|--|------|
| 2.8 Características de los hongos fitopatógenos <i>Fusarium</i> spp y <i>Rhizoctonia</i> spp | 33 |
| 2.8.1 <i>Fusarium</i> spp | 33 |
| 2.8.2 <i>Rhizoctonia</i> spp | 34 |
| | |
| III. MATERIALES Y METODOS. | |
| 3.1 Muestreo | 35 |
| 3.2 Aislamiento e identificación | 35 |
| 3.2.1 Procesamiento de las muestras | 35 |
| 3.3.2 Microcultivo | 36 |
| 3.3 Pruebas de antagonismo | 37 |
| 3.4.1 Diseño experimental | 38 |
| 3.3 1 Toma de datos | 38 |
| 3.4 Producción del biofungicida | 39 |
| | |
| IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | |
| 4.1. Aislamiento de Cepas | 40 |
| 4.2. Pruebas <i>In vitro</i> | 42 |
| 4.3. Biofungicida | 53 |
| | |
| V. CONCLUSIONES. | 54 |
| | |
| VI. RECOMENDACIONES. | 55 |
| | |
| VII. BIBLIOGRAFIA. | |
| | |
| ANEXO | |

| Fig. | Índice de figuras | Pág. |
|------|--|------|
| 1 | Relación de los principales mecanismos de acción del control biológico inducido. | 5 |
| 2 | Secciones incluidas en el género <i>Trichoderma</i> . | 23 |
| 3 | Características morfológicas del aislamiento <i>Trichoderma harzianum</i> . | 43 |
| 4 | Características morfológicas del aislamiento <i>Trichoderma fasciculatum</i> . | 44 |
| 5 | Características morfológicas del aislamiento <i>Trichoderma</i> sp. | 45 |
| 6 | Crecimiento total de los patógenos limitado por los aislamientos antagonistas. | 47 |
| 7 | Distancia de solapamiento de los antagonistas sobre los hongos fitopatógenos. | 47 |
| 8 | Tiempo de cobertura de los antagonistas sobre los hongos fitopatógenos. | 48 |
| 9 | Porcentaje de inhibición de los antagonistas. | 48 |
| 10 | Enrollamiento de <i>Trichoderma</i> sp sobre una hifa de <i>Rhizoctonia solani</i> . | 50 |
| 11 | Succión de los nutrientes de una hifa de <i>R. solani</i> por <i>Trichoderma</i> sp | 51 |
| 12 | Colapso de la hifa de <i>R. solani</i> . | 52 |

Indice de Cuadros

| Cuadro | | Pág. |
|--------|--|------|
| 1 | Producción masiva en sustratos orgánicos de algunas especies del género <i>Trichoderma</i> . | 31 |
| 2 | Cuadro general de resultados | 46 |

RESUMEN

En el presente trabajo se demostró la actividad biocontroladora *In vitro* de los aislamientos *Trichoderma harzianum*, aislado de una bolsa de plástico, en la que se cultivaban setas comestibles (*Pleurotus* sp); *Trichoderma fasciculatum*, aislado de una tina experimental en la que se cultivaban chícharo y rábano, dicha tina se ubicaba en un invernadero de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y *Trichoderma* sp aislada de un predio cultivado con verdolaga ubicado en San Francisco, Xochimilco, D, F. Los aislamientos se enfrentaron en cultivo dual con los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* aislado de un suelo infestado, cultivado con frijol y *Rhizoctonia solani*, aislada de un tubérculo de papa contaminado con el hongo patógeno.

En los resultados obtenidos la cepa *Trichoderma* sp presentó la mejor habilidad biocontroladora, ya que inhibió 78.9 % a *F. oxysporum* y *R. solani*, así mismo ejerció un hiperparasitismo total sobre estos hongos patógenos en 7 días. En segundo término se encuentra *T. harzianum*, esta cepa inhibió 73.3 % a *F. oxysporum* y *R. solani*, el tiempo que tardó en hiperparasitarlos fue de 7 días. La cepa *T. fasciculatum* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* y *R. solani* en 72 %; sin embargo, este aislamiento no ejerció hiperparasitismo y 6 días después de la siembra en cultivo dual sólo limitó el crecimiento de los hongos patógenos. Con los resultados obtenidos se concluyó que *Trichoderma* sp y *T. harzianum* son organismos hiperparásitos, mientras que *T. fasciculatum* controla mediante fungistasis. Se ha reportado que *T. fasciculatum* produce sustancias antibióticas como pironas y compuestos peptídicos (Meyer, 1967; Ghisalberti, 1990) empero no se llegó a la identificación del tipo de antibiótico generado por esta especie.

Tomando en cuenta el potencial controlador de *T. harzianum*, *Trichoderma* sp. y *T. fasciculatum*, se llegó a la obtención de tres fungicidas biológicos a través de fermentación sólida bifásica estática. Las concentraciones finales por producto fueron *T. harzianum* 4.1×10^8 ufc/ml; *T. fasciculatum* 3×10^8 ufc/ml y *Trichoderma* sp 3×10^8 ufc/ml.

I. INTRODUCCIÓN.

Uno de los problemas importantes que se viven a nivel mundial es la conservación del ambiente y la salud humana, por lo que resulta innegable la necesidad de ampliar en la agricultura la investigación sobre la creación y utilización de métodos biológicos para la protección de plantas que aseguren el cuidado y mantenimiento de los complejos naturales de organismos vivos (Rodríguez, 1996).

En la actualidad los productores agrícolas de nuestro país hacen uso irracional de insumos extremadamente tóxicos para aumentar los rendimientos y controlar plagas que amenacen el valor de su producción. Al emplear productos químicos, los problemas que enfrenta el productor son la adquisición de plaguicidas a precios elevados, situación que incrementa considerablemente los costos de producción, además de contaminar el ambiente y el riesgo de contraer enfermedades terminales como cáncer y leucemia debido a su exposición a compuestos altamente tóxicos. Afortunadamente estos problemas tienen solución al emplear métodos biológicos para la protección de los cultivos, estos métodos incluyen técnicas que se basan en la utilización de parásitos, depredadores, microorganismos y sus metabolitos y algunas prácticas agronómicas para el combate de plagas, enfermedades y malezas (Rodríguez, 1996; Castellanos, 1996). La investigación para el empleo de microorganismos y sus metabolitos para el control de enfermedades en las plantas ha generado el desarrollo de formulaciones estables a través de fermentaciones líquidas y sólidas, en las cuales los materiales para su elaboración son de fácil adquisición en las zonas agrícolas, ya que forman parte de los desechos de la producción.

Tomando en cuenta la situación contaminante bajo la que son producidos los alimentos que consumimos día a día, el grado de contaminación de nuestro ambiente y las bases que existen para controlar biológicamente enfermedades de las plantas a través de actividades y medios biológicos se propone en el presente trabajo el uso del hongo *Trichoderma* spp para el control de hongos fitopatógenos de suelo, que en su mayoría son responsables de pérdidas considerables en cultivos horticolas en la etapa fenológica de plántula.

1.1 OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *In vitro* el potencial antagonista del género *Trichoderma*, con la finalidad de llegar a la obtención de un fungicida biológico para controlar hongos fitopatógenos de suelo que afectan cultivos de importancia económica en nuestro país.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar cepas nativas del género *Trichoderma*.
- Realizar pruebas de antagonismo *In vitro* para determinar el potencial biocontrolador de las cepas *Trichoderma* spp. aisladas, sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.
- Elaborar un biofungicida empleando como ingrediente activo las cepas de *Trichoderma* spp aisladas.

II. REVISION DE LITERATURA.

2.1 Concepto de control biológico de enfermedades.

Durante la evolución de las investigaciones enfocadas al control biológico han surgido diversos conceptos.

Snyder (1960), citado por Mehrotra (1988), definió el control biológico como una táctica para interrumpir las actividades del patógeno, tomando como base la resistencia de la planta, a través del mejoramiento genético y modificaciones de las prácticas culturales para disminuir la infección.

Garrett (1965), citado por Mehrotra (1988), trata el control biológico para enfermedades como una condición o práctica para disminuir la actividad del patógeno con la ayuda de agentes externos, excepto del hombre. También puntualizó que el control inicia con la introducción e incremento de la población de uno o más agentes biocontroladores tomando en cuenta las condiciones ambientales a favor de la actividad y multiplicación del organismo.

Skolko (1972), citado por Mehrotra (1988), el concepto de este investigador propuso la existencia de un cuarto componente. Los factores incluidos en su concepto son: hospederos susceptibles, organismos patógenos, condiciones ambientales favorables para el inicio de la infección y el cuarto componente lo constituyen, los organismos capaces de afectar directamente el curso de la enfermedad. Dos años después Baker (1974) definió el control biológico como la reducción de la actividad metabólica del inóculo patógeno en su estado activo o latente, por uno o más organismos con la manipulación del medio ambiente, hospedero e introducción de organismos antagonistas.

La evolución del concepto de control biológico no presenta grandes variaciones, sin embargo, el concepto actual no solo incorpora la introducción de antagonistas en los sistemas de producción, también incluye la manipulación del ambiente, el manejo de residuos de cosecha y un amplio número de prácticas culturales que aseguran el éxito del control (Nigam, 1988).

2.2 Antecedentes históricos.

El control biológico en su sentido amplio ha sido empleado por el hombre desde los inicios de la agricultura. Durante el tercer y cuarto milenio a. C. se utilizaba el barbecho como la técnica principal de los sistemas de producción en Europa, posteriormente se introdujeron sistemas de rotación y periodos de barbecho para disminuir la incidencia de enfermedades e incrementar la fertilidad de los suelos (Campbell, 1989).

El término control biológico de enfermedades fue acuñado junto con el control biológico de plagas de insectos (Howard, 1916; Smith, 1919 citados por Cook, 1983). Sin embargo, fue partir de 1920 cuando se registra un repentino incremento en el número de publicaciones reportando el control de enfermedades utilizando hongos antagonistas (Campbell, 1989). Hartley (1921) introdujo hongos antagonistas aislados del suelo para controlar el ahogamiento en plántulas. Sanford (1926) y Taylor (1927) demostraron el control de la costra de la papa causada por *Streptomyces scabies*, cuando incorporaron hongos antagonistas con estiércol verde (citados por Campbell, 1989).

En un periodo de 10 años, se registraron varios experimentos importantes de control biológico para controlar enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, pero 60 años después surgieron varias de las principales ideas que marcan las bases de la investigación actual.

En las dos últimas décadas, el mercado para los productos biológicos generados para el control de enfermedades ocupa sólo el 0.45% del mercado global de los agroquímicos, las ventas aproximadas son de 10 a 25% al año. Los agentes biológicos más comercializados son: *Bacillus thuringiensis*; *Beauveria* spp; *Metarhizium* spp; *Trichoderma* spp; *Pseudomonas* spp. y nemátodos del género *Steinernema*. Es importante mencionar que los bioplaguicidas obtenidos de los agentes antes mencionados presentan limitantes como: especificidad, sensibilidad a factores ambientales, problemas con las dosis de formulación y algunos problemas de calidad en la producción a escala industrial debido a la presencia de agentes contaminantes (Powell, 1993).

2.3 Mecanismos de acción.

El control biológico se puede llevar a cabo de forma inducida y natural, cuando este ocurre naturalmente genera un balance ecológico entre los patógenos y sus antagonistas (Webber, 1986). El control biológico inducido, se origina por la manipulación directa e indirecta de los microorganismos, al provocar el incremento de los agentes controladores sobre las especies plaga (Nigam, 1988). Esta forma de control, es auxiliada por dos métodos, el primero conocido como antagonismo que se divide en tres mecanismos de acción: antibiosis, competencia y parasitismo (predación directa e hiperparasitismo) y el segundo método es conocido como resistencia inducida (Cate, 1990).

La relación que existe entre los mecanismos de acción de cada uno de los dos métodos de control biológico inducido fue ilustrado por Baker (1985), apoyándose de los elementos principales que lo originan (figura 1).

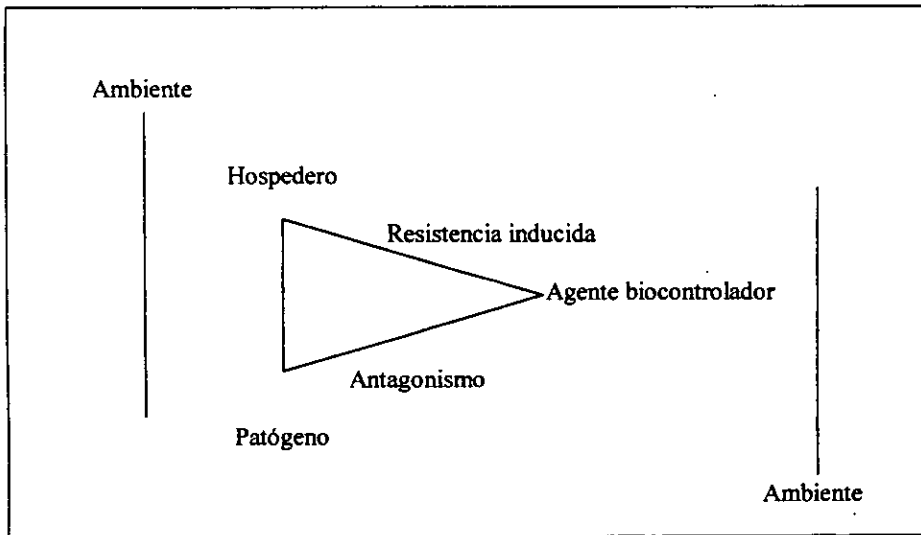


Figura 1. Relación de los principales mecanismos de acción del control biológico inducido (Baker, 1985).

Los investigadores dedicados al control biológico inducido de hongos fitopatógenos han considerado cinco elementos para obtener el éxito deseado.

- 1.- Reducir la densidad del inóculo, fija como objetivo reducir al mínimo el agente patógeno con la ayuda de factores externos.
- 2.- Reemplazo del patógeno con organismos saprófitos, se aplica principalmente para patógenos que utilizan como hospedero los residuos de cosecha, en los cuales el colonizador primario será sucedido por organismos saprófitos.
- 3.- Supresión de la germinación e interferencia en la patogénesis. Esta actividad incluye la competencia, antibiosis y otros medios para prevenir la colonización por patógenos virulentos.
- 4.- Protección de infección. Se realiza con la inoculación de agentes biocontroladores sobre las heridas ocasionadas después de la poda, para prevenir la colonización por patógenos virulentos.
- 5.- Protección a los cultivos. Es la actividad de inoculación que se realiza a la semilla, ya que la germinación de la misma en varias ocasiones es impedida por agentes patógenos (Cook, 1983).

El control biológico de hoy en día presenta un cambio importante, por ello necesita la atención de varias disciplinas para generar nuevas tecnologías y conducir a bases sólidas de investigación.

2.3.1 Antagonismo.

El antagonismo es una consecuencia de la interacción que existe entre las poblaciones (Odum, 1972). Este mecanismo de acción se percibe mejor cuando influyen factores internos y externos en el comportamiento de la población (Singh, 1988).

El suelo se divide en dos nichos ecológicos: a) masa de suelo (zona no colonizada por raíces) y b) rizosfera (zona que existe alrededor de las raíces), su existencia está en función de tiempo y espacio, situación que favorece a los microorganismos antagonistas y patógenos que habitan esos sitios. Los antagonistas generalmente se encuentran en la masa del suelo, en forma de propágulos latentes y micelio saprófito, la función principal de estos organismos, es sanear el suelo a través de la colonización del sustrato para evitar el establecimiento de microorganismos patógenos, una vez establecidos los colonizadores no patógenos mantienen su sustrato de desarrollo mediante sus mecanismos de acción (Singh, 1988).

El antagonismo en el suelo es influenciado por la incorporación de nutrimentos en forma de composta, abonos verdes y otras sustancias nutritivas que activan la germinación de los propágulos patógenos, los cuales en ausencia de un hospedero entran en competencia por nutrimentos con los antagonistas y cuando se agotan, los patógenos perecen antes de generar nuevas estructuras de resistencia (Papavizas, 1980).

2.3.1.1 Antibiosis.

La antibiosis es el proceso, en el cual los metabolitos secundarios de un microorganismo inhiben directamente o matan a otros (Baker, 1985).

Algunos organismos productores de antibióticos son saprófitos que dependen de los recursos de carbono y nitrógeno disponibles en el suelo. Los antibióticos actúan en áreas no localizadas, manteniendo su posición en la superficie del sustrato para excluir a los patógenos durante cierto periodo de tiempo (Cate, 1990).

2.3.1.2 Competencia.

El término competencia es empleado para denotar factores que favorecen a dos especies, Clark (1965), definió la competencia como los efectos dañinos de un organismo sobre otro, cuando utilizan un mismo recurso del medio ambiente. Los recursos pueden ser nutrimentos, oxígeno y espacio (citado por Singh, 1988).

La competencia se divide en dos tipos: competencia intraespecífica e interespecífica, estos tipos de competencia son importantes, ya que pueden determinar la clase y número de organismos (Singh, 1988). La competencia intraespecífica es un factor importante en aquellas poblaciones que tienden a ser regulables por sí mismas, ya que se compite por espacio y se mantiene un control efectivo sobre la misma población. La competencia interespecífica se torna importante, donde existen dos o más especies estrechamente relacionadas y adaptadas al mismo sitio o a uno similar; si la competencia es rigurosa, una de las especies puede ser eliminada por completo o forzada a emigrar a otro sitio; o bien, las especies involucradas pueden ser capaces de vivir juntas a densidades reducidas compartiendo los recursos en alguna manera de equilibrio (Odum, 1972).

1.3.1.3 Hiperparasitismo.

Los términos hiperparasitismo, micoparasitismo, parasitismo directo, y parasitismo entre hongos, son usados en referencia al fenómeno de parasitismo de un hongo sobre otro (Boosalis, 1964 citado por Singh, 1988). El hiperparasitismo generado por hongos provoca una serie de daños morfológicos sobre la especie blanco, esta actividad inicia con la cobertura de las hifas patógenas por el antagonista, posteriormente succiona los nutrimentos y concluye con la lisis de la hifa (Barnett, 1963 citado por Singh, 1988). Las interacciones hiperparasíticas pueden ser biotróficas y necrotróficas. Los parásitos biotróficos consumen los nutrientes de las células vivas del hospedero vía haustorios, mientras que el parásito necrotrófico se alimenta de las células muertas, mismas que son eliminadas a través de la secreción de toxinas y enzimas extracelulares antes de invadirlas. El grado de hiperparasitismo es afectado por cambios en la relación carbono-nitrógeno, temperatura, luz, pH y nutrimentos (Singh, 1988).

2.3.1 Resistencia inducida.

En las plantas la resistencia inducida es el tipo de resistencia que aparece después de que las plantas han sido preinoculadas con varios agentes bióticos o previamente tratadas con varios agentes químicos o físicos. Se ha inducido resistencia en una amplia gama de plantas ante el ataque de hongos, bacterias, virus e incluso insectos. La resistencia inducida no es específica debido a que, sin importar el tipo de agente o patógeno utilizado como inductor, el nivel de resistencia en la planta aumenta ante varios patógenos. Por ejemplo, la infección que causa el virus del mosaico del tabaco en plantas hipersensibles induce una resistencia sistémica ante este virus, así como ante otros virus, hongos (*Phytophthora* spp.), bacterias (*Pseudomonas tabaci*) y áfidos.

La resistencia contra un determinado patógeno también puede inducirse inoculando previamente la planta con una de las razas incompatibles del patógeno, con bacterias o esporas de hongos, muertos con calor, o bien inoculando a la planta con el patógeno mientras ésta es todavía joven y aún no es susceptible al patógeno. Los síntomas provocados por la resistencia inducida se observan inicialmente y se restringen a la zona que rodea los sitios iniciales de infección (resistencia local inducida), pero al cabo de algunos días puede detectarse en las porciones no inoculadas de las hojas inoculadas, así como en hojas no inoculadas (resistencia sistémica inducida). La resistencia inducida se manifiesta por lesiones más pequeñas o a través de la resistencia total a una segunda infección causada por el mismo patógeno o por un patógeno distinto. Para que la resistencia inducida se manifieste, debe transcurrir un largo período entre el tratamiento de la inducción (primera inoculación) y la inoculación inductora. Es probable que deba transcurrir cierto tiempo antes de que ocurra la síntesis y movimiento sistémico de una o varias sustancias de las hojas inoculadas a las no inoculadas o a otras partes de la planta.

Además de manifestarse la resistencia como resultado de una infección primaria, la resistencia también puede inducirse tratando a las plantas con compuestos naturales como proteínas de la cápside de los virus, proteínas de bacterias u hongos, lipoproteínas, polisacáridos y RNA de levaduras, o bien moléculas sintéticas, sobre todo polianiones como los ácidos poliacrílico, salicílico y 2-cloroetilfosfónico.

Estas sustancias funcionan como inductores de resistencia local en la planta cuando son inyectadas o asperjadas y de resistencia sistémica cuando son absorbidas a través de los peciolos o las raíces; cuanto mayor es la concentración del inductor, más rápido y más eficaz es la resistencia inducida en el hospedante (Agrios, 1995).

2.4 Factores ambientales que influyen en el control biológico.

Los factores ambientales como: nutrición, temperatura, pH, humedad y tipo de suelo, afectan el desarrollo de los microorganismos encargados del control biológico (Lumsden, 1992).

2.4.1 Nutrición.

La disponibilidad de nutrientes en el suelo es uno de los factores más importantes que afectan al micoparasitismo, debido a que los antagonistas toman la materia orgánica y nutrientes como alimento base antes de atacar al patógeno (Papavizas, 1985).

En algunos experimentos se ha demostrado que la nutrición de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* alojados en el suelo durante 40 días, registraron mayor incidencia al ataque por *Fusarium* spp, *Mucor* spp y *Trichoderma* spp. La escasez de nutrientes en estas estructuras de resistencia contribuyó en la colonización masiva por los antagonistas (Lumsden, 1992).

2.4.2 Temperatura.

Se ha determinado que la temperatura afecta el micoparasitismo en el suelo, debido a que no todos los organismos tienen la misma capacidad de sobrevivir a la misma temperatura. El rango establecido para el desarrollo adecuado de los microorganismos oscila entre 12°C y 30°C.

Boosalis (1956) determinó que el micoparasitismo de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia solani* fue mínimo a 18°C; sin embargo, cuando la temperatura se incrementó a 28°C, aumentó el grado de hiperparasitismo (citado por Lumsden, 1992).

Las estructuras de resistencia (esclerocios) de hongos fitopatógenos nocivos, localizados sobre la superficie del suelo fueron incubados a 20°C, los resultados de hiperparasitismo se obtuvieron en un periodo de tres días, pero cuando la temperatura se modificó a 10°C, el periodo se incrementó a seis días. (Lumsden, 1992).

2.4.3 pH del suelo.

El pH de la mayoría de los suelos agrícolas es favorable para la actividad de los micoparásitos, empero existen algunos que necesitan un pH específico para desarrollarse adecuadamente (Chet, 1980; Papavizas, 1985).

La tolerancia al pH que han registrado algunos antagonistas ha sido de 5.5 a 7.5. También se han demostrado colonizaciones sobre *Sclerotium cepivorum* por organismos no patogénicos en suelos ácidos (Lumsden, 1992), mientras que *Macrophomina phaseolina* ha sido hiperparasitada con mayor éxito en suelos alcalinos que en ácidos (Papavizas, 1977 citado por Lumsden, 1992).

2.4.4 Humedad y textura del suelo.

La humedad del suelo afecta directamente el micoparasitismo, cuando las estructuras de resistencia antagonistas son lavadas pierden su capacidad germinativa (Adams, 1986). También se ha demostrado que la escasez de agua retarda el micoparasitismo (Lumsden, 1992). La humedad y textura del suelo, están estrechamente relacionados, ya que el encharcamiento y drenaje del agua dependen de la proporción de arena, limo, arcilla y materia orgánica que un contenga un suelo, es importante mencionar que la materia orgánica es el elemento principal que modifica el medio ambiente del suelo a favor de los antagonistas (Lumsden, 1983).

2.5 Prácticas culturales en el control biológico de enfermedades.

Las prácticas culturales comunes en el control biológico son: supresividad del suelo, inducción a fungistasis, incorporación de materia orgánica, solarización, sequía e inundación y creación de un microclima (Nigam, 1988).

2.5.1 Supresividad del suelo.

Baker y Cook (1974) consideraron que los suelos supresivos son aquellos en los que el patógeno: a) no puede establecerse o persistir, b) se establece pero causa poco o ningún daño a las plantas normalmente susceptibles, o c) puede generar la enfermedad y causar daños por un cierto tiempo después del cual disminuye la importancia de la enfermedad hasta desaparecer, aun cuando el patógeno persista en el suelo. El fenómeno no se limita a especies de hongos y actinomicetos sino que también hay información sobre los suelos supresivos para fitonemátodos como *Heterodera avenae* y para nemátodos agalladores *Meloidogyne* spp.

Cook y Baker (1983) dividieron el efecto supresor de los suelos en dos clases: supresión de tipo general y supresión específica. La mayoría de los suelos poseen o exhiben un cierto grado de resistencia al desarrollo de patógenos como forma general de control. Esta supresión generalizada para un determinado organismo patógeno está vinculada directamente con el nivel de la actividad microbiana del suelo en un tiempo crítico para el desarrollo del patógeno que sería, por ejemplo, el periodo de germinación de sus propágulos y el de crecimiento en la rizosfera antes de penetrar en la planta hospedadora. En este periodo crítico el patógeno está en competencia directa con todos los microorganismos del suelo que le rodean. La competencia en contra del patógeno no está limitada a un cierto grupo o número de especies de microorganismos específicos sino que es general. La supresión específica tiene como base la supresión general que existe en la mayoría de los suelos, pero incrementada por las actividades supresoras de grupos de especies o especies individuales de microorganismos antagónicos al patógeno en un momento crítico de su desarrollo en el suelo.

El control de enfermedades de las plantas por los suelos es universal, existen ejemplos de suelos supresores en casi todo tipo de climas y cultivos (Rodríguez-Kabana, 1996). El efecto supresor de un suelo es transferible, es decir que un suelo donde el patógeno se desarrolla sin impedimentos (suelo conductor) puede convertirse en supresor al añadirle pequeñas cantidades de otro suelo supresor. La capacidad supresora de los suelos esta basada en parte en la competencia existente entre los microorganismos del suelo por fuentes de carbono y energía (Kloepper, 1981). Para entender la importancia de la competencia microbiana en la capacidad de control de patógenos por los suelos hay que comprender que la competencia entre dos o más organismos es más pronunciada cuando utilizan el mismo tipo de sustrato y tienen los mismos requisitos ambientales para su crecimiento. En los suelos supresores, donde los nutrimentos escasean, solo las cepas más competitivas, es decir las no patogénicas, son las que se desarrollan, por lo que no aparecen síntomas de enfermedad en las plantas (Rodríguez-Kabana, 1996).

2.5.2 Inducción a fungistasis.

Los hongos del suelo coexisten con varios microorganismos antagonistas que causan un ambiente de inanición y de metabolitos tóxicos. Como resultado, las esporas de muchos hongos que viven en el suelo suelen ser incapaces de germinar en algunos suelos, a este fenómeno se le conoce como fungistasis (Agrios, 1995). La naturaleza fungistática de un suelo tiene un impacto considerable en la sobrevivencia y dinámica de su población (Papavizas, 1985).

La fungistasis se eleva a un nivel superior, cuando permite la germinación de propágulos patógenos en presencia de un hospedero susceptible (Papavizas, 1980). Al originarse esta situación es conveniente manipular el ambiente del suelo con la incorporación de materia orgánica, para inactivar el ciclo de la enfermedad con las altas concentraciones de amonio producidas por los compuestos orgánicos (Nigam, 1988).

2.5.3 Incorporación de materia orgánica.

Las enmiendas orgánicas en el control de enfermedades de las plantas, es una práctica que ha sido reconocida por décadas, porque además de contribuir en el control de la enfermedad favorece la fertilidad del suelo, elemento que es considerado perjudicial para el desarrollo de microorganismos fitopatógenos del suelo (Singh, 1988). El empleo de enmiendas orgánicas representa una ventaja importante ante el uso de fumigantes químicos (Singh, 1984), ya que los efectos originados por la adición de compuestos orgánicos son los últimos en perderse después de un periodo considerable de tiempo, situación que genera efectos múltiples hacia los patógenos, además de aumentar la fertilidad del suelo. (Cook, 1983; Lumsden, 1983).

2.5.4 Solarización.

La solarización, es una técnica que consiste en calentar el suelo aprovechando la radiación solar, colocándose con cuidado una cubierta parcial o total de plástico transparente sobre el suelo. El plástico no debe tener fugas de vapor ni aire caliente. El método alcanza una mayor eficacia si se establece durante más de seis semanas en la etapa de mayor radiación solar (Nigam, 1988). En Israel el calentamiento del suelo con la utilización de plásticos se ha convertido en una práctica cultural altamente comercializada para controlar *Verticillium dahliae* (Ashworth, 1979), con la solarización se incrementa la actividad de los organismos antagonistas haciendo a los patógenos vulnerables durante un tiempo prolongado (Katan, 1981).

2.5.5 Sequía e inundación.

La sequía e inundación son prácticas que benefician el control de algunas enfermedades (Nigam, 1988). Se ha demostrado que cultivos desarrollados bajo condiciones de sequía, generan cierta resistencia al ataque de hongos por que se inhibe la germinación por la falta de humedad, también la presencia de estas condiciones reducen el riesgo de una infección severa, ya que la formación de apresorios y elongación de las hifas es inhibida (Ayres, 1980 citado por Nigam, 1988).

La inundación consiste en el sometimiento del suelo a condiciones extremas de humedad para lavar los nutrientes de las estructuras de resistencia patógenas para que pierdan su viabilidad (Cook, 1983).

2.5.6 Microclima.

Las variaciones estacionales modifican las condiciones atmosféricas sobre la superficie de la planta (Blakeman, 1985), provocando cambios en los microorganismos que habitan en ella (Nigam, 1988). La manipulación del ambiente que rodea a la planta, contribuye para disminuir la incidencia de patógenos y aumentar la actividad de los antagonistas. Generalmente, es difícil cambiar el microclima; sin embargo, la arquitectura de la planta y su estado nutricional pueden ser modificados e intervenir directamente en la población nociva (Bakshi, 1977 citado por Nigam, 1988).

2.6 Métodos de producción masiva de agentes biocontroladores.

La producción masiva de agentes biocontroladores fija como meta, elaborar biopesticidas económicos que compitan en precio y eficacia contra los pesticidas químicos (Churchill, 1982). Los sustratos empleados para desarrollar microorganismos biocontroladores son baratos y de fácil adquisición (Churchill, 1982), ya que se aprovechan residuos agrícolas frescos que proporcionan carbono, nitrógeno y minerales que pueden ser balanceados para obtener un biopesticida de excelente calidad (Upadhyay, 1988).

2.6.1. Fermentación líquida.

En los últimos 30 años, la expansión de las tecnologías de fermentación, para la producción comercial de ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos y otras drogas producidas por hongos y bacterias ha tenido como resultado la creación de tecnologías sofisticadas para obtener fermentaciones líquidas de alto nivel de calidad (Moo-Young, 1987; Knight, 1988 citados por Connick *et al.*, 1990).

Las fermentaciones líquidas o sumergidas, son aquellas que se realizan en sustratos, en su mayoría solubles, sustratos disueltos o suspendidos en grandes volúmenes de agua, donde los componentes del sustrato están igualmente accesibles y su concentración disminuye durante la transformación que sufren las sustancias orgánicas que los constituyen (Córdova, 1995).

El elemento más importante para la producción de hongos biocontroladores por este método, es el desarrollo del medio de cultivo conveniente para el crecimiento de los microorganismos, algunos materiales aceptados para tal efecto son: melaza, levadura de cerveza, licor de maíz, semilla de algodón y fluoruros de soya (Zabriskie, 1980; Lisanski, 1985 citados por Connick *et al.*, 1990).

La obtención de biomasa a partir de este tipo de fermentaciones tarda de seis a siete días, una vez obtenido él o los microorganismos en el tanque fermentador se procede a separar la biomasa del medio a través de filtraciones y centrifugación (Connick *et al.*, 1990), concluido el proceso el producto se deshidrata y se incorpora en gránulos, pastillas y polvos solubles (Churchill, 1982).

2.6.2 Fermentación sólida.

La fermentación en estado sólido, es un tipo de cultivo donde crece un microorganismo sobre la superficie y en el interior de una partícula porosa sólida, la cual puede ser asimilable o inerte, en este sistema el agua esta ligada al interior de la matriz porosa y no se presentan fenómenos microscópicos de drenaje entre las partículas. Cabe señalar, que el espacio intrapartículas se encuentra ocupado por el aire (oxígeno), mismo que los microorganismos necesitan para crecer y alimentarse colectivamente (Córdova, 1995).

La mayor parte de la investigación enfocada a la producción en masa para la introducción de hongos controladores, se realiza con fermentaciones sólidas. Los sustratos para la producción de inóculo de los hongos biocontroladores *Trichoderma* spp, *Gliocladium* spp, *Conithyrium* spp, *Chaetomium* spp, *Laetisaria* spp y *Penicillium* spp han sido: semillas, harinas, bagazos, salvado de trigo, paja de trigo, aserrín y peat moss, materiales empleados en forma individual o combinados (Papavizas, 1985).

Las fermentaciones en estado sólido no requieren de procedimientos sofisticados para su utilización. Los materiales empleados inoculados con los organismos son simplemente secados y aplicados al follaje, las semillas y/o dispersados directamente al suelo; sin embargo, existen desventajas que hacen inapropiado el sistema para el desarrollo de biopesticidas a nivel comercial, debido principalmente al riesgo de contaminación, además de requerir un gran espacio para su proceso, incubación y almacenamiento (Connick *et al.*, 1990).

2.6.3 Técnicas de aplicación de agentes biocontroladores.

La efectividad de los agentes biocontroladores al ser aplicados, depende del método de aplicación, preparación del inóculo y la integración de otras prácticas culturales. La aplicación puede realizarse por aspersión al follaje, diseminación directa en el suelo e inoculación de la semilla como tratamiento preventivo (Cook, 1983).

1.6.3.1 Liberación en el suelo.

La aplicación de los agentes biocontroladores en el suelo, puede ser mediante la incorporación de sustratos colonizados y el riego (Stack, 1988).

1.6.3.1.1 Riego.

Existen diversas formas para incorporar agentes biocontroladores al suelo. Una técnica de aplicación directa, es mediante la incorporación de los propágulos en forma de suspensión a través del riego (Abd-El Moity, 1981); sin embargo, existen dos limitantes que hacen deficiente este método. Las limitantes de esta forma de aplicación se relacionan con la textura del suelo. Se ha demostrado que la aplicación de algunos microorganismos en suelos arcillosos, la dispersión pasiva en el perfil del suelo durante la filtración ocurre principalmente por los canales y grietas, en lugar de circular por el sistema poroso, situación que no permite el control en los horizontes superficiales.

Otro inconveniente, se presenta cuando el agente es aplicado en la parte más superficial del suelo, en este caso el biocontrolador entra en competencia con la fauna nativa por sustrato disponible, siendo el antagonista expuesto a predadores, parásitos y fungistasis (Lockwood, 1981 citado por Stack, 1988).

2.6.3.1.2 Incorporación de sustratos naturales.

Para incorporar agentes biocontroladores al suelo, a través de sustratos naturales, se han realizado numerosos experimentos, de los cuales los resultados obtenidos dependen del sustrato utilizado. Los sustratos naturales proporcionan a los microorganismos el alimento base hasta que entra en contacto directo con su hospedero (Stack, 1988). Los patógenos controlados con la incorporación de sustratos naturales colonizados con antagonistas han sido *Rhizoctonia solani* en viveros de fresa (Elad, 1981), frijol, zanahoria y flor de liz (Strashnow, 1985). *Pythium aphanidermatum* en frijol, pepino, chicharo y tomate (Sivan, 1983). Los sustratos comúnmente empleados son salvado de trigo, pulpa de remolacha azucarera (Stack, 1988), pulpa de café, harina de maíz, paja de arroz, cabecilla de arroz, semillas de trigo, cebada y sorgo (Brito, 1996).

2.6.3.1.3 Incorporación de sustratos sintéticos.

La colonización de sustratos sintéticos por los agentes biocontroladores, se realiza al mezclar el agente con alginato de sodio y arcilla. En esta mezcla los propágulos son peletizados para aplicarlos al medio de crecimiento de la planta, la peletización tiene como objetivo el almacenamiento del producto por algunas semanas. En algunas ocasiones se incorporan al sistema materiales orgánicos como agentes de adhesión, en lugar de arcilla, con esta modificación en la mezcla se ha logrado liberar con éxito *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum* *Gliocladium virens* (Lewis, 1984), *Penicillium oxalicum* y *Talaromyces flavus* (Fravel, 1985). La lignita, también se ha empleado como sustrato inerte para incorporar a los antagonistas, en este caso la lignita se trituró hasta obtener el tamaño deseado para que los propágulos iniciarán la colonización (Backman, 1975; Jones, 1984).

2.6.3.2 Liberación en el follaje.

El control de los hongos fitopatógenos del follaje, generalmente se realiza a través de la aspersión directa de los agentes sobre la planta (Sorensen *et al.*, 1980 citado por Stack, 1988). Los factores físicos que afectan la eficacia del control son la dosis de aplicación, horario de aspersión y adherente empleado (Cullen, 1985). Las aspersiones al follaje presentan una gran desventaja, provocada por las variaciones extremas de temperatura y humedad, esto perjudica la sobrevivencia de los agentes haciendo necesario aplicaciones consecutivas, mismas que provocan incremento mínimo en los costos de producción (Stack, 1988).

2.6.3.3 Incorporación en la semilla.

La inoculación de semillas con microorganismos antagonistas seleccionados del suelo, tiene como función brindar protección a las plántulas contra los microorganismos fitopatógenos que puedan existir en el suelo y estimular el crecimiento de los cultivos (Mishustin, 1927 citado por Mehrotra, 1988). Los antagonistas incorporados en la semilla ofrecen un excelente potencial para el control de las pudriciones de raíz, ejemplos exitosos de la aplicación de esta técnica, se registraron al controlar *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* en plántulas de maíz (Chang, 1968 citado por Mehrotra, 1988), *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium culmorum* y *Rhizoctonia solani* (Wu, 1976 citado por Mehrotra, 1988), y pudriciones de raíz en chícharo y rábano provocadas por *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani* (Harman, 1981). La protección de las semillas con antagonistas antes de la siembra en suelos no tratados ha sido estudiado ampliamente en Rusia, los resultados obtenidos han sido buenos, ya que se ha logrado el control de los patógenos e incremento del rendimiento en los cultivos. Así mismo, en la estación experimental de Rothamsted, Inglaterra y la Organización de la Investigación Científica e Industrial en Australia han confirmado los resultados (Mehrotra, 1988).

1.6.3.4 Tiempo de liberación.

El momento para decidir cuando aplicar al agente controlador, debe basarse en el comportamiento de los mismos en el ecosistema al que se adaptarán, con esta observación se determina la liberación. También se deben tomar en cuenta las etapas fenológicas susceptibles de la planta al ataque de patógenos, así como las formulaciones adecuadas y la frecuencia de aplicación, estas últimas regularmente están en función de la temperatura y humedad, ya que en ocasiones modifican la sobrevivencia y actividad de los organismos (Stack, 1988).

2.7 Generalidades del género *Trichoderma*.

2.7.1 Clasificación taxonómica.

| | |
|-----------|--------------------|
| Reino : | Fungi |
| División: | Deuteromycotina |
| Clase: | Hyphomycetes |
| Orden: | Moniliales |
| Familia: | Moniliaceae |
| Género: | <i>Trichoderma</i> |

(Ulloa, 1978).

1.7.2 Descripción taxonómica.

El género *Trichoderma* fue identificado en 1794 por Persoon, sin embargo hasta 1969 Rifai, logró una delineación genérica de *Trichoderma* basada en características morfológicas que son aceptadas en la actualidad (Bissett, 1991). La primera monografía del género *Trichoderma*, se consideró como un primer intento de agrupación en una clasificación taxonómica, en la cual se distinguieron nueve especies agregadas que fueron definidas como "agregaciones morfológicas de difícil separación" (Rifai, 1969).

Las especies agregadas del género *Trichoderma* son: 1) *Trichoderma piluliferum* Webster y Rifai; 2) *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers) Rifai; 3) *Trichoderma hamatum* (Bon) Bain 4) *Trichoderma koningii* Oud; 5) *Trichoderma aureoviride* Rifai; 6) *Trichoderma harzianum* Rifai; 7) *Trichoderma longibrachiatum* Rifai; 8) *Trichoderma pseudokoningii*. Rifai; 9) *Trichoderma viride*. Pers. ex S.F Gray. En 1984, se llevó a cabo una revisión parcial de los tratados sobre el género y se estableció *longibrachiatum* como una sección, en la que incluyeron *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma longibrachiatum* además de agregar dos nuevas especies *Trichoderma citrinoviride* Bissett y *Trichoderma atroviride* Bissett (Bissett, 1984).

El género *Trichoderma* esta dividido en cinco secciones: a) *Trichoderma*; b) *Pachybasium* (Sacc); c) *Hypocreanum* (Doi); d) *Longibrachiatum* (Bissett) y e) *Saturnisporum* (Doi).

Trichoderma spp sección *Trichoderma* Esta sección se caracteriza por presentar conidióforos angostos y conidióforos flexibles con ramificaciones y fiálides esparcidas frecuentemente en pares y rara vez en verticilos de más de tres. Las especies de esta sección presentan colonias de rápido crecimiento, la mayoría crecen de 5 a 9 cm en diámetro después de cuatro días a 20°C. Algunas especies de esta sección son generadoras de aromas (figura 2).

Trichoderma spp sección *Pachybasium* (Sacc). Esta sección agrupa especies altamente ramificadas, se caracteriza por la presencia de conidióforos amplios usualmente arreglados en pústulas compactas o fascículos y con ramas o fiálides hinchadas relativamente cortas o dispuestas en verticilos llenos. Algunas especies se caracterizan por la producción de extensiones de conidióforos estériles. Varios aislamientos de esta sección, producen pústulas conidiógenas compactas con conidioforos adyacentes en anastomosis. Regularmente las colonias de estas especies se desarrollan de forma lenta a rápida y crecen de 2 a 9 cm después de cuatro días a 20°C.

Trichoderma spp sección *Longibrachiatum*. Para esta sección las especies son caracterizadas por conidióforos moderadamente ramificados, las fiálides se encuentran irregularmente dispuestas en espirales o vérticilos. Por lo general las especies de esta sección producen pigmentos verdes o amarillos. El crecimiento de las colonias es rápido, alcanzan de 6 a 9 cm después de cuatro días a 20°C.

Trichoderma spp sección *Saturnisporum*. Esta sección presenta un sistema de ramificaciones con ramas y fiálides solas, frecuentemente en pares pero con las fiálides hinchadas y pústulas conidiogenas compactas, con un brazo o bulbo conidial ornamental. Las especies de esta sección crecen de moderada a relativamente despacio, es decir, 4 a 7 cm en diámetro después de cuatro días a 20°C.

Trichoderma sp sección *Hypocreanum*. Esta sección incluye anamorfos de *Hypocrea*. Las especies de esta sección ocasionalmente se extraen de suelo y madera, se caracterizan principalmente por su conidiación espaciada, los conidios son moderadamente ramificados y las fiálides son cilíndricas o subuladas, frecuentemente nacen en verticilos divergentes. Las especies ubicadas en esta sección son predominantemente irregulares y la mayoría producen unos cuantos conidios generando con ello colonias de apariencia blanquizca (Bissett, 1991).

El género *Trichoderma* es caracterizado por micelio sumergido y aéreo aracnoide, esterado o lanoso. La conidiación es en forma de mechón expandido o pústulas compactas de coloración inicial blanquizca que torna a verde olivo, gris y café (Von Arx, 1981). Los conidióforos presentan un eje principal amplio, recto o flexible con ramificaciones primarias levantadas en intervalos regulares formando ramas secundarias que también son ramificadas en los niveles apicales más altos. Las clamidosporas son abundantes en el micelio sumergido, se encuentran intercaladas en las ramas terminales de las hifas vegetativas. Las células conidiogenas (fiálides) usualmente están dispuestas en verticilos divergentes que terminan en ramas de conidióforos (Bissett, 1991).

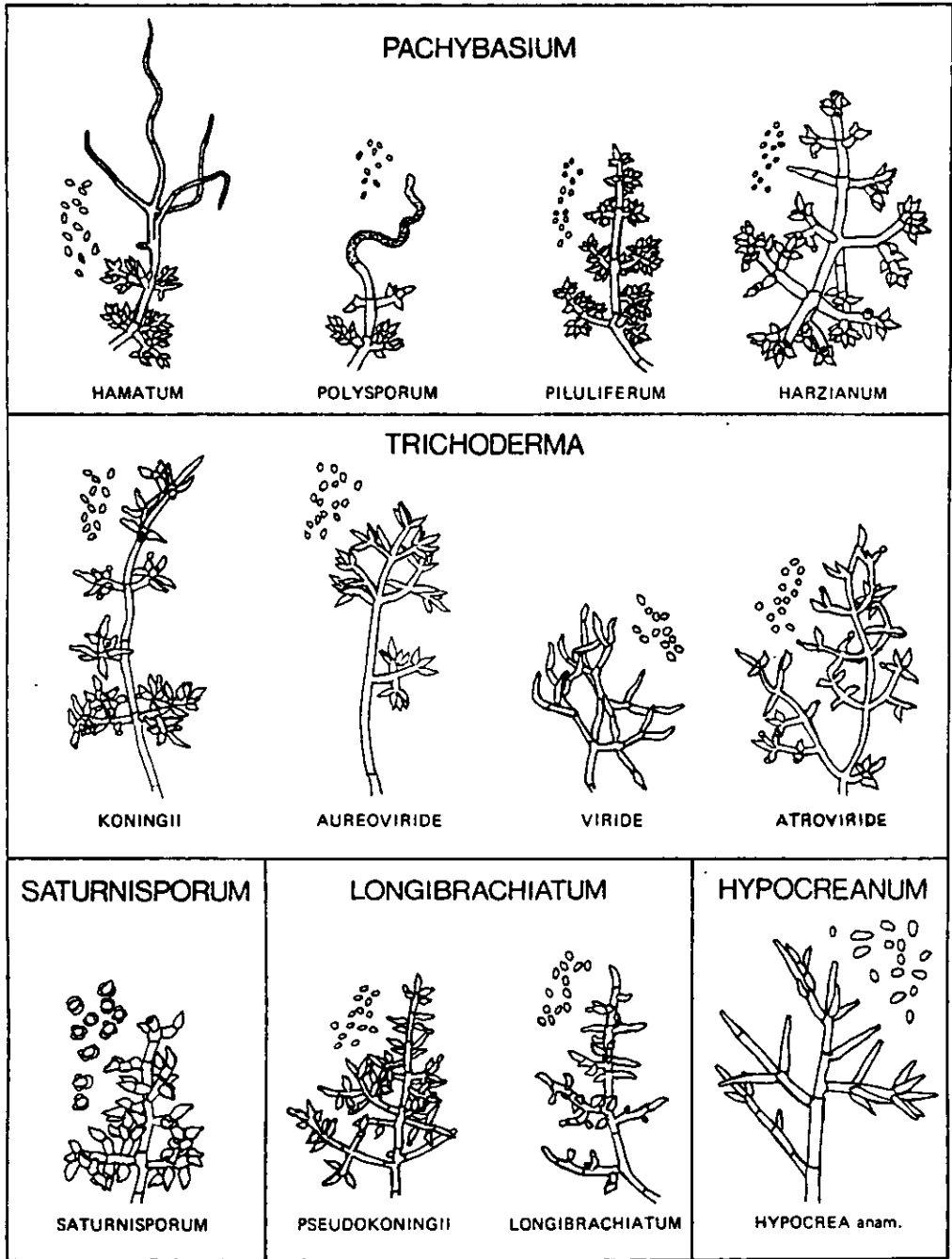


Figura 2. Secciones incluidas en el género *Trichoderma* (Bissett, 1991).

2.7.3 Biología.

2.7.3.1 Desarrollo, morfogénesis y esporulación *In vitro*.

Los estudios sobre desarrollo, morfogénesis y esporulación del género *Trichoderma In vitro*, pueden ser útiles si la información derivada de estos es usada para el desarrollo de biomasa en gran escala para emplearla en control biológico (Papavizas, 1985).

Las especies del género *Trichoderma* para su desarrollo necesitan un alto porcentaje de compuestos de carbono y fuentes de nitrógeno. El carbono y los requerimientos de energía son obtenidos de monosacáridos y disacáridos (Danielson, 1973 citado por Papavizas, 1985), polisacáridos complejos, purinas, pirimidinas y aminoácidos (Tye, 1973 citado por Papavizas, 1985). También se han considerado los efectos del CO₂ *In vitro*, estos han sido variables y parecen depender de la concentración de CO₂ y pH del medio (Macauley, 1969; Danielson, 1973 citados por Papavizas, 1985).

La morfogénesis del género *Trichoderma* fue definida como el desarrollo de un organismo en sus diferentes formas; este concepto implica la diferenciación de sus células en tamaño, forma, estructura, función y composición química (Turian, 1983).

La esporulación en la mayoría de las especies del género *Trichoderma* se debe a su fotosensibilidad y como consecuencia esporulan de buena forma en varios sustratos naturales y artificiales en un patrón concéntrico de anillos alternados en respuesta a la luz diurna cuando las cepas son sometidas a periodos de obscuridad (Gressel, 1968 citado por Papavizas, 1985). La exposición de las cepas a una intensidad de luz de 85 a 90 lux, durante un tiempo promedio de 20 a 30 segundos induce a la esporulación, sin embargo, la mejor fotoinducción a filioconidiogénesis ha sido obtenida cuando las cepas se expusieron a la luz del día durante tres minutos o radiación ultravioleta de 366 nm de 10 a 30 segundos (Betina, 1976 citado por Papavizas, 1985). La conidiación fotoinducida en *Trichoderma* spp puede ser inhibida por compuestos químicos como: azaquanina, 5-fluorouracil, actinomycin D, cicloheximide y phenethyl alcohol (Papavizas, 1985).

Un aspecto importante en la esporulación que ha sido completamente olvidado, es la habilidad de *Trichoderma* spp para producir clamidosporas y la importancia que estas tienen para llevar a cabo un control biológico. Cabe mencionar que las clamidosporas recién formadas presentan un alto porcentaje de germinación aproximadamente 75% bajo condiciones óptimas y en caso contrario solamente de 13% a 31% de las preparaciones con clamidosporas son viables (Lewis, 1984).

2.7.3.2 Producción de metabolitos secundarios.

En los primeros experimentos para obtener y caracterizar los metabolitos tóxicos de *Trichoderma* spp se emplearon técnicas muy simples y conforme al avance de los estudios se han realizado mejoramientos para continuar con la introducción de nuevas técnicas para conocer mejor los metabolitos producidos (Papavizas, 1985).

El primer experimento para determinar la producción de metabolitos tóxicos por las especies de *Trichoderma* fue realizado por Weindling, él demostró la producción de un metabolito fungicida por *Trichoderma lignorum* (Weindling, 1941 citado por Papavizas, 1985). En un segundo experimento Weindling y Emerson aislaron en forma cristalina un metabolito orgánico demasiado tóxico para *Rhizoctonia solani*, este metabolito más tarde fue conocido con el nombre de gliotoxin (Weindling, 1941 citado por Papavizas, 1985). Posteriormente Brian y McGoman (1945) descubrieron un segundo metabolito altamente fungitóxico, el cual se nombró viridin, y fue producido por *Trichoderma viride* (citados por Papavizas, 1985). Treinta años después del descubrimiento del gliotoxin y viridin se reanudaron las investigaciones relacionadas a la producción de metabolitos tóxicos generados por las especies de *Trichoderma* manifestando intereses en conocer el papel que estos juegan en el control biológico (Papavizas, 1985). En el año 1971 se demostró la producción de metabolitos volátiles y no volátiles diferentes a gliotoxin y viridin, también se encontraron metabolitos solubles en cloroformo; trichodermin producido por *Trichoderma viride* y *Trichoderma polysporum*, así mismo se determinó la producción de metabolitos peptídicos por *Trichoderma hamatum* (Dennis, 1971).

2.7.4 Distribución.

Tomando en cuenta los factores ecológicos que afectan la distribución de *Trichoderma* spp en su hábitat natural podemos entender el comportamiento de su dinámica poblacional, sobrevivencia y proliferación en el suelo y rizosfera (Papavizas, 1985).

Las especies del género *Trichoderma* son mohos verdes cosmopolitas, se les puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos de varias zonas; están adaptados a diferentes condiciones ambientales y a eso debe su amplia distribución. Algunas especies prefieren localidades secas-templadas y otras templadas-frías (Guzmán, 1993). Las diferentes especies de *Trichoderma* tienen preferencias para desarrollarse, *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii* están adaptadas a condiciones de humedad excesiva en el suelo, mientras que *Trichoderma viride* y *Trichoderma polysporum* están restringidos a áreas donde prevalecen las altas temperaturas; *Trichoderma harzianum* es común encontrarlo en regiones de climas cálidos y *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma koningii* están ampliamente distribuidas en áreas de diversas condiciones climáticas (Papavizas, 1985). Frecuentemente *Trichoderma* spp se presentan como un colonizador secundario en el material orgánico descompuesto, también se encuentra en la superficie de las raíces de varias plantas (Parkinson, 1963 citado por Papavizas, 1985), y algunas veces es posible encontrarlo en la corteza descompuesta, especialmente cuando está dañada por otros hongos (Danielson, 1973 citado por Papavizas, 1985) y rara vez se encuentra en esclerocios o propágulos de otros hongos (Wells, 1972; Davet, 1979 citados por Papavizas, 1985).

También se ha determinado que influyen en el desarrollo de *Trichoderma* spp factores físicos y químicos como: pH del suelo, textura, concentración de CO₂ y HCO₃, contenido de sales, materia orgánica y la presencia o ausencia de otros microorganismos en el suelo (Papavizas, 1985).

2.7.5 *Trichoderma* spp agente biocontrolador.

2.7.5.1 Antecedentes.

El género *Trichoderma* fue reconocido primeramente como antagonista de hongos fitopatógenos al actuar como micoparásito, competir por espacio, nutrientes y producir antibióticos volátiles y no volátiles (Chet, 1987); en estudios posteriores se han reportado sus efectos antagónicos en bacterias fitopatógenas, también se han registrado beneficios en el área de la medicina y su complejo enzimático es empleado en procesos alimenticios y de biodegradación (Wells, 1988).

Los primeros experimentos realizados con *Trichoderma* spp en el área agrícola iniciaron hace 50 años por Weindling, en la actualidad varios investigadores han reportado el control efectivo de enfermedades provocadas por *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium* spp, *Sclerotinia* spp, *Helminthosporium* spp, *Fusarium* spp, *Armillaria* spp, *Colletotrichum* spp, *Verticillium* spp, *Venturia* spp, *Endothia* spp, *Pythium* spp, *Phytophthora* spp, *Rhizopus* spp, *Diaporthe* spp y *Fusicladium* spp (Hadar, 1979; Henis, 1983; Chet, 1985; Sivan, 1987, González, 1996).

La mayoría de los experimentos con este agente biocontrolador se han realizado bajo condiciones de laboratorio e invernadero, sin embargo en los últimos años se han aplicado pruebas en campo, con la finalidad de obtener resultados reales de la actividad biológica de *Trichoderma* spp bajo condiciones naturales.

2.7.5.2 Mecanismos de acción.

Las interacciones antagonísticas que ocurren entre *Trichoderma* spp y su hospedero son micoparasitismo, competencia y antibiosis (Wells, 1988).

2.7.5.2.1 Micoparasitismo.

Weindling (1932) En su primera investigación sobre *Trichoderma* spp, esquematizó el micelio del antagonista desarrollándose paralelamente a una hifa de *Rhizoctonia* spp, en este caso las hifas de los dos organismos no tuvieron que hacer contacto para que la hifa hospedero perdiera la integridad de su protoplasma, con esta investigación se concluyó que *Trichoderma* spp es capaz de actuar como micoparásito sin tener contacto físico (citado por Wells, 1988).

La teoría inicial de Weindling fue rechazada por los investigadores contemporáneos debido a que en este primer reporte no se mencionaban los efectos del ataque, en investigaciones actuales se ha determinado que el desarrollo de las hifas de *Trichoderma* spp es directo hacia las hifas hospedero (Chet, 1981), mismas que sujeta, penetra y extrae los nutrientes provocando daños parciales en las zonas que permanecieron en contacto con el antagonista (Elad, 1982).

En la medida que avanzan las investigaciones han comprobado que la hifa hospedero debe ser debilitada para que el antagonista pueda penetrar para aniquilar al patógeno. El grado de micoparasitismo depende de la especie de *Trichoderma* empleada, ya que cada una presenta diferentes niveles de daño al atacar (Henis, 1983).

1.7.5.2.2 Antibiosis.

La producción de antibióticos por *Trichoderma* spp no esta correlacionada con el grado de micoparasitismo, sin embargo son mecanismos que forman parte del potencial antagonístico del hongo. Las enzimas producidas por este género son elementos importantes que facilitan su habilidad para competir por sustratos y atacar al patógeno.

La antibiosis abarca todos los productos químicos antagonísticos producidos y relacionados al ambiente que rodea *Trichoderma* spp, esto incluye compuestos antibióticos y compuestos enzimáticos extracelulares (Elad, 1982).

Los compuestos químicos producidos por *Trichoderma* spp son: Trichodermin, es un sequisterpeno que fue descubierto por Godfredsen y Vangendal en 1965: Dermadin, ácido monobásico insaturado, es efectivo contra hongos y bacterias, este compuesto fue caracterizado por Pyke en 1966. Suzukacillin y Alamethicine compuestos peptídicos ambos con propiedades fungicidas y bactericidas, fueron caracterizados por Meyer en 1967, el último antibiótico descubierto fue un acetaldehído volátil, este fue reportado en el año 1971 por Dennis (Wells, 1988). Recientemente Ghisalberti (1990) citado por Strange (1993). determinó la habilidad inhibidora de *Trichoderma harzianum* sobre *Gaeumannomyces graminis f. sp. tritici* a través de la liberación de pironas, mismas que son liberadas por *T. koningii*, *T. hamatum* y *T. fasciculatum*.

Trabajos recientes se han dirigido a los efectos que produce *Trichoderma* spp en la degradación de la β -1,3 glucanasa, chitinasa y celulasa. La actividad enzimática y antibiótica de este hongo están íntimamente combinadas para ocasionar un amplio espectro biocontrolador (Wells, 1988).

1.7.5.2.3 Competencia.

La omnipresencia de *Trichoderma* spp en los suelos de todo el mundo es una evidencia de que este género es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales (Guzmán, 1993), la habilidad competitiva de este antagonista puede ser afectada por las propiedades físico-químicas del suelo (Wells, 1988) y los microorganismos que habitan el sustrato de desarrollo pueden generar efectos fungistáticos sobre los propágulos del antagonista (Papavizas, 1985). La competencia por *Trichoderma* spp se ha demostrado con varias investigaciones. Bliss (1951) concluyó que el antagonista llega a sobrevivir en suelos fumigados, durante su establecimiento aprovecha todos los nutrientes disponibles (citado por Wainwright, 1992). Hulme (1970) Demostró el aprovechamiento de todos los carbohidratos no estructurados por *Trichoderma viride* antes de la invasión por basidiomicetos (citado por Wells, 1988).

1.7.6 Producción masiva de *Trichoderma* spp.

La producción masiva de *Trichoderma* spp se ha realizado mediante fermentaciones sólidas y líquidas (Castellanos, 1996), mismas que contienen esporas, micelio, clamidosporas o bien mezclas de estas estructuras conocidas como unidades formando colonias (ufc) (Papavizas, 1985).

La producción de *Trichoderma* spp en fermentaciones líquidas se obtiene a partir de subproductos agrícolas económicos como son almidones, maíz hidrolizado, productos de soya, levadura de cerveza y melaza; con este sistema de fermentación se desarrollan grandes cantidades de biomasa en un periodo de seis días de incubación (Papavizas, 1984). La calidad del biopreparado obtenido con esta tecnología es de 1 a 5×10^8 ufc/ml (Castellanos, 1996).

Las fermentaciones sólidas en la producción masiva de *Trichoderma* spp constituyen la tecnología principal para su obtención, debido a que no se requiere de elevadas inversiones económicas y tecnológicas.

Los sustratos orgánicos para este tipo de fermentación son granos de cebada, aserrín (Hadar, 1979), trozos de corteza, salvado de trigo (Sivan, 1984), cabecilla de arroz, harina de maíz, paja de arroz, cáscara de café y sorgo (Brito, 1996). Las concentraciones de bioproducto final en estos sustratos han sido de 3 a 9×10^7 ufc/ml y 1 a 5×10^9 ufc/ml (Castellanos, 1996).

Las especies del género *Trichoderma* que se han producido en medios sólidos son *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* y *Trichoderma* spp (cuadro 1).

| AGENTE CONTROLADOR | PATOGENO CONTROLADO | PRODUCCION MASIVA |
|------------------------------|--|--|
| <i>Trichoderma viride</i> | Damping-off en plántulas. Disminuye daños causados por <i>Rhizoctonia solani</i> . Disminuye los esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> en el suelo. | Biopreparado sólido conocido comercialmente como BINAB y T. SEPPIC. Sustratos orgánicos colonizados (paja de trigo, aserrín, semillas de girasol, avena y pastos). |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | Damping-off en plántulas de algodón, rábano y soya. Disminuye efectivamente la población de <i>R. solani</i> . | Ha sido producido de la misma forma que <i>Trichoderma viride</i> . |
| <i>Trichoderma hamatum</i> | Damping-off en algodón. Responsable de suprimir a <i>R. solani</i> en suelo. Protege plántulas de chícharo y rábano de <i>Pythium</i> spp y <i>R. solani</i> . | La producción no se ha concluido con éxito, debido al elevado índice de contaminaciones. |
| <i>Trichoderma</i> spp. | Controla patógenos causantes del Damping-off en semillas de tomate, chile, lechuga y pepino. Protege plántulas de café en vivero contra enfermedades radiculares. | La producción se ha realizado en fermentaciones líquidas y sólidas, empleando sustratos como: cabecilla de arroz, paja de arroz, aserrín, bagacillo y cáscara de café. |

Cuadro 1. Producción masiva en sustratos orgánicos de algunas especies del género *Trichoderma* (Upadhyay, 1988; Castellanos, 1996).

1.7.6.1 Métodos de aplicación.

Los métodos para la aplicación de *Trichoderma* spp son aspersión aérea, diseminación, tratamiento radicular y tratamiento a la semilla, cada una de estas técnicas han sido probadas en invernadero y campo (Chet, 1990).

Aspersión aérea. Esta técnica es empleada, cuando el biopreparado es líquido, consiste en asperjar la solución de *Trichoderma* spp sobre el follaje y heridas provocadas por podas en árboles, arbustos y plantas herbáceas. Este método de aplicación fue empleado por Pottle en 1977, cuando inoculó árboles de maple rojo con *Trichoderma harzianum*, para prevenir la invasión por hymenomycetes, la protección duro 21 meses, sin embargo después de 31 meses el 14% de las heridas tratadas fueron invadidas (citado por Papavizas, 1985). También la aspersión foliar ha generados resultados satisfactorios al reducir *Pseudoperonospora cubensis* en pepino (Castellanos, 1996).

Diseminación. Consiste en la aplicación del biopreparado en forma sólida alrededor de la planta enferma o sobre el surco, este método se emplea con el fin de establecer la población (Chet, 1990). Con la introducción de *Trichoderma* spp al suelo se ha controlado efectivamente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium* sp (Hadar, 1979; Harman, 1981; Henis, 1983).

Tratamiento a la semilla. Esta técnica de aplicación presenta dos variantes: 1) Inmersión, consiste en sumergir la semilla en una suspensión conidial durante 10 minutos y 2) Peletización, las semillas a tratar son sumergidas en la suspensión conidial y un sustrato inerte durante 20 minutos; estos tratamientos son usados principalmente como preventivos (Castellanos, 1996). Harman (1980) desarrolló un tratamiento para semillas de chícharo y rábano, la incorporación del antagonista se realizó en forma deshidratada al cual se le adicionó quitinasa, el empleo de esta técnica mejoró la actividad micoparásita del hongo al inhibir a *Phytium* spp y *Rhizoctonia solani* de 88 a 67% respectivamente e incrementó el nivel de la población de *Trichoderma* sp en el suelo de 1.5 a 4.5 veces.

Tratamiento radicular. En esta actividad las plántulas son sumergidas en una suspensión conidial antes del trasplante en suelos infestados (Chet, 1990). Elad (1980) realizó tres experimentos en los cuales inoculó plántulas de frijol, tomate y algodón con *T. harzianum*.

En el primer experimento las plántulas de frijol fueron transplantadas en un suelo infestado con *Rhizoctonia solani*; los resultados obtenidos de este trabajo fueron la disminución de la enfermedad hasta 87% y aumentó en el rendimiento de las vainas en 20%. El segundo experimento realizado con plántulas de algodón sembradas en parcelas infestadas con *R. solani*, el porcentaje de plantas enfermas en la parcela testigo fue de 44% y en las parcelas tratadas fue de 23%. En el último experimento, las plántulas de tomate fueron sembradas en un suelo infestado con *Sclerotium rolfsii*, en este caso *Trichoderma harzianum* redujo significativamente el porcentaje de plantas enfermas a 20% después de 123 días de su transplante.

El éxito de cada uno de los tratamientos depende de la concentración de inóculo empleada. Castellanos (1996) recomienda para tratamiento a la semilla en inmersión el biopreparado en forma líquida o sólida al 10% (v/v); para peletización biopreparado líquido o sólido al 50% (v/v). Tratamiento para plántulas biopreparado líquido o sólido al 10% (v/v). Diseminación o tratamiento al suelo, en forma líquida 30 a 40 l/ha; sólida 8 a 10 kg./ha en siembra o aplicaciones recomendadas. Aspersión foliar 8 a 10 kg./ha (20 gr/l) o 30 a 40 l/ha (producto al 10%).

2.8 Características de los hongos fitopatógenos *Fusarium* spp y *Rhizoctonia* spp.

1.8.1 *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1915, él consideró las siguientes características: conidióforos alargados en forma de botella con ramas a intervalos regulares o verticilados, septados, individuales o agrupados en esporodoquios; conidios de dos tipos: microconidios elípticos o piriformes y macroconidios en forma de media luna o elípticos; clamidosporas, si se presentan son globosas, ovals o piriformes (Romero, 1988). *Fusarium* spp es un organismo saprófito, y una vez que se introduce en el terreno de cultivo se establece por tiempo indefinido, su número poblacional varía en forma considerable, dependiendo de la susceptibilidad del cultivo y tiempo que permanezca el cultivo hospedero en campo, generalmente inverna en el suelo y residuos de cosecha (Agrios, 1995).

Este organismo patógeno produce marchitamientos vasculares principalmente en flores, hortalizas anuales, plantas herbáceas perennes y malezas. *Fusarium* spp es un hongo que habita en el suelo, infectando a las plantas a través de sus raíces cuando son heridas, tan pronto llega a la raíz, el micelio se extiende hasta los vasos xilemáticos donde forma microconidios y subsecuentemente es transportado por toda la planta mediante la corriente de transpiración (Agrios, 1995).

2.8.2 *Rhizoctonia* spp.

Este género se caracteriza por fructificaciones asexuales y esporas sexuales ausentes; esclerocios café o negros de forma variable, frecuentemente pequeños y no muy compactos, formados por filamentos miceliales y conectados a ellos; las hifas y el micelio son café, con células grandes y ramas saliendo aproximadamente en ángulo recto.

Rhizoctonia solani Kunh. Es la especie de mayor importancia en este género. Es un habitante del suelo con capacidad patogénica tan extraordinaria que se encuentra en plantas de todo tipo: malezas, ornamentales, árboles forestales y cualquier cultivo hortícola con síntomas de ahogamiento, cancrrosis, pudrición de la corona y anidamiento. La cancrrosis del tallo y pudrición de la raíz se presenta en plantas adultas. En éstas justamente debajo de la superficie del suelo, se forman lesiones hundidas, de color café rojizo, si las condiciones de suelo y clima son favorables llegan a abarcar toda la base del tallo y las raíces. En tubérculos y raíces carnosas o tallos suculentos *R. solani* pudre la parte más alta o corona, ocasionando un amarillamiento y enanismo o muerte del follaje (Romero, 1988).

III. Materiales y Métodos.

3.1 Muestreo.

Las muestras de suelo para llevar a cabo el aislamiento de las cepas nativas de *Trichoderma* spp se tomaron de las parcelas del área experimental cultivadas con alfalfa (5, 14 y 21) e invernaderos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) en los que se cultivaban fresa y clavel, y un predio cultivado con verdolaga del poblado San Francisco, Xochimilco, Méx. D, F.

Una vez ubicados los predios a muestrear se procedió a localizar las áreas donde se encontraban las plantas más sanas y robustas, posteriormente se tomaron aproximadamente 150 gramos del suelo de la zona de la rizosfera a profundidades de 5 y 10 cm, así como segmentos de raíz (Sandoval y Saenz, 1992). El número de muestras por predio fue de 20. Las muestras de suelo fueron colocadas en bolsas de plástico y las raíces en bolsas de papel, mismas que fueron etiquetadas con los siguientes datos: fecha, localidad, cultivo, altitud y textura de suelo.

3.2 Aislamiento e identificación.

3.2.1 Procesamiento de las muestras.

Las muestras fueron secadas a la sombra durante 24 horas, posteriormente se tamizaron y tomaron 60 gramos de suelo por muestra para juntarlas en una bolsa y obtener una muestra compuesta, de la cual se pesó un gramo; con el cual se realizó una dilución 1:100 con agua destilada estéril, enseguida se tomó una alícuota de 1 ml y se vació en cajas de petri con medio de cultivo selectivo agar sabourand, sembrando 3 cajas por muestra y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Las raíces también fueron colocadas en el mismo medio de cultivo, el tratamiento previo al que se sometieron fue la desinfección con hipoclorito de sodio al 6 % durante 2 minutos, por último se enjuagaron con agua destilada estéril, y se colocaron 3 segmentos de raíz por caja de petri, con tres repeticiones, se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Sandoval y Saenz, 1992).

Los medios de cultivo empleados para el aislamiento de las cepas de *Trichoderma* spp fueron agar sabourand (rosa de bengala 17 ppm, sulfato de estreptomina 30 ppm, formaldehído 20 ppm y 1000 ml agua destilada) (Domsch *et al.*, 1980), y papa dextrosa agar (PDA) sintético de la marca bioxon (39 g/l).

3.2.2 Microcultivo.

Una vez desarrolladas en cajas de petri las colonias que presentaban características físicas semejantes a *Trichoderma* spp se procedió a montar un microcultivo para llevar a cabo la identificación apoyados de claves taxonómicas y fotografías del género. El microcultivo es un método de aislamiento que sirve para observar intactas y a diferentes intervalos de tiempo cada una de las estructuras vegetativas y reproductivas de hongos filamentosos, este es un método que se considera casi indispensable para la clasificación e identificación de hongos. El procedimiento para el montaje del microcultivo fue el siguiente:

- 1.-Esterilizar el material de cristalería a utilizar (cajas de petri, porta y cubre objetos, triángulos y tubos de ensaye).
- 2.- Elaboración del medio de cultivo agar sabourand.
- 3.- 24 horas después con un tubo de ensaye (1 cm diámetro) se realizaron cortes circulares del medio de cultivo.
- 4.- Los cortes fueron colocados sobre el porta objetos, se inoculó el medio con el hongo de interés y se colocó el cubre objetos.
- 5.- Por último se colocó el triángulo dentro de la caja de petri y sobre este la preparación antes mencionada y se incubo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Dhingra, 1987). Se elaboraron 6 cajas de petri con microcultivo, las observaciones fueron realizadas a 24 , 48, 72, 96, 120 y 168 horas de sembrado el hongo.

Las preparaciones realizadas a través del microcultivo se tiñeron con el colorante azul de algodón, con la finalidad de observar con mayor nitidez las estructuras al microscopio para su identificación. Las sustancias para elaborar el colorante fueron: fenol en cristales 20 grs, ácido láctico 20 ml, glicerol 40 ml, agua destilada estéril 20 ml y colorante azul de algodón 0.05 grs (Phillips, 1981).

El resultado de la identificación de cepas nativas del género *Trichoderma* spp fue el aislamiento de tres cepas que fueron denominadas Tx, aislada de un predio ubicado en San Francisco, Xochimilco; D, F.; Ti obtenida de una tina experimental de un invernadero de la FESC y TBp aislada de un sustrato en el que se cultivaban setas comestibles (*Pleurotus* sp).

La literatura ha reportado que las especies del género *Trichoderma* manifiestan crecimiento rápido al ser incubadas a 20 °C (Bissett, 1991), pero también en experimentos realizados en campo se ha demostrado que la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp disminuye a temperaturas inferiores a 18 °C y superiores a 32 °C (Chet, 1987). Tomando en cuenta esta situación y las temperaturas (entre 20 °C y 30 °C) en las cuales presentan su desarrollo óptimo de los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* se decidió establecer 25 ± 2 °C como temperatura de incubación para el desarrollo de todo el experimento.

3.3 Pruebas de antagonismo.

Las pruebas de antagonismo se realizaron *In vitro* en cajas de petri (9 cm de diámetro). Las cajas fueron divididas a la mitad y se colocó en los extremos 1 disco de 0.5 cm de cada uno de los microorganismos (*Trichoderma* sp./ Patógeno) en cultivo dual. El medio de cultivo utilizado fue PDA. Las cajas se incubaron a 25 ± 2 °C (Sandoval y Saenz, 1992). Estas pruebas de antagonismo se realizaron dos veces con el fin de observar diferencias y obtener mayor exactitud en el comportamiento de los hongos de enfrentamiento (organismo antagonista/hongo fitopatógeno).

Los hongos fitopatógenos empleados fueron *Rhizoctonia solani* aislada de un tubérculo de papa contaminado con el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* aislado de suelo cultivado con frijol. La técnica de aislamiento para *R. solani* fue a través de partes vegetales (tubérculo de papa), se realizaron cortes de 0.5 cm de diámetro, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 6% durante 2 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril fueron colocados tres cortes por caja de petri. *F. oxysporum* fue aislado por medio de una dilución en serie 1:100, se tomo 1 gramo de suelo infestado y se colocó en un tubo de ensaye con 9 ml de agua destilada estéril, se agitó y se dejo reposar durante 10 minutos, posteriormente se tomó 1 ml que fue colocado en el siguiente tubo de ensaye, del cual se volvió a tomar 1 ml y se colocó en medio de cultivo. El medio de cultivo empleado para el desarrollo de los dos microorganismos fue PDA; la temperatura de incubación fue de 25 ± 2 °C durante 48 horas.

3.3.1 Diseño experimental.

El diseño experimental aplicado a las pruebas de antagonismo fue diseño en bloques al azar, mismo que constó de 3 tratamientos y dos bloques con 4 repeticiones cada uno. Los parámetros evaluados fueron: a) crecimiento total del patógeno, b) distancia de solapamiento, c) tiempo total de cobertura y d) porcentaje de inhibición. A los resultados obtenidos se les aplicó análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con nivel de significancia al 5 % (Anexo 2).

3.3.2 Toma de datos.

Las observaciones se iniciaron 24 horas después de haber sembrado los organismos en cultivo dual. El crecimiento diario del patógeno se midió en forma lineal. La distancia de solapamiento se empezó a medir cuando *Trichoderma* sp rebasó su área de crecimiento (aproximadamente 4 cm), también se midió en forma lineal. El tiempo que tarda el antagonista en cubrir la caja fue medido 24 horas después de la siembra. El porcentaje de inhibición del hongo fitopatógeno se determinó midiendo el crecimiento diario del organismo patógeno (testigo) y se aplicó la siguiente fórmula (anexo 1):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Testigo} - \text{Patógeno en Cultivo Dual}}{\text{Testigo}} \times 100$$

3.4 Producción del biofungicida.

El procedimiento para elaborar el biofungicida fue mediante una fermentación sólida bifásica estática, la cual consiste de dos fases: 1) Preinóculo y 2) Producto final.

La primera fase preinóculo se obtuvo a partir de las cepas aisladas de *Trichoderma* spp a cada una se le agregaron 100 ml de agua destilada estéril, se agitaron para obtener una suspensión de esporas, posteriormente se tomaron 2 ml con una concentración de 3.4×10^8 esporas/ml de la cepa Tx; 4.3×10^8 esporas/ml cepa TBp y 3.5×10^8 esporas/ml cepa Ti, con esta cantidad se inocularon 20 gramos de salvado de trigo con 50 ml de agua destilada previamente esterilizados en matraces erlenmeyer, una vez inoculados se incubaron a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ en posición horizontal durante 6 días. Obtenido el preinóculo, se agregaron 100 ml de agua destilada estéril a cada matraz, se agitaron para extraer los conidios y se tomaron 4 ml de suspensión a una concentración de 1×10^8 esporas/ml cepa Tx; 1.3×10^8 esporas/ml cepa TBp y 1.1×10^8 cepa Ti, para inocular frascos de 500 ml esterilizados con 50 gramos de salvado de trigo y 100 ml de agua destilada. La incubación se realizó a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 7 días. Transcurrido el tiempo requerido para la invasión total del sustrato, en un recipiente de vidrio se mezcló el sustrato (250 gramos por cepa individual) con 500 ml de agua destilada estéril, se agitó durante 10 minutos y por último se filtró para obtener el producto final.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Aislamiento de cepas.

Los muestreos de suelo realizados de los diferentes sitios (San Francisco, Xochimilco; D, F., parcelas experimentales y cubiertas plásticas de la FESC) llevaron a la obtención de dos especies del género *Trichoderma*, una obtenida de un predio cultivado con verdolaga en San Francisco, Xochimilco; D, F. y una segunda cepa aislada de una tina experimental de un invernadero de la FESC, en la que se cultivaban rábano y chícharo. También se obtuvo una cepa que fue aislada de un cultivo de setas comestibles (*Pleurotus* sp.), por lo regular en el cultivo de hongos comestibles el género *Trichoderma* es considerado un hongo contaminante (Guzmán, 1993). Es importante mencionar que de las parcelas experimentales 5, 14, 21 e invernaderos de la FESC no se obtuvo ningún aislamiento del género *Trichoderma*, la ausencia de *Trichoderma* spp en esos lugares puede ser explicada por dos razones: la primera debida a la ausencia de materia orgánica, misma que toma el hongo como sustrato alternativo en ausencia de hospedero (hongo patógeno); sin embargo, se descartó esa posibilidad debido a que los análisis de suelo de esos sitios los catalogan con nivel medio en materia orgánica, ya que presentan un contenido de 3% a 4% de materia orgánica. El segundo motivo y en este caso el principal se debe a las prácticas agronómicas que se han llevado a cabo en esas parcelas experimentales, ya que con frecuencia se evalúan dosis óptimas de productos químicos como insecticidas, fungicidas y herbicidas, o bien son productos que se aplican para el control de alguna plaga presente en los cultivos establecidos durante el semestre. Por lo general la aplicación de cualquier plaguicida empleado racional o irracionalmente, además de controlar efectivamente su organismo blanco, perjudica los organismos benéficos de cualquier agroecosistema.

La identificación de los aislamientos obtenidos, dos de suelo y uno de sustrato para el cultivo de setas comestibles presentan las siguientes características. La cepa TBp se caracteriza por su rápido desarrollo de 7 a 9 cm en diámetro después de 4 días a 20°C, presenta micelio aéreo, la conidiación es predominantemente expansiva tanto que llega a cubrir totalmente la caja de petri.

Las hifas que presenta son hialinas, contiene clamidosporas en abundancia, éstas se encuentran intercaladas en las hifas o en la parte terminal de las ramificaciones pequeñas. Los conidióforos son hialinos, amplios en la base, generalmente se encuentran en ramificaciones primarias que casi llegan a formar ángulos rectos, también forman ramificaciones secundarias agrupadas de 2 a 4 en forma piramidal. Las fiálides son ampuliformes, subglobosas o langeniformes, cuando estas estructuras son terminales son marcadamente amplias en la base, abultadas en la parte media y abruptamente estrechas en el ápice, las fiálides se agrupan de 2 a 6 en las ramas terminales. Los conidios son subglobosos u ovoides, adquieren una coloración verde pálido. Con las características anteriormente mencionadas (apoyados en la clasificación taxonómica de Bissett, 1991), se determinó la identificación a nivel de especie que corresponde a *Trichoderma harzianum* Rifai. (figura 3).

Las características de la cepa Ti corresponden a la especie *Trichoderma fasciculatum*. Es una especie de crecimiento moderado, aproximadamente 5 a 7 cm en diámetro después de 4 días a 20°C. Su micelio es aéreo, escaso y delgado; las hifas son hialinas con abundancia de clamidosporas, localizadas en las zonas terminales. Los conidióforos son hialinos, amplios en la base, gradualmente abultados en la mayoría de su longitud, ramificados irregularmente, las ramificaciones se levantan casi en ángulo recto, las ramas primarias son relativamente largas principalmente hacia la base del conidióforo, se encuentran solas o frecuentemente en pares o grupos de tres; las ramificaciones secundarias presentan escasez de conidióforos, estos generalmente se ubican en las áreas terminales, la célula apical usualmente se encuentra solitaria. Las fiálides son ampuliformes, amplias en la base, poco abultadas en la parte media y estrechas en el ápice, se encuentran solitarias o en grupos de 2 a 5; las fiálides terminales son estrechamente alargadas principalmente en las ramificaciones secundarias. Los conidios son elípticos, una vez presentes en la cepa toman una coloración verde opaco. (figura 4).

La identificación de la cepa Tx a nivel de especie no fue posible, debido a las semejanzas morfológicas que presentaba con dos especies del género, razón por la cual no se llegó a determinar con exactitud la especie y sólo fue identificada como *Trichoderma* sp. Las características generales de esta cepa son: Crecimiento rápido 7 a 9 cm en diámetro después de cuatro días a 20°C. El micelio es aéreo con hifas hialinas; los conidióforos presentan un eje principal con ramificaciones primarias levantadas en intervalos regulares y a la vez se generan ramificaciones secundarias, ramificadas en los niveles apicales. Las fiálides son ampuliformes dispuestas en verticilos que terminan en ramas de conidióforos. La conidiación se da en forma de mechón expandido con una coloración inicial blanquizca hasta llegar a tener un color verde intenso. (figura 5).

4.2 Pruebas *In vitro*.

Los resultados de las pruebas de antagonismo en sus dos repeticiones no presentaron variaciones significativas en las variables evaluadas, los resultados procesados estadísticamente fueron los de la segunda repetición del experimento (cuadro 2, anexo 2).

Estadísticamente para la variable crecimiento total del patógeno se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, el crecimiento total de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* varió de 1.8 cm. cuando se enfrentaron a *Trichoderma* sp., 2.3 cm. con *Trichoderma harzianum* y 2.5 cm. al enfrentarse con *Trichoderma fasciculatum* (figura 6). Las variaciones de crecimiento obedecen a las características de desarrollo, con estos resultados se confirma la habilidad competitiva *In vitro* de *Trichoderma* spp por espacio y nutrimentos en el medio de cultivo.

La variable distancia de solapamiento o grado de hiperparasitismo presentó diferencias significativas entre las tres especies aisladas. El tratamiento *Trichoderma* sp enfrentado con *F. oxysporum* y *R. solani* mostró un hiperparasitismo de 95%, esto tomando en cuenta que la distancia de solapamiento fue de 4.37 cm. y el área de cobertura total era de 4.5 cm. En segunda instancia se ubicó *T. harzianum*, esta especie creció 3.1 cm sobre los hongos fitopatógenos de enfrentamiento, el grado de hiperparasitismo por esta cepa fue de 70% sobre los organismos blanco. La cepa *T. fasciculatum* no mostró ningún efecto de hiperparasitismo sobre sus adversarios, sólo actuó como inhibidor al delimitar el crecimiento

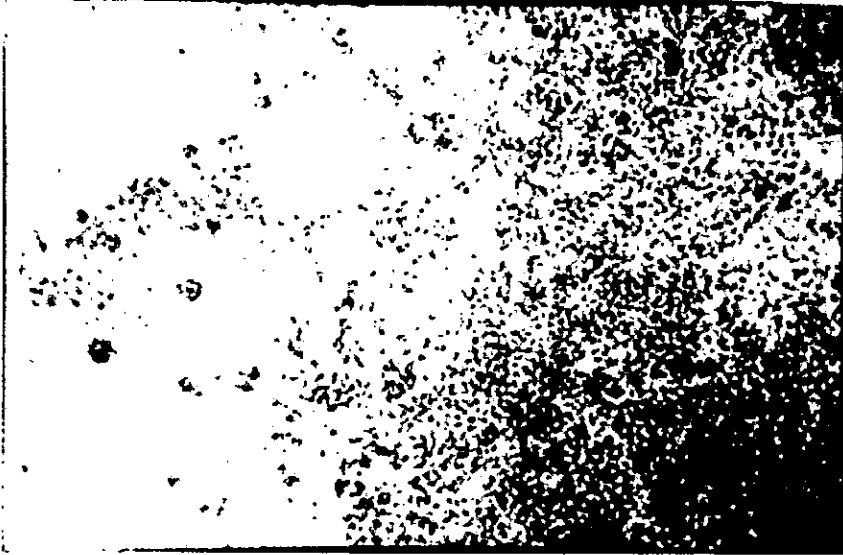


Figura 3. Características morfológicas del aislamiento *Trichoderma harzianum*.

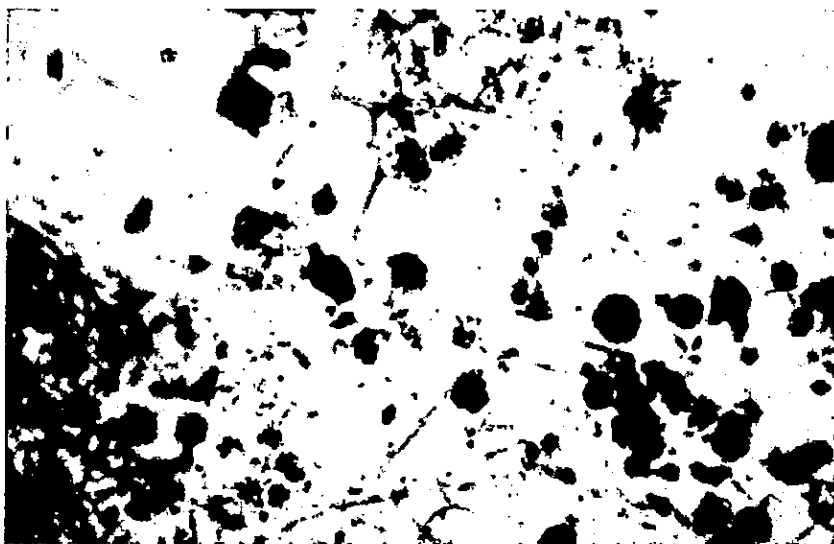


Figura 4. Características morfológicas del aislamiento *Trichoderma fasciculatum*.

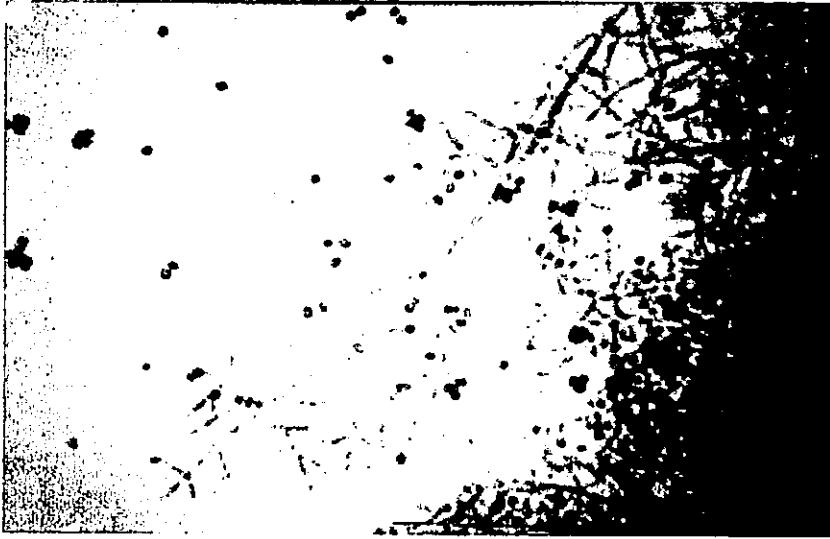


Figura 5. Características morfológicas del aislamiento *Trichoderma* sp.

de los patógenos, siendo este no mayor a 2 cm (figura 7). La evaluación de la distancia de solapamiento fue la más importante debido a que con estos resultados se definió el grado del potencial biocontrolador de *T. harzianum*, *T. fasciculatum* y *Trichoderma* sp, es decir, *T. harzianum* y *Trichoderma* sp son microorganismos hiperparasitos de *F. oxysporum* y *R. solani* mientras que *T. fasciculatum* es un organismo fungistático, porque sólo limitó el crecimiento de *F. oxysporum* y *R. solani* a través de la producción de sustancias antibióticas. La literatura ha reportado la producción de pironas y compuestos peptídicos por esta especie, empero no se llegó a la identificación del tipo de metabolitos producidos.

Los resultados obtenidos de la evaluación del tiempo que tardaron (tiempo de cobertura) *T. harzianum*, *T. fasciculatum* y *Trichoderma* sp en cubrir a *R. solani* y *F. oxysporum* presentaron diferencias significativas. *T. harzianum* y *Trichoderma* sp tardaron entre 174 y 183 horas, es decir, 7 u 8 días en ejercer un control total sobre *R. solani* y *F. oxysporum*. *T. fasciculatum* a 144 horas (5 días) de haber sido montada la prueba de antagonismo detuvo su crecimiento razón por la cual aparece con el menor tiempo (figura 8); esto no quiere decir que en ese lapso de tiempo haya logrado la cobertura del patógeno.

La última variable evaluada porcentaje de inhibición estadísticamente no registró diferencias significativas en los tratamientos, en general se pudo determinar que las tres cepas del género *Trichoderma* aisladas inhibieron el desarrollo de *F. oxysporum* y *R. solani* entre 70% y 80% (figura 9).

| Parámetros evaluados | Tratamientos | | |
|-------------------------------------|--------------|-----------|----------|
| | Tx | TBp | Ti |
| Crecimiento total del patógeno (cm) | 1.8875 | 2.3625 | 2.5125 |
| Distancia de solapamiento (cm) | 4.3750** | 3.1625* | 1.9875 |
| Tiempo de cobertura (hrs) | 183.0000* | 174.0000* | 144.0000 |
| Porcentaje de inhibición | 78.9875 | 73.7000 | 72.0500 |

Cuadro 2. Cuadro general de resultados (anexo 2).

*Significativo ($P < 0.05\%$)

**Altamente significativo ($P < 0.50\%$)

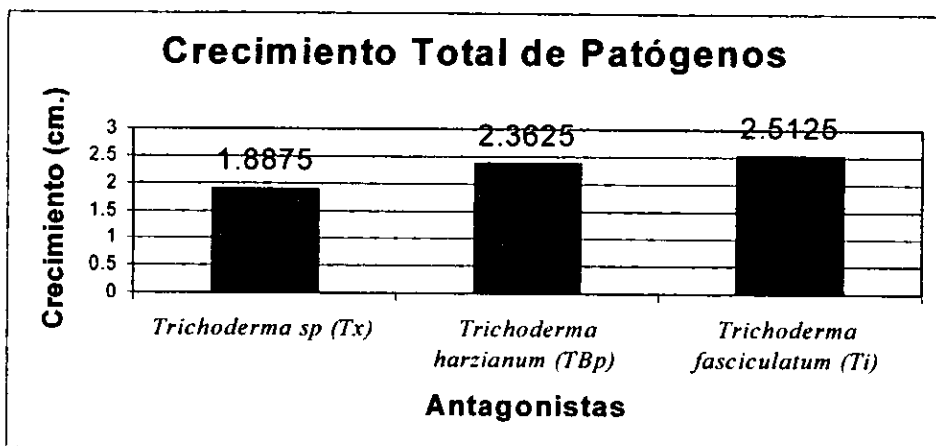


Figura 6. Crecimiento total de los patógenos limitado por los aislamientos antagonistas.

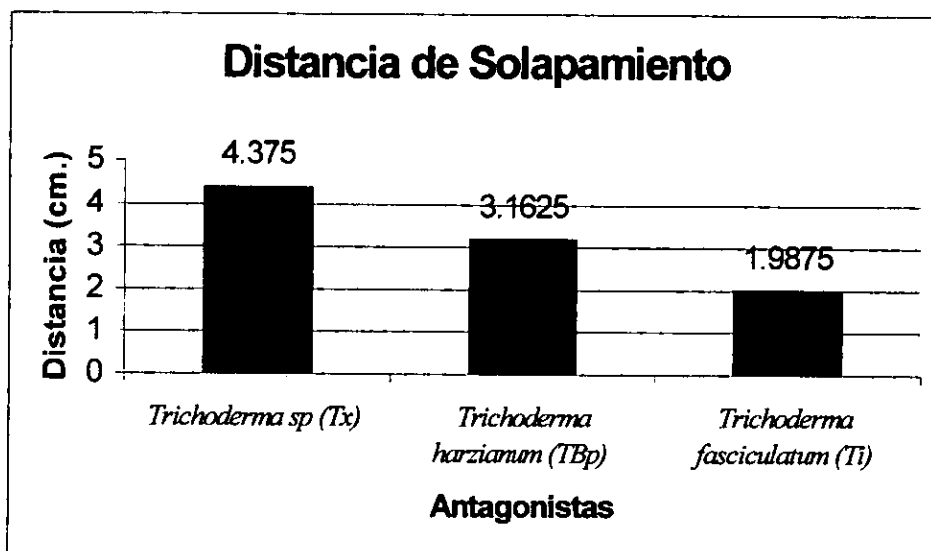


Figura 7. Distancia de solapamiento de los antagonistas sobre los patógenos.

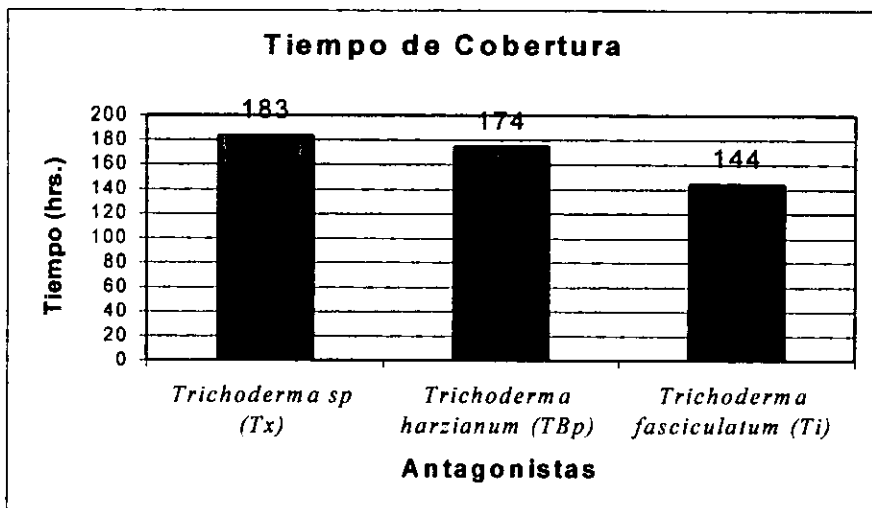


Figura 8. Tiempo de cobertura de los antagonistas sobre los patógenos.

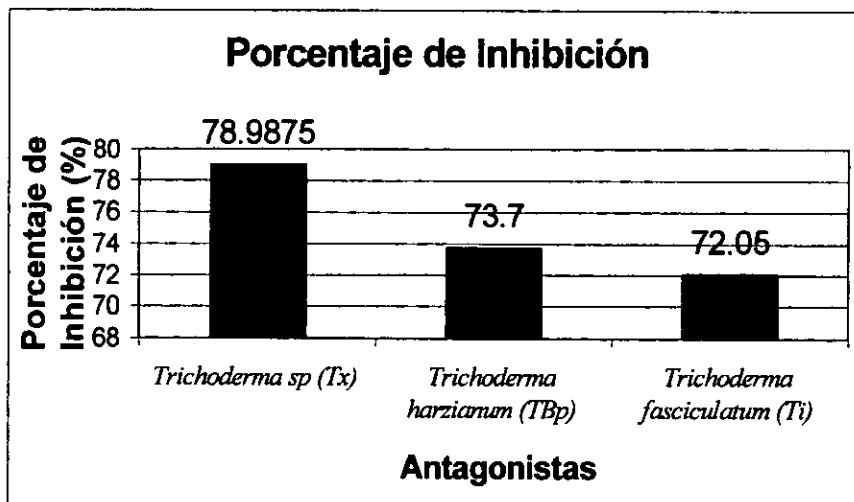


Figura 9. Porcentaje de inhibición de los antagonistas sobre los patógenos.

También se comprobaron a través de fotografías los mecanismos de acción que ejercieron las cepas del género *Trichoderma* aisladas sobre *F. oxysporum* y *R. solani*. Es importante mencionar que las fotografías se obtuvieron de una serie de 15 preparaciones que mostraban las mismas características de daño en las hifas de los hongos fitopatógenos con los que se trabajó.

El mecanismo de acción manifestado por *Trichoderma* sp y *T. harzianum* fue hiperparasitismo, éste inició cuando sus hifas se enrollaron a las hifas de *R. solani* y *F. oxysporum* (figura 10), posteriormente se adhirieron a ellas generando haustorios (figura 11), estructuras encargadas de succionar los nutrientes de la pared celular para concluir con el colapso de las hifas (figura 12). Este hiperparasitismo permitió a *T. harzianum* y *Trichoderma* sp que actuaran como excelentes agentes biocontroladores *In vitro* de *F. oxysporum* y *R. solani* hongos fitopatógenos causantes de marchitamientos y ahogamientos de plántulas de cultivos hortícolas de importancia económica en nuestro país.

El comportamiento de *T. fasciculatum* cuando se enfrentó a *R. solani* y *F. oxysporum* fue como inhibidor a través de antibiosis, una característica particular que presentó esta cepa al momento de la liberación de sus metabolitos secundarios fue la oxidación del medio de cultivo. La literatura ha reportado la producción de pironas y compuestos peptídicos por esta especie; sin embargo, debido a la falta de instrumental necesario para la obtención de esas sustancias antibióticas no se llegó a determinar con exactitud el tipo de antibiótico.

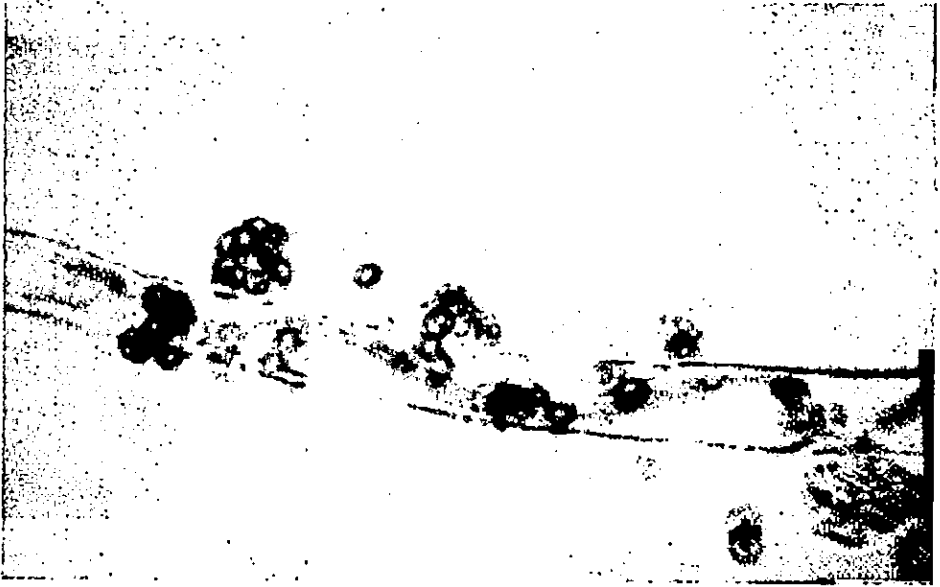


Figura 10. Enrollamiento de *Trichoderma* sp sobre una hifa de *Rhizoctonia solani*.



Figura 11. Succión de los nutrientes de la pared celular de una hifa de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* sp.



Figura 12. Colapso de la hifa de *Rhizoctonia solani*.

4.3 Biofungicida.

Los resultados a los que se llegaron en este aspecto fueron la obtención de tres productos finales, la concentración final fue cepa Tx = 3×10^8 ufc/ml; TBp = 4.1×10^8 ufc/ml y Ti = 3×10^8 ufc/ml, con estas concentraciones se comprobó lo establecido por Castellanos, (1996) ya que él fija un rango de 1 a 5×10^8 en la concentración final de productos biológicos derivados de hongos biocontroladores. El pH de estas soluciones fue de 7.0, por lo que no hubo necesidad de equilibrarlo, ya que se trato de una solución neutra; en cuanto a pureza se observó la presencia de bacterias, situación que perjudica la calidad del producto, pues no se considera apto para su aplicación, debido a la presencia de agentes contaminantes, motivo por el cual es importante continuar con estudios que permitan mejorar la calidad del producto.

La decisión de emplear las tres cepas aisladas para elaborar los biofungicidas se basó en los resultados obtenidos de las pruebas de antagonismo, ya que *In vitro* las cepas *T. harzianum* y *Trichoderma* sp controlaron efectivamente a *F. oxysporum* y *R. solani*. Los productos derivados de estas cepas se podrán emplear para controlar hongos fitopatógenos de suelo como *R. solani* y *F. oxysporum*, causantes de la enfermedad conocida como ahogamiento de plántulas, es importante tomar en cuenta el grado de infestación del suelo, ya que de esta manera se podrá decidir la forma de aplicación del producto controlador (incorporación directa al suelo, inoculación de semillas o bien inoculación de las plántulas antes del trasplante). El producto Ti puede ser aplicado como tratamiento preventivo una vez que se tenga el antecedente de la presencia de los hongos *F. oxysporum* y *R. solani*.

V. CONCLUSIONES.

- En el presente trabajo se llegó al aislamiento de tres especies del género *Trichoderma*. *T.harzianum*, se aisló de un sustrato donde se cultivaban setas comestibles (*Pleurotus* sp). *T. fasciculatum*, obtenida de una tina experimental de un invernadero de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y *Trichoderma* sp fue aislada de un predio cultivado con verdolaga ubicado en San Francisco , Xochimilco; D. F. -
- Los aislamientos que mejor respuesta manifestaron en los enfrentamientos de antagonismo *In vitro* fueron *T. harzianum* y *Trichoderma* sp, estas cepas ofrecen un excelente potencial biocontrolador, ya que hiperparasitaron en su totalidad a los hongos fitopatógenos de suelo *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en un periodo de tiempo de ocho días. La especie *T. fasciculatum* manifesto su antagonismo por medio de antibiosis; sin embargo, no se llegó a identificar el tipo de sustancias antibióticas, debido a la falta del instrumental necesario para su extracción (se ha reportado la producción de pironas y compuestos peptídicos por esta especie).
- Se llegó a la obtención de tres biofungicidas a través de fermentación sólida bifásica estática. La concentración final de los productos fue: Tx = 3×10^8 ufc/ml; TBp = 4.1×10^8 ufc/ml y Ti = 3×10^8 ufc/ml. La calidad de estos productos se calificó de regular debido a la presencia de bacterias contaminantes.

VI. RECOMENDACIONES.

- Continuar con la investigación para llegar a la evaluación *In vivo* de los mecanismos de control de las cepas de *Trichoderma* spp aisladas y de esta manera liberar al organismo antagonista como agente biocontrolador de los hongos fitopatógenos de suelo *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*.
- Es importante la evaluación de sustratos para la producción masiva de las cepas obtenidas, con la finalidad de mejorar la calidad de los productos obtenidos, ya que el biofungicida debe ser libre de organismos contaminantes, aunque formen parte del proceso de fermentación, sería importante determinar una metodología para la eliminación de los organismos contaminantes sin perjudicar al hongo antagonista.
- También es importante evaluar el antagonismo de las cepas aisladas sobre otros hongos fitopatógenos de semilla, follaje y frutos, con este tipo de investigación se ampliaría el espectro biocontrolador de *Trichoderma* sp, *T. fasciculatum* y *T. harzianum*.
- Los puntos anteriores son enfocados hacia el área agrícola e industrial; sin embargo, también tiene lugar el área de la química, ya que con su apoyo se podría llegar a determinar con exactitud el tipo de antibiótico o antibióticos que produce la cepa *T. fasciculatum*. Así mismo, algunas investigaciones reportan especies del género *Trichoderma* como productoras de aromas frutales, entre ellas se ubica a *T. harzianum* como productor de aromas a coco y durazno, con esta especie podría verificarse el trabajo realizado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM., Campus Cuernavaca con una cepa de *T. harzianum* que les fue proporcionada por el Instituto de Micología de Inglaterra (Flores, 1995), en este caso sería importante llevar a cabo una comparación de la calidad de los aromas producidos por la cepa *T. harzianum* aislada en Inglaterra y *T. harzianum* aislada de un sustrato de hongos comestibles.

BIBLIOGRAFIA

Abd-El Moity, T.H. and M.N. Shatla (1981) Biological control of white rot disease of onion *Sclerotium cepivorum* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology** 71:29-32

Adams, P. B. (1986) Effects of soil temperature, moisture and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotivorum*. **Plant disease** 71:170-174

Agrios, G. N. (1995) **Fitopatología**. 2^a edición. Noriega editores. México D, F. 838 pp.

Ashworth, L. J. (1979) Polyethylene trapping of soil in a *Pistachio* nut grove for control of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology** 69:913-917

Backman, P. A. and R. Rodriguez-Kabana (1975) A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. **Phytopathology** 65:819-821

Baker, K. F. and R. J. Cook (1974) **Biological Control of Plant Pathogens**. Freeman Press. San Francisco 433 pp

Baker, R. T. (1985) Biological control of plant pathogens: definitions. En: **Biological Control in Agricultural** (Hoy, M. A. y D. C. Herzog eds.) Academic Press New York 25-32

Bissett, J. (1984) A revision of the genus *Trichoderma* L. Section *Longibrachiatum* Sect. Nov. **Can. J. Bot.** 62:924-945

Bissett, J. (1991) A revision of the genus *Trichoderma* II Infrageneric classification. **Can. J. Bot.** 69:2357-2352

Bissett, J. (1991) A revision of the genus *Trichoderma* III Section *Pachybasium*. **Can. J. Bot.** 69:2373-2417

Bissett, J. (1991) A revision of the genus *Trichoderma* IV Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Can. J. Bot.** 69:2418-2420

Blakeman, J. P. (1985) Ecological succession of leaf surface micro-organism in relation to biological control. In: **Biological Control on the Phylloplane** (Windels, C. E. y S. E. Lindow eds.) American Phytopathological Society, St. Paul Minn. 6-18

Brito, R. R. (1996) Sustitución de sustratos para la reproducción de *Trichoderma* spp. En: **Resúmenes V Jornada Científico-Técnica de Sanidad Vegetal**. Cienfuegos, Cuba 57 pp

Castellanos, L., M. González y T. Santana (1996) **Experiencia en la Producción y Uso de *Trichoderma* spp en el Control de Enfermedades en la Provincia Cienfuegos**. Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Cienfuegos. Cienfuegos, Cuba 1-10

Castellanos, L., T. Santana y A. Pérez (1996) Evaluación de varias cepas de *Trichoderma* spp contra enfermedades radiculares en vivero de café. En: **Resúmenes V Jornada Científico-Técnica de Sanidad Vegetal**. Cienfuegos, Cuba 57 pp

Cate, R. J. (1990) Biological control of pest and diseases: Integrating a diverse heritage. In: **New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases** (Baker, R. R. y D. E. Dunn eds.) Alan R. Liss Inc. New York 23-43

Campbell, R. (1989) **Biological Control of Microbial Plant Pathogens**. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain. 212 pp

Connick, W. R; J. A. Lewis and P. C. Quimby (1990) Biocontrol agents in plant pathology. In: **New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural pests and Diseases** (Baker, R. R. y D. E. Dunn eds.) Alan, R. Liss Inc. New York 354-372

Cook, R. J. and K. F. Baker (1983) **The Nature and Practice of Biological Control of plant pathogens**. American Phytopathological Society, St. Paul Minn. 539 pp

Córdova, G. G. (1995) Hongos entomopatógenos. En: **Memorias del Primer Curso-Taller sobre Agricultura Orgánica**. Universidad Veracruzana. Jalapa, Ver, Méx. 111-131

Cullen, D. and J. H. Andrews (1985) Benomyl marked population of *Chaetomium globosum*: survival on apple leaves with and without benomyl and antagonism to the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Can. J. Microbiol.** 31:251-258

Chet, I. and R. Baker (1980) Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology** 70:994-998

Chet, I., G. E. Harman and R. Baker (1981) *Trichoderma hamatum*: It's hyphal interaction with *Rhizoctonia solani* and *Pythium*. **Microbiology** 7:29-34

Chet, I. and Y. Henis (1985) *Trichoderma* as a biocontrol agent against soilborne pathogens. In: **Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens** (Parker, C.A., A. D. Rovira y K. J. Moore eds.) The American Phytopathological Society, St. Paul Minn. 110-112

Chet, I. (1987) *Trichoderma*: Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: **Innovative Approaches to Plant Disease Control** (Chet, I. ed.) New York 137-156

Chet, I. (1990) Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with treatments. In: **Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens** (Hornby, D. ed.) CAB International. Bound, Great Britain 15-24

Churchill, B. W. (1982) Mass production of micro-organism for biological control. In: **Biological Control of Weeds with Plant Pathogens** (Charudattan, R. y H. L. Walker eds.) John Wiley & Sons Press. New York 139-156

Dennis, C. and J. Webster (1971) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*
I. Production of non-volatile antibiotics. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 57:25-39

Dhingra, D. O. and B. J. Sinclair (1987) **Basic Plant Pathology Methods**. CRC Press USA
355 pp

Domsch, K. H., W. Gams and T.H. Anderson (1980) **Compendium of Soil Fungi**. Vol. I .
Academic press. London 859 pp

Elad, Y., I. Chet and J. Katan (1980) *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective
against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 70:119-121

Elad, Y., I. Chet and Y. Henis (1981) Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry
fields by *Trichoderma harzianum*. **Plant Soil** 60:245-250

Elad, Y., I. Chet and Y. Henis (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma*
harzianum. **Can. J. Microbiol.** 28:719-725

Flores, O. C. (1995) **Producción de Aromas Frutales por *Trichoderma harzianum*:
Aspectos Microbiológicos y del Proceso**. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma del
Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor., Méx. 96 pp

Fravel, D. R., J. J. Marois, R. D. Lumsden and J. W. Connick (1985) Encapsulation of
biocontrol agents in on alginate-clay matrix. **Phytopathology** 75:774-780

González, M. (1996) Efecto antagónico de varias cepas de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium*
spp aislado de la semilla de papa. En: **Resúmenes V Jornada Científico-Técnica de
Sanidad Vegetal**. Cienfuegos, Cuba 57 pp

Guzmán, G., G. Mata y D. Salmones. (1993) **El Cultivo de los hongos comestibles con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales.** IPN México, D. F. 124 pp

Hadar, Y., I. Chet and R. Baker (1979) Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology** 69:64-68

Harman, G. E., I. Chet and R. Baker (1980) *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induce in radish and pea by *Pythium* spp or *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 70:1167-1172

Harman, G. E., I. Chet and R. Baker (1981) Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology** 71:569-574

Henis, Y. and G. C. Papavizas (1983) Factors affecting germinability and suceptibility to attack *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in field soil. **Phytopathology** 73:1469-1474

Jones, R. W., R. E. Pettit and R. A. Taber (1984) Lignite and stillage: carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil. **Phytopathology** 74: 1167-1172

Katan, J. (1981) Solar heating (solarization) of soil for control soilborne pest. **Annual Review of Phytopathology** 19:211-236

Kloepper, J. W. and M. N. Schroth (1981) Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology** 71: 1020-1024.

Lewis, J. A. and G. C. Papavizas (1984) Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. **Plant Pathology** 34:571-577

Lewis, J. A. and G. C. Papavizas (1984) Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp in natural substrates. **Can. J. Microbiol.** 30:1-7

Lumsden, R. D., J. A. Lewis and G. C. Papavizas (1983) Effect of the organic matter on soil-borne plant diseases and pathogen antagonists. In: **Environmentally Sound Agriculture** (Lockeretz, W. ed.) Praeger Press, New York 51-70

Lumsden, R. D. (1992) Mycoparasitism of soilborne plant pathogens. In **The Fungal Community: It's Organization and Role in the Ecosystem** (Carroll, C. G. y D. T. Wicklow eds.) Dekker Press. Peoria, Illinois 275-293

Mehrotra, R., K. R. Aneja and A. K. Gupta (1988) Fungi-Agents of biological control. In: **Handbook of Pest Management Vol. I** (Pimentel, D. ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida 37-47

Nigam, N. and K. G. Mukerji (1988) Biological control = Concepts and Practices = In: **Handbook of Pest Management Vol. I** (Pimentel, D. ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida 1-9

Odum, P. E. (1972) **Ecología**. Editorial Interamericana. México, D. F. 639 pp

Papavizas, G. C. and R. D. Lumsden (1980) Biological control of soilborne fungal propagules. **Annual Review of Phytopathology** 18:389-410

Papavizas, G. C., M. T. Dunn, J. A. Lewis and J. Beagle-Ristaino (1984) Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology** 74:1171-1175

Papavizas, G. C. (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology** 23:23-54

Powell, K. A. and A. R. Jutsum (1993) Technical and commercial aspects of biocontrol products. *Pesticide Science* 37:315-321

Phillips, L. R. and H. Schneider (1981) Botanical sciences. In: **Staining Procedures** (Clark, G. ed.) Baltimore 462 pp

Rifai, M. A. (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers* 116:1-56

Rodriguez, H. A. y C. L. Medina (1996) **Desarrollo de los Entomopatógenos en la Lucha Biológica en la Provincia Cienfuegos Durante los años 1982-1996**. Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal Cienfuegos. Cienfuegos, Cuba 1-14

Rodriguez-Kabana, R. y C. Calvet (1996) Supresividad del suelo y control de enfermedades de origen edáfico. En: **Nuevos Horizontes en Agricultura, Agroecología y Desarrollo Sustentable** (Editado por Pérez, M. J. y R. Ferrara-Cerrato) Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Montecillos, Méx. 109-123

Romero, C. S. (1988) **Hongos Fitopatógenos**. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 347 pp

Sandoval, R. I. y M. Saenz (1992) Metodología. En: **Selección de Aislamientos Prometedores de *Trichoderma* spp para el Biocontrol del Patógeno en el Cultivo de Tabaco**. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. MINAGRI. La Habana, Cuba.2-4

Singh, N. and R. S. Singh (1984) Significance to organic amendment of soil in biological control of soilborne plant pathogens. In: **Progress in Microbial Ecology** (Mukerji, K. G. ed.) Lucknow Print House, Lucknow, India 303 pp

Singh, J. and J. L. Faull (1988) Antagonism and biological control. In: **Biocontrol of Plant Diseases Vol. II** (Mukerji, K. G. y K. L. Garg eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida 168-175

Sivan, A., Y. Elad and I. Chet (1983) Application of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for damping-off in vegetables. **Phytoparasitica** 11: 3-8

Sivan, A., Y. Elad and I. Chet (1984) Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. **Phytopathology** 74:498-450

Sivan, A., O. Ucko and I. Chet (1987) Biocontrol of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. **Plant disease** 71:587-592

Stack, P. J., Ch. M. Kenerley and R. E. Pettit (1988) Application of biological control agents. In: **Biocontrol of Plant Diseases Vol. II** (Mukerji, K. G. y K. L. Garg eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida 43-54

Strashnow, Y., Y. Elad, A. Sivan and I. Chet (1985) Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. **Plant pathology** 34:146-151

Strange, N. R. (1993) Implications of parasite identity, epidemiology and disease measurement for control measures. In: **Plant disease control towards environmentally acceptable methods**. (Strange, N. R. ed.). Chapman & Hall. London U. K. 108-135

Turian, G. (1983) Concepts of fungal differentiation. In: **Fungal Differentiation** (Smith, J. E. ed.) Dekker, New York 1-18

Ulloa, M. y T. Hanlin (1978) **Atlas de Micología Básica**. Editorial Concepto. México, D. F. 158 pp

Upadhyay, S. R. and R. Bharat (1988) Biocontrol agents of plant pathogens: their use and practical constraints. In: **Handbook of Pest Management Vol. I** (Pimentel, D. ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida 15-30

Wainwright, M. (1992) **An Introduction to Fungal Biotechnology**. John Wiley&Sons. LTD, England 153-159

Webber, J. F. and J. N. Heger (1986) Comparison of interactions between *Ceratocystis ulmi* and Elm bark saprobes *In vitro* and *In vivo*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 86:83-93

Wells, D. H. (1988) *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: **Biocontrol of Plant Diseases Vol. II** (Mukerji, K. G. y K. L. Garg eds.) CRC Press. Boca Raton, Florida 72-79

ANEXO

Anexo 1 Cuadro general de resultados sin proceso estadístico.

| Orden | Antag | Patog | Ctp | Dds | Tdc | Pdi |
|-------|-------|-------|-----|-----|-----|------|
| 1 | 1 | 1 | 2.0 | 4.0 | 216 | 77.7 |
| 2 | 1 | 1 | 1.7 | 4.5 | 216 | 81.1 |
| 3 | 1 | 1 | 1.0 | 4.5 | 192 | 88.8 |
| 4 | 1 | 1 | 2.0 | 4.0 | 216 | 77.7 |
| 5 | 1 | 2 | 1.2 | 4.5 | 144 | 86.8 |
| 6 | 1 | 2 | 1.1 | 4.5 | 144 | 87.7 |
| 7 | 1 | 2 | 3.0 | 4.5 | 168 | 66.6 |
| 8 | 1 | 2 | 3.1 | 4.5 | 168 | 65.5 |
| 9 | 2 | 1 | 1.3 | 3.2 | 168 | 85.5 |
| 10 | 2 | 1 | 2.2 | 2.3 | 144 | 75.5 |
| 11 | 2 | 1 | 2.3 | 2.2 | 144 | 74.4 |
| 12 | 2 | 1 | 0.8 | 3.7 | 168 | 91.1 |
| 13 | 2 | 2 | 3.1 | 3.7 | 192 | 65.5 |
| 14 | 2 | 2 | 3.0 | 3.5 | 192 | 66.6 |
| 15 | 2 | 2 | 2.9 | 3.3 | 192 | 67.7 |
| 16 | 2 | 2 | 3.3 | 3.4 | 192 | 63.3 |
| 17 | 3 | 1 | 1.7 | 2.8 | 144 | 81.1 |
| 18 | 3 | 1 | 1.5 | 3.0 | 144 | 83.3 |
| 19 | 3 | 1 | 1.6 | 2.9 | 144 | 82.2 |
| 20 | 3 | 1 | 2.7 | 1.8 | 144 | 70.0 |
| 21 | 3 | 2 | 3.1 | 1.4 | 144 | 65.5 |
| 22 | 3 | 2 | 3.2 | 1.3 | 144 | 64.4 |
| 23 | 3 | 2 | 3.0 | 1.5 | 144 | 66.6 |
| 24 | 3 | 2 | 3.3 | 1.2 | 144 | 63.3 |

Antag = cepas antagonistas

1= Cepa Tx *Trichoderma* sp

2= Cepa TBp *Trichoderma harzianum*

3= Cepa Ti *Trichoderma fasciculatum*

Patog= Patógenos empleados

1= *Fusarium oxysporum*

2= *Rhizoctonia solani*

Parámetros evaluados:

ctp= crecimiento total del patógeno (cm)

dds= distancia de solapamiento (cm)

tdc= tiempo de cobertura (hrs)

pdi= porcentaje de inhibición

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Anexo 2 Análisis de varianza.

Variable crecimiento total del patógeno (antag/patog).

UNIQUE sumas de cuadrados todos los efectos procesados simultáneamente

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | g. l. | Cuadrado medio | F Cal. | Sig. de F |
|-----------------------|-------------------|-------|----------------|--------|-----------|
| Efectos principales | 8.214 | 3 | 2.738 | 7.119 | .002 |
| ANTAG | 1.703 | 2 | .852 | 2.215 | .138 |
| PATO | 6.510 | 1 | 6.510 | 16.928 | .001 |
| 2-vías de interacción | 1.163 | 2 | .582 | 1.512 | .247 |
| ANTAG - PATO | 1.163 | 2 | .582 | 1.512 | .247 |
| Tratamiento | 9.377 | 5 | 1.875 | 4.876 | .005 |
| Residuo | 6.922 | 18 | .385 | | |
| Total | 16.300 | 23 | .709 | | |

Variable distancia de solapamiento (antag/patog).

UNIQUE sumas de cuadrados todos los efectos procesados simultáneamente

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | g. l. | Cuadrado medio | F Cal. | Sig. de F |
|-----------------------|-------------------|-------|----------------|--------|-----------|
| Efectos principales | 22.909 | 3 | 7.636 | 47.645 | .000 |
| ANTAG | 22.803 | 2 | 11.401 | 71.134 | .000 |
| PATO | .107 | 1 | .107 | .666 | .425 |
| 2-vías de interacción | 4.051 | 2 | 2.025 | 12.637 | .000 |
| ANTAG - PATO | 4.051 | 2 | 2.025 | 12.637 | .000 |
| Tratamiento | 26.960 | 5 | 5.392 | 33.642 | .000 |
| Residuo | 2.885 | 18 | .160 | | |
| Total | 29.845 | 23 | 1.298 | | |

Variable tiempo de cobertura (antag/patog).

UNIQUE sumas de cuadrados todos los efectos procesados simultáneamente

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | g. l. | Cuadrado medio | F Cal. | Sig. de F |
|-----------------------|----------------------|-------|-------------------|-----------|--------------|
| Efectos principales | 6888.000 | 3 | 2296.000 | 26.091 | .000 |
| ANTAG | 6672.000 | 2 | 3336.000 | 37.909 | .000 |
| PATOG | 216.000 | 1 | 216.000 | 2.455 | .135 |
| 2-vías de interacción | 8208.000 | 2 | 4104.000 | 46.636 | .000 |
| ANTAG –PATOG | 8208.000 | 2 | 4104.000 | 46.636 | .000 |
| Tratamiento | 15096.000 | 5 | 3019.200 | 34.309 | .000 |
| Residuo | 1584.000 | 18 | 88.000 | | |
| Total | 16680.000 | 23 | 725.217 | | |

Variable porcentaje de inhibición (antag/patog).

UNIQUE sumas de cuadrados todos los efectos procesados simultáneamente

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | g. l. | Cuadrado medio | F Cal. | Sig. de F |
|-----------------------|----------------------|-------|-------------------|-----------|--------------|
| Efectos principales | 1014.041 | 3 | 338.014 | 7.092 | .002 |
| ANTAG | 210.157 | 2 | 105.079 | 2.205 | .139 |
| PATOG | 803.884 | 1 | 803.884 | 16.868 | .001 |
| 2-vías de interacción | 145.552 | 2 | 72.776 | 1.527 | .244 |
| ANTAG –PATOG | 145.552 | 2 | 72.776 | 1.527 | .244 |
| Tratamiento | 1159.594 | 5 | 231.919 | 4.866 | .005 |
| Residuo | 857.852 | 18 | 47.658 | | |
| Total | 2017.446 | 23 | 87.715 | | |

INDIVIDUAL

Variable CDP por Variable antag

| Fuente | g. l. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F Calc. | F Prob. |
|--------------|-------|----------------------|---------------------|------------|------------|
| Entre grupos | 2 | 1.7033 | .8517 | 1.2253 | .3138 |
| Individual | 21 | 14.5962 | .6951 | | |
| Total | 23 | 16.2996 | | | |

Variable CDP por Variable antag

Prueba de rango multiple: Tukey-HSD prueba con nivel de significancia al .050

La diferencia entre las medias es significativa si:

$$\text{Media (J)} - \text{Media (I)} \geq .5895 * \text{Range} * \text{SQRT} (1/N(I) + 1/N(J))$$

Con el siguiente valor por rango: 3.56

Dos grupos no son significativamente diferentes en el nivel .050

Bloques homogéneos (Las medias más altas y más bajas no son significativamente diferentes)

Bloque

| Grupo | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|-------|---------|---------|---------|
| Media | 1.8875 | 2.3625 | 2.5125 |

INDIVIDUAL

Variable DDS por Variable antag

| Fuente | g. l. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F Calc. | F Prob. |
|--------------|-------|----------------------|---------------------|------------|------------|
| Entre grupos | 2 | 22.8025 | 11.4012 | 33.9973 | .0000 |
| Individual | 21 | 7.0425 | .3354 | | |
| Total | 23 | 29.8450 | | | |

Variable DDS por Variable antag

Prueba de rango multiple: Tukey-HSD prueba con nivel de significancia al .050

La diferencia entre las medias es significativa sí:

$$\text{Media (J)} - \text{Media (I)} > = .4095 * \text{Range} * \text{SQRT} (1/N(I) + 1/N(J))$$

Con el siguiente valor por rango: 3.56

(*) Indica diferencias significativas

Bloque

| Medias | Antagonistas |
|--------|--------------|
| 1.9875 | Grupo 3 |
| 3.1625 | Grupo 2 * |
| 4.3750 | Grupo 1 ** |

INDIVIDUAL

Variable TDC por Variable antag

| Fuente | g. l. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F Calc. | F Prob. |
|--------------|-------|----------------------|---------------------|------------|------------|
| Entre grupos | 2 | 6272.0000 | 3336.0000 | 7.0000 | .0047 |
| Individual | 21 | 10008.0000 | 476.5714 | | |
| Total | 23 | 16680.0000 | | | |

Variable TDC por Variable antag

Prueba de rango multiple: Tukey-HSD prueba con nivel de significancia al .050

La diferencia entre las medias es significativa si:

$$\text{Media (J)} - \text{Media (I)} >= 15.4365 * \text{Range} * \text{SQRT} (1/N(I) + 1/N(J))$$

Con el siguiente valor por rango: 3.56

(*) Indica diferencias significativas

Bloque

| Medias | Antagonistas |
|----------|--------------|
| 144.0000 | . Grupo 3 |
| 174.0000 | Grupo 2 * |
| 183.0000 | Grupo 1 * |

INDIVIDUAL

Variable PDI por Variable antag

| Fuente | g. l. | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F Calc. | F Prob. |
|--------------|-------|----------------------|---------------------|------------|------------|
| Entre grupos | 2 | 210.1575 | 105.0787 | 1.2210 | .3150 |
| Individual | 21 | 1807.2887 | 86.0614 | | |
| Total | 23 | 2017.4462 | | | |

Variable PDI por Variable antag

Prueba de rango multiple: Tukey-HSD prueba con nivel de significancia al .050

La diferencia entre las medias es significativa sí:

$Media (J) - Media (I) \geq 6.5598 * Range * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$

Con el siguiente valor por rango: 3.56

Dos grupos no son significativamente diferentes en el nivel .050

Bloques homogéneos (Las medias más altas y más bajas no son significativamente diferentes)

Bloque

| Grupo | Grupo 3 | Grupo 2 | Grupo 1 |
|--------|---------|---------|---------|
| Medias | 72.0500 | 73.7000 | 78.9875 |