

**Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica
de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp.,
Alternaria sp. y *Phytophthora* sp.**

Gabriela Vanessa Jaramillo Campoverde

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2014

ZAMORANO
CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica
de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp.,
Alternaria sp. y *Phytophthora* sp.**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Gabriela Vanessa Jaramillo Campoverde

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2014

**Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica
de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp.,
Alternaria sp. y *Phytophthora* sp.**

Presentado por:

Gabriela Vanessa Jaramillo Campoverde

Aprobado:

Rogelio Trabanino, M. Sc.
Asesor Principal

Renán Pineda, Ph.D
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Abelino Pitty, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Paola Flores, Ing. Agr.
Asesora

Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonica de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp.

Gabriela Vanessa Jaramillo Campoverde

Resumen: El estudio se realizó en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. El objetivo fue evaluar el efecto antagonista de *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano y cepa Choluteca en los hongos patógenos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. Se utilizó el método de cultivo dual, que consistió en un enfrentamiento equitativo de los hongos antagonistas y patógenos en un plato Petri. Se establecieron 12 tratamientos que incluyeron un testigo de cada patógeno, con cuatro repeticiones por tratamiento y 48 unidades experimentales. Todas las cepas de *Trichoderma* antagonizaron a los patógenos estudiados. Al evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial, *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano no presentó diferencias significativas con los patógenos. Con *Trichoderma harzianum* cepa Choluteca hubo más porcentaje de inhibición del crecimiento radial en el patógeno *Alternaria* sp. *Trichoderma koningii* no presentó diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los patógenos *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. Al comparar el crecimiento radial al día 3 después de la siembra *Trichoderma harzianum* cepa Choluteca inhibió a *Alternaria* sp.; *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano y *Trichoderma koningii* no presentaron inhibición a ninguno de los patógenos. Al día 7 todas las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento radial de los patógenos. En las evaluaciones de micoparasitismo *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano y cepa Choluteca presentaron altos porcentajes de invasión a *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp., pero no invadieron a *Fusarium* sp. Las evaluaciones de *Trichoderma koningii* mostraron bajos porcentajes de invasión a los tres patógenos.

Palabras clave: Antagonismo, enfrentamiento equitativo, porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Abstract: The study was conducted in the Biological Control Laboratory of the Panamerican Agricultural School, El Zamorano, Honduras. The objectives of this study were to evaluate the antagonist effect of *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* Zamorano strain and Choluteca strain in *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. and *Phytophthora* sp. pathogens. We used the dual cultivation method that consists in a confrontation of the pathogen and the antagonist fungi. We established 12 treatments that included one control of pathogenic fungi, four replications and 48 experimental units. All *Trichoderma* strains antagonized pathogens. In the evaluation of Percent inhibition of radial growth (PIRG) of *Trichoderma harzianum* Zamorano strain there was not significant difference between pathogens. With *Trichoderma harzianum* Choluteca strain we observed the highest PIRG in *Alternaria* sp. and with *Trichoderma koningii* there wasn't significant difference with *Fusarium* sp. and *Phytophthora* sp. Comparing the radial growth of pathogens and *Trichoderma* strains with pathogens control at day 3 we observed that only *Trichoderma harzianum* Choluteca strain antagonized to *Alternaria* sp.; Zamorano strain and *Trichoderma koningii* don't antagonized the pathogens; At day 7 all *Trichoderma* strains antagonized the pathogens. In the mycoparasitism we observed *Trichoderma harzianum* Zamorano strain and Choluteca strain showed the highest invasion's percent in *Alternaria* sp. and *Phytophthora* sp., but both cannot invade to *Fusarium* sp. *Trichoderma koningii* showed the lowest invasion's percentage to the pathogens.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	6
4 CONCLUSIONES	13
5 RECOMENDACIONES.....	14
6 LITERATURA CITADA	15
7 ANEXOS.....	17

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros		Página
1.	Tratamientos para la evaluación de porcentaje de inhibición del crecimiento radial, comparación radial de crecimiento de los patógenos enfrentados a las cepas de <i>Trichoderma</i> con los testigos de los patógenos y la invasión de <i>Trichoderma</i> a los patógenos.....	3
2.	Escala para evaluar la capacidad antagonica	5
3.	Invasión de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano hacia los hongos patógenos al día 9 después de la siembra	11
4.	Invasión de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca hacia los hongos patógenos al día 9 después de la siembra.....	11
5.	Invasión de <i>Trichoderma koningii</i> hacia los hongos patógenos al día 9 después de la siembra	12
Figuras		Página
1.	Enfrentamiento del hongo patógeno y antagonista mediante el método del cultivo dual	4
2.	Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Al día 7 después de la siembra.....	6
3.	Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Al día 7 después de la siembra.....	7
4.	Efecto de <i>Trichoderma koningii</i> en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Al día 7 después de la siembra	7
5.	Comparación del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Con <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano frente a los testigos al día 3 después de la siembra.....	8
6.	Comparación del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Con <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano frente a los testigos al día 7 después de la siembra.....	8
7.	Comparación del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Con <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca frente a los testigos al día 3 después de la siembra.....	9
8.	Comparación del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Con <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca frente a los testigos al día 7 después de la siembra.....	9

9.	Comparación del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Con <i>Trichoderma koningii</i> frente a los testigos al día 3 después de la siembra	10
10.	Comparación del crecimiento radial de <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp. Con <i>Trichoderma koningii</i> frente a los testigos al día 7 después de la siembra	10
Anexos		Página
1.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial a los días 3 y 7 después de la siembra.....	17
2.	Datos del crecimiento radial desde el día 3 al día 7 después de la siembra.....	18
3.	Invasión de <i>Trichoderma</i> hacia los patógenos.....	19
1.		

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo y follaje pueden destruir los cultivos y los costos para el control tienden a ser elevados. El uso excesivo de químicos genera el riesgo de que residuos tóxicos se acumulen en el ambiente o en el cultivo comprometiendo la salud de las personas. Además, si los químicos no se utilizan adecuadamente los patógenos pueden generar resistencia, se puede romper el equilibrio biológico y destruir los insectos benéficos. Debido a esta problemática surge la necesidad de evaluar alternativas ecológicas como la utilización de agentes de control biológico.

El control biológico es una alternativa para la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o al manipular al huésped, antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Jacas *et al.* 2005). El control biológico incluye el uso de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones directas de tipo antagonista con el patógeno como competencia por nutrientes o lugares de colonización, fenómenos de antibiosis, interferencia con sistemas de comunicación molecular e hiperparasitismo o bien indirectas como estimulación de defensas en el huésped (Pallás *et al.* 2007).

Existen hongos antagonistas utilizados para control biológico de hongos que causan enfermedades. Las especies de *Trichoderma* son los organismos que se aíslan con mayor frecuencia de los suelos agrícolas. Además, se han estudiado diversas formas de aplicar *Trichoderma* al suelo y a la superficie de las hojas para aumentar sus poblaciones e incrementar su control, debido a la naturaleza saprofita y a la versatilidad nutricional de este antagonista, que lo capacita para crecer sobre los mismos sustratos utilizados por los patógenos. La habilidad para desarrollarse sobre amplios rangos de condiciones extremas de pH es un importante componente del complejo conjunto de características que *Trichoderma*, mejor adaptado a suelos ácidos, encuentra durante esta interacción con otros organismos (Benítez *et al.* 2004). Se ha observado que cepas de *Trichoderma* son capaces de inducir resistencia sistémica en las plantas, ya que aplicadas en la rizósfera, producen protección contra patógenos del suelo o foliares. Esta resistencia viene acompañada en muchos casos de un aumento de actividades peroxidasa y quitinasa en zonas distantes de la raíz. (Yedidia *et al.* 1999)

Los hongos presentan varios modos de acción para reducir el riesgo de resistencia de parte de los hongos patógenos, el control es más eficiente si se combinan antagonistas con diferentes modos de acción (Fernández *et al.* 2009). *Trichoderma* tiene varios modos de acción: antibiosis, competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, lisis enzimática e inducción de resistencia. Además, el hongo establece simbiosis avirulenta con la planta, actuando como antagonista de hongos y bacterias fitopatógenas, invertebrados (insectos y nemátodos) e incluso malas hierbas. (Sarro *et al.* 2008)

Los modos de acción dependen de la especie de *Trichoderma*; las especies *harzianum* y *konigii* actúan como biocontroladores y ayudan a colonizar las raíces debido que produce micoparasitismo, donde envuelven al hongo y penetran sus células causando alteración y degradación de la pared celular. Compiten muy bien por nutrientes y espacio, colonizan las raíces de las plantas rápidamente no dejando nicho ecológico a otros hongos patógenos que intenten infectar la raíz. Secretan enzimas como celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped, facilitando la inserción de estructuras especializadas y del micelio del antagonista, que aprovechan los nutrientes del hongo huésped. También originan antibiosis donde el antagonista produce toxinas que actúan en bajas concentraciones. (Infante *et al.* 2009).

El objetivo de este estudio fue evaluar tres cepas de *Trichoderma* para el control de los hongos fitoparasitos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó de julio a septiembre del 2014 en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, el Zamorano, Honduras.

Tratamientos. Se utilizaron tres cepas de *Trichoderma*: *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano y cepa Choluteca enfrentados a tres patógenos: *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. (Cuadro 1). Las cepas de los hongos se obtuvieron del laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se incluyó un testigo por cada tratamiento y se evaluaron cuatro repeticiones, con un total de 48 unidades experimentales.

Cuadro 1. Tratamientos para la evaluación de porcentaje de inhibición de crecimiento radial, comparación radial de crecimiento de los patógenos enfrentados a las cepas de *Trichoderma* con los testigos de los patógenos y la invasión de *Trichoderma* a los patógenos.

Hongo Antagonista	Hongo patógeno
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano	<i>Phytophthora</i> sp.
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Zamorano	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca	<i>Phytophthora</i> sp.
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Trichoderma harzianum</i> cepa Choluteca	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Phytophthora</i> sp.
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Phytophthora</i> sp.
	<i>Fusarium</i> sp.
	<i>Alternaria</i> sp.

Metodología. Se utilizó el método del cultivo dual que consiste en un enfrentamiento equitativo del hongo patógeno y el hongo antagonista. En un plato de Petri de 90 × 15 mm con medio de cultivo Potato Dextrosa Agar (PDA) en un extremo a 1.5 cm desde la orilla se colocó un disco de 5 mm de diámetro del micelio del hongo patógeno y en el otro extremo un disco de 5 mm del micelio del antagonista, la distancia entre hongos fue de 6 cm (Reyes *et al.* 2007).

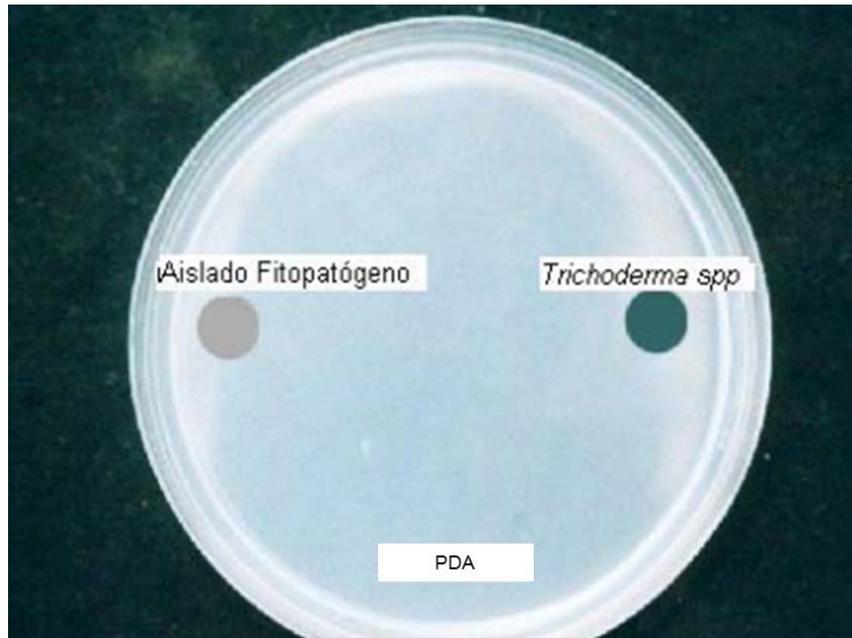


Figura 1. Enfrentamiento del hongo patógeno y antagonista mediante el método del cultivo dual.

Evaluaciones. Para evaluar la capacidad antagonista de las cepas de *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano y cepa Choloteca se valoraron los siguientes parámetros: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), comparación del crecimiento radial de los patógenos enfrentados a las cepas de *Trichoderma* con los testigos de los patógenos y la invasión de las cepas de *Trichoderma* a los patógenos.

a) **Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). Para la obtención del PICR se utilizó la siguiente fórmula (Ezziyyani *et al.* 2005):**

$$PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100 \quad [1]$$

Donde:

R1= es el radio del patógeno testigo y

R2= es el radio del patógeno.

b) **Comparación del crecimiento de los patógenos enfrentados a las cepas de *Trichoderma* con los testigos de los patógenos.**

Se midió el radio de crecimiento de los hongos patógenos y antagonistas a los días 3 y 7 después de la siembra.

c) **Invasión de las cepas de *Trichoderma* a los patógenos**

Se midió la invasión de la superficie de las cepas de *Trichoderma* sobre cada uno de los hongos fitopatógenos, luego de la invasión se calculó en porcentaje de invasión y finalmente los porcentajes se asociaron a la escala descrita por Ezziyyani *et al.* 2005 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala de capacidad antagónica.

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión $\frac{3}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Fuente: Ezziyyani *et al.* 2005

Diseño Experimental y análisis estadístico. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se realizaron 12 tratamientos con cuatro repeticiones y 48 unidades experimentales. Se utilizó un análisis de varianza ANDEVA y una separación de medias con el método DUNCAN con un nivel de significancia ($P \leq 0.05$). Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4[®]) (SAS 2009).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Porcentaje de inhibición de crecimiento radial. Se observó que *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano no presentó diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. (Figura 2). Con la cepa Choluteca hubo más inhibición del crecimiento de *Alternaria* sp. (73%) ($P \leq 0.05$) en comparación con *Phytophthora* sp. y *Fusarium* sp. (54 y 40%, respectivamente) (Figura 3). Con *Trichoderma koningii* no hubo diferencias significativas frente a *Fusarium* sp. ni *Phytophthora* sp. (56 y 42%, respectivamente), pero *Trichoderma koningii* tuvo un porcentaje de inhibición de crecimiento radial menor sobre el patógeno *Alternaria* sp. (36%) (Figura 4).

Estudios realizados por Suárez *et al.* (2008) demostraron que el antagonismo de *Trichoderma harzianum rifai* hacia *Fusarium solani* al día 10 presentó una inhibición mayor al 50%. Páez y Sanabria (2007) evaluaron *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* y obtuvieron un PICR entre 13-56%. Evaluaciones por Camarena (2012) al estudiar el comportamiento *Trichoderma harzianum* frente a *Alternaria alternata* demostró un 62% de PICR. Ezziyyani *et al.* (2005) estudiaron *Trichoderma harzianum* frente a *Phytophthora infestans* obteniendo porcentajes mayores al 60% del porcentaje de inhibición de crecimiento radial. Lo cual nos indica que las cepas de *Trichoderma* que utiliza el laboratorio de control biológico tienen un PICR muy similar a los reportes de otras evaluaciones para el control de los patógenos evaluados en este estudio.

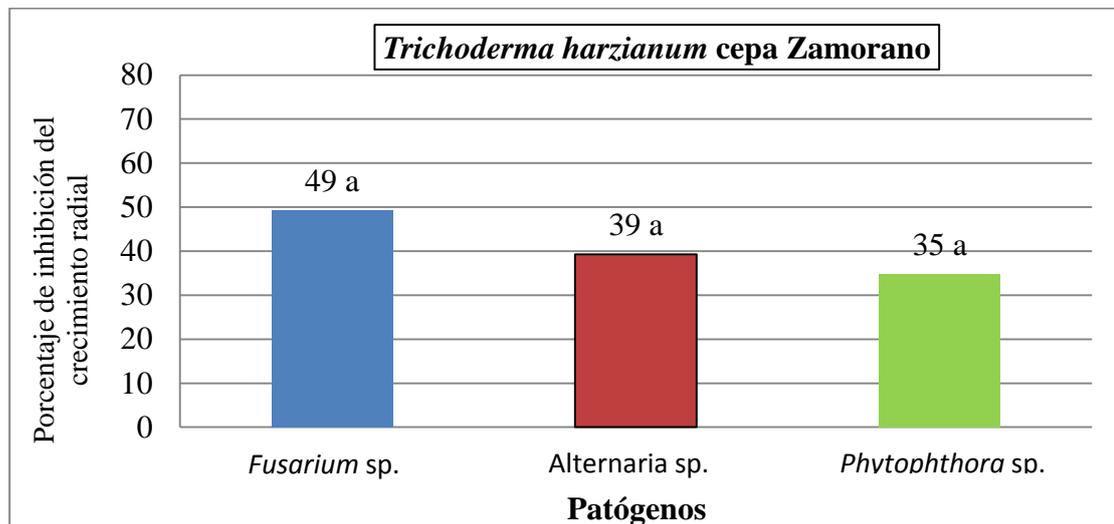


Figura 2. Efecto de *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano en el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. al día 7 después de la siembra.

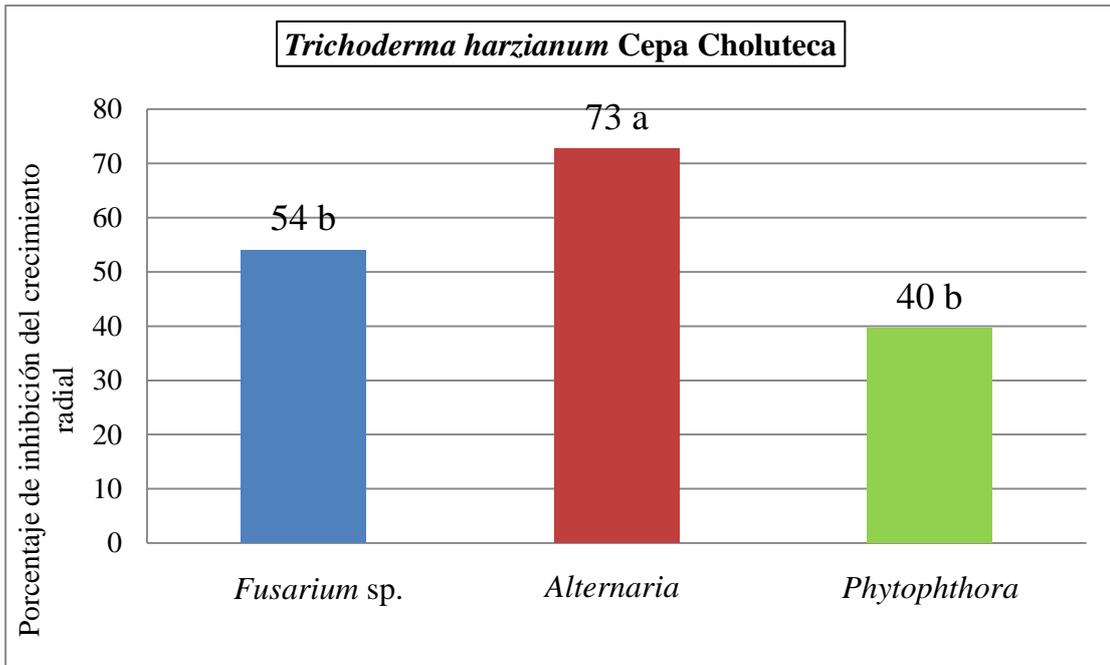


Figura 3. Efecto de *Trichoderma harzianum* cepa Cholteca en el porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.* y *Phytophthora sp.* al día 7 después de la siembra.

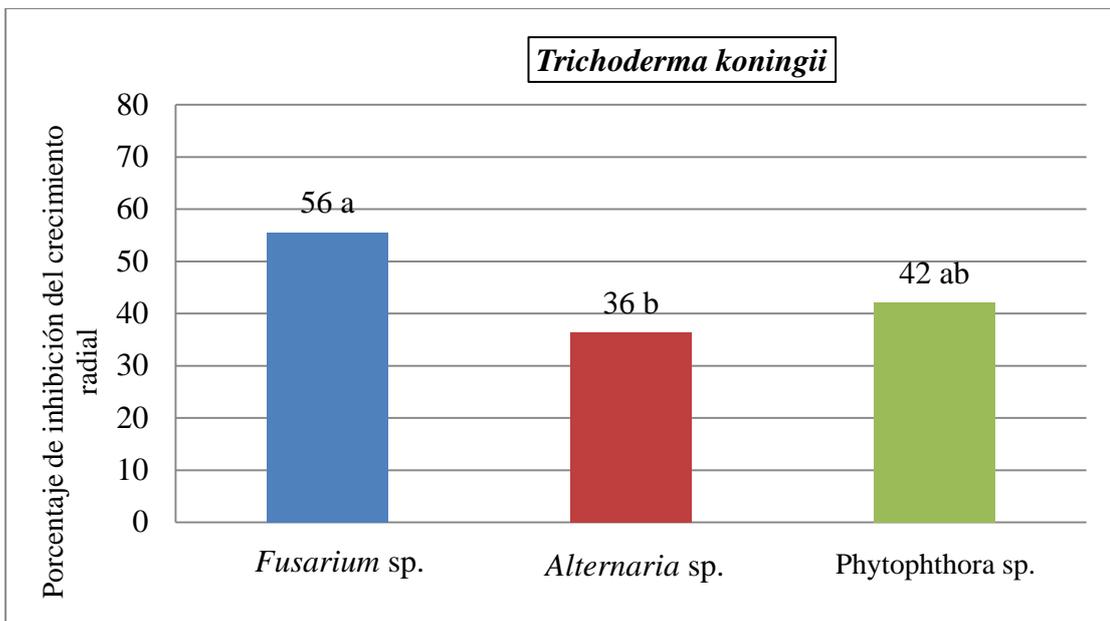


Figura 4. Efecto de *Trichoderma koningii* en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.* y *Phytophthora sp.* al día 7 después de la siembra.

Comparación de los hongos patógenos enfrentados a *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano con los patógenos testigo a los días 3 y 7 después de la siembra. *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano no inhibió a ninguno de los tres patógenos, en la figura 5 se puede observar que no hubo diferencias significativas de los patógenos enfrentados al antagonista con los patógenos testigos. Al día 3 el antagonista todavía no estaba en contacto con los hongos patógenos por lo cual era difícil ver algún tipo de reducción en el crecimiento de dichos hongos patógenos (Figura 5) Al día 7 la cepa Zamorano inhibió el crecimiento de todos los patógenos (Figura 6).

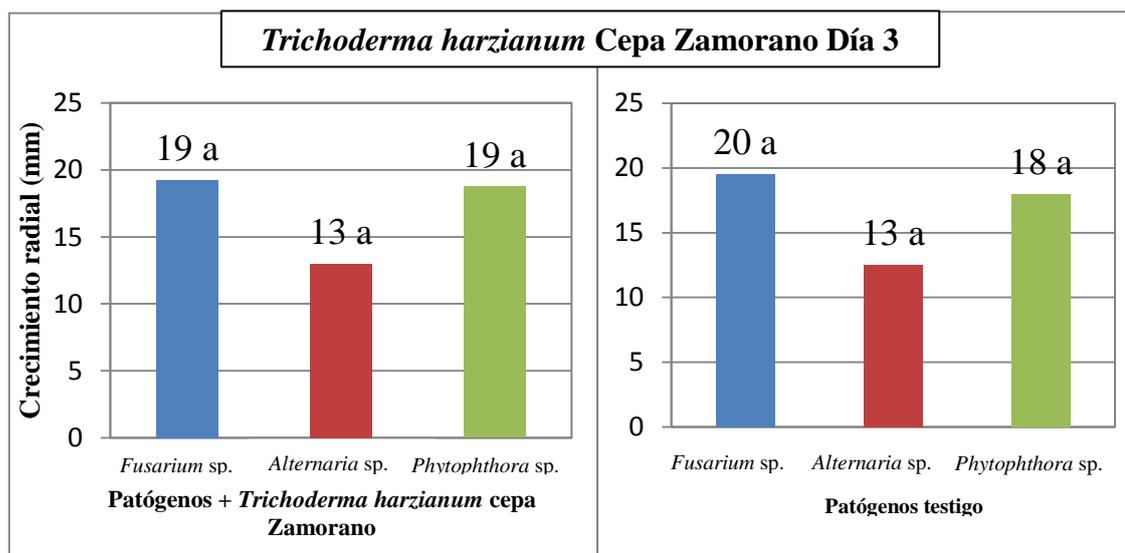


Figura 5. Comparación del crecimiento radial de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. con *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano frente a los testigos al día 3.

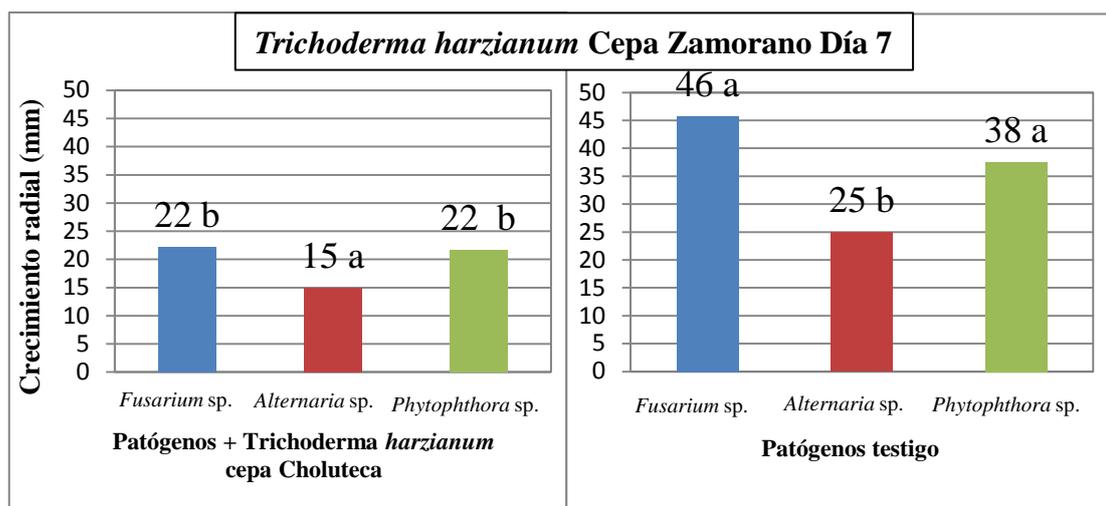


Figura 6. Comparación del crecimiento radial de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. con *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano frente a los testigos al día 7 después de la siembra.

Comparación de los hongos patógenos enfrentados a *Trichoderma harzianum* cepa Cholteca con los patógenos testigo a los días 3 y 7 después de la siembra. *Trichoderma harzianum* cepa Cholteca inhibió el crecimiento radial de *Alternaria* sp., pero no presentó diferencias significativas con *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. (Figura 7). Al día 7 la cepa Cholteca inhibió el crecimiento de todos los patógenos. (Figura 8).

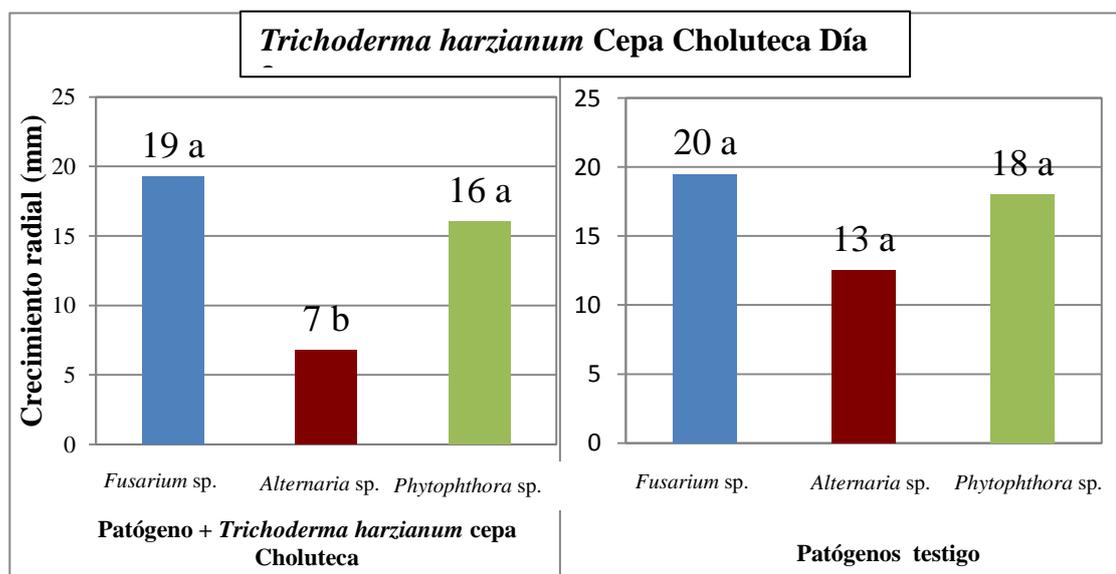


Figura 7. Comparación del crecimiento radial de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. con *Trichoderma harzianum* cepa Cholteca frente a los testigos al día 3 después de la siembra.

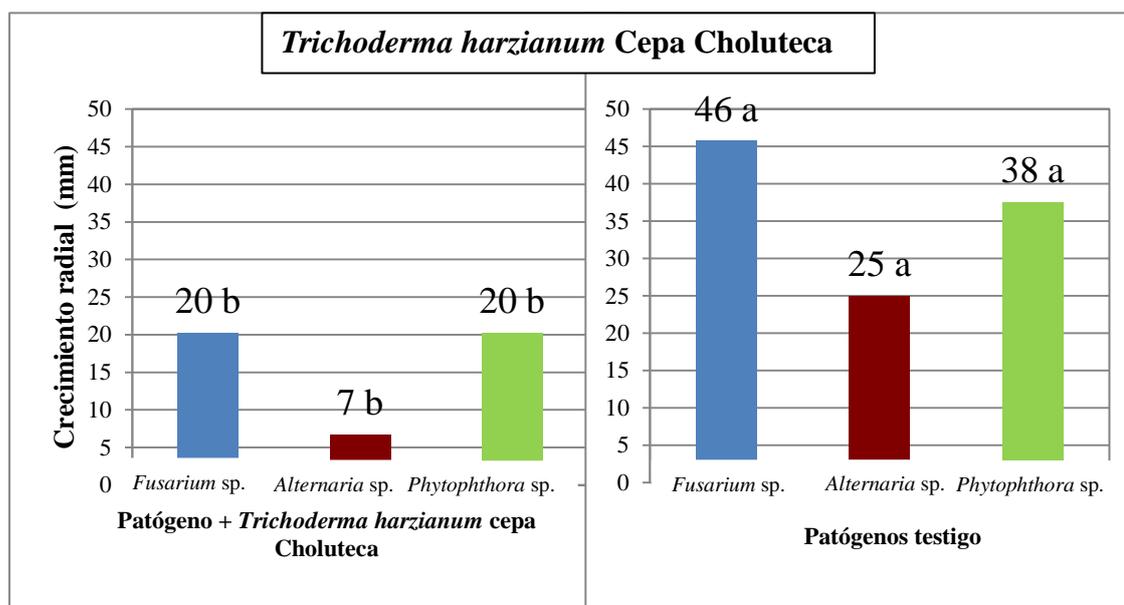


Figura 8. Comparación del crecimiento radial de *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. con *Trichoderma harzianum* cepa Cholteca frente a los testigos al día 7 después de la siembra.

Comparación de los hongos patógenos enfrentados a *Trichoderma koningii* con los patógenos testigo los días 3 y 7 después de la siembra. Al día 3 ningún patógeno presentó diferencias significativas con sus testigos, es decir que *Trichoderma koningii* no inhibió a los patógenos (Gráfica 8). Al día 7 todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con sus testigos, demostrando que *Trichoderma koningii* inhibió el crecimiento de los tres patógenos y presentó un mejor antagonismo hacia *Alternaria* sp. (Gráfica 9).

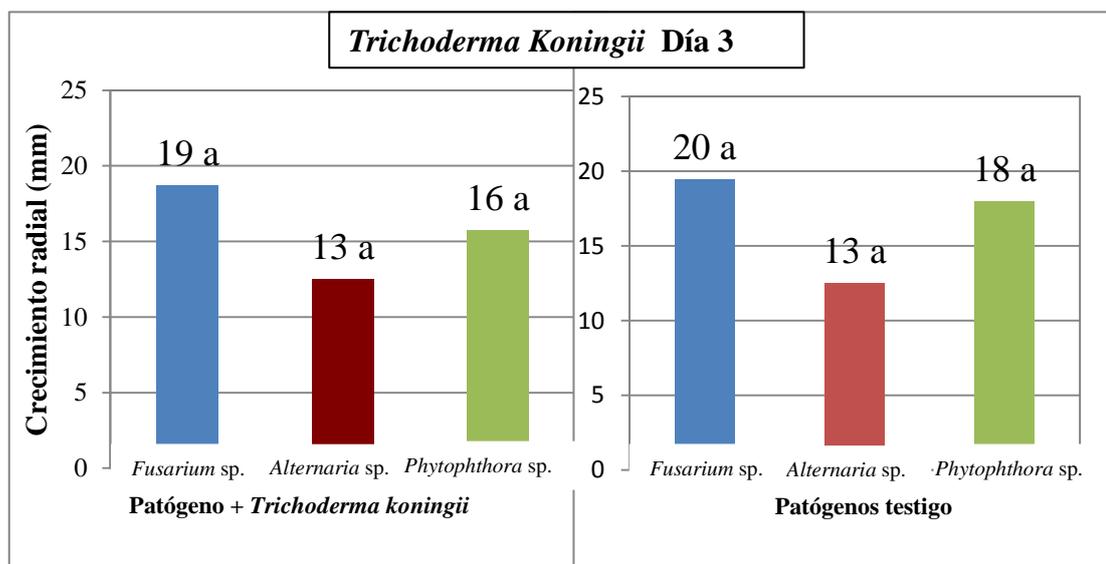


Figura 9. Comparación del crecimiento radial de *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. con *Trichoderma koningii* frente a los testigos al día 3 después de la siembra.

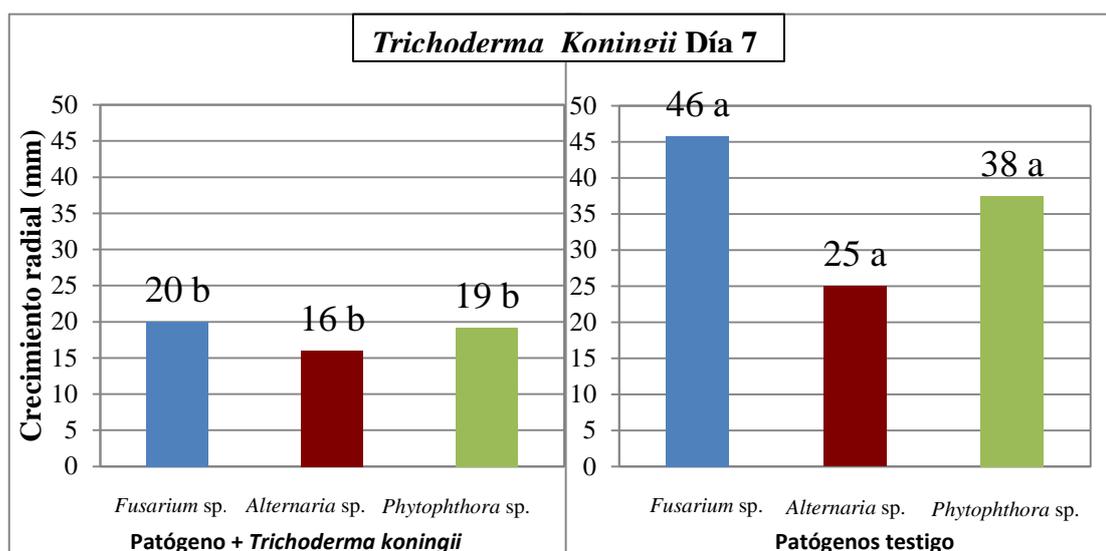


Figura 10. Comparación del crecimiento radial de *Fusarium* sp. *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. con *Trichoderma koningii* frente a los testigos al día 7 después de la siembra.

Invasión de las cepas de *Trichoderma* a los patógenos al día 9. *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano invadió más a *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp., con porcentajes de 89 y 73 %, respectivamente (cuadro 3); el porcentaje de invasión de *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano a *Fusarium* sp. fue nulo, este comportamiento probablemente ocurrió debido a que la quitina de la pared celular de *Fusarium* sp. está cubierta por una capa proteica que previene su degradación por quitinasas y β -1-3-glucanasas que produce *Trichoderma harzianum* (Fernández *et al.* 2009). *Trichoderma harzianum* cepa Choluteca presentó mayores porcentaje de invasión para *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. (94% y 95%, respectivamente) (Cuadro 4). *Trichoderma koningii* presentó los menores porcentajes de invasión a los tres patógenos (Cuadro 5).

Trichoderma harzianum cepa Choluteca invadió en un 69% a *Fusarium* sp. y según la escala de Ezziyyani *et al.* (2005) equivale a grado 2, *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano y cepa Choluteca con porcentajes de invasión de 89% y 94%, respectivamente, llegaron a grado 3 con *Alternaria* sp.; mientras que *Trichoderma koningii* (14%) llegó a grado 0. *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano (73%) con *Phytophthora* sp. llegó a grado 2 y *Trichoderma harzianum* cepa Choluteca (95%) llegó a grado 3.

Cuadro 3. Invasión de *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano hacia los hongos patógenos al día 9 después de la siembra.

Patógeno	Diámetro patógeno (mm)	Invasión Antagonista (mm)	Invasión (%)	Grado
<i>Fusarium</i> sp.	38	0	0 b ^ψ	0
<i>Alternaria</i> sp.	28	23	89 a	3
<i>Phytophthora</i> sp.	34	25	73 a	2

^ψMedias con letras comunes en la misma columna no difieran significativamente según la separación de medias de la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Cuadro 4. Invasión de *Trichoderma harzianum* cepa Choluteca hacia los hongos patógenos al día 9 después de la siembra.

Patógeno	Diámetro patógeno (mm)	Invasión Antagonista (mm)	Invasión (%)	Grado
<i>Fusarium</i> sp.	33	23	69 b ^ψ	2
<i>Alternaria</i> sp.	12	11	94 a	3
<i>Phytophthora</i> sp.	33	31	95 a	3

^ψMedias con letras comunes en la misma columna no difieran significativamente según la separación de medias de la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Invasión de *Trichoderma koningii* hacia los hongos patógenos al día 9 después de la siembra.

Patógeno	Diámetro patógeno (mm)	Invasión Antagonista (mm)	Invasión (%)	Grado
<i>Fusarium</i> sp.	33	0	0 b [‡]	0
<i>Alternaria</i> sp.	24	3	14 a	0
<i>Phytophthora</i> sp.	32	1	4 b	0

[‡]Medias con letras comunes en la misma columna no difieren significativamente según la separación de medias de la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

Trichoderma harzianum cepa Choluteca inhibió más a *Alternaria* sp. (73%), no hubo diferencias significativas con los demás tratamientos.

En la evaluación de inhibición del crecimiento en el día 3 *Trichoderma harzianum* cepa Choluteca inhibió a *Alternaria* sp., lo cual no ocurrió con las demás cepas evaluadas. Al día 7 todas las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento radial de los patógenos. Siendo *Alternaria* sp. el patógeno más inhibido por las cepas de *Trichoderma*, mientras *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp. fueron inhibidos en el crecimiento radial en igual porcentaje.

Trichoderma harzianum cepa Zamorano y cepa Choluteca tuvieron una invasión igual a *Alternaria* sp. y *Phytophthora* sp. *Trichoderma koningii* inhibió menos a los tres patógenos y según la escala de Ezziyyani tuvo un grado 0 de invasión en los tres patógenos evaluados. *Trichoderma harzianum* cepa Zamorano llegó a grado 0 en la invasión a *Fusarium* sp.

5 RECOMENDACIONES

Realizar la investigación in vivo aplicando las cepas de *Trichoderma* sp. a plantas que estén infestadas con *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp.

Evaluar las tres cepas de *Trichoderma* en un mismo plato Petri enfrentadas con *Phytophthora* sp, *Fusarium* sp. y *Alternaria* sp. individualmente para determinar cuál cepa antagoniza mejor a cada patógeno.

Repetir la evaluación para *Alternaria* sp. debido a que los datos del crecimiento del patógeno obtenidos en el experimento fueron muy bajos.

6 LITERATURA CITADA

Benítez, T., Rincón, A., Limón, M. y Codón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* (en línea) Consultado del 5 de julio del 2014. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/im/v7n4/Benitez.pdf>.

Camarena, J. 2012. Efecto de la actividad metabólica de cepas de hongos antagonistas sobre *Alternaria alternata* (fr.) causante de la mancha parda en cítricos. (en línea) Universidad Nacional Mayor San Marcos. Consultado el 5 de septiembre del 2014. Disponible en <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1418>.

Ezziyyani, M., Requena, M., Pérez, C., y Candela, M. 2005. Efecto del sustrato y la temperatura en el control biológico de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) (en línea). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo. Consultado el 7 de septiembre del 2014. Disponible en <https://www.um.es/analesdebiologia/números/27/PDF/13-EFECTO%20DEL%20SUSTRATO.pdf>.

Fernández, R., Suárez, C. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai SOBRE *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*passiflora edulis* sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana (en línea). Facultad Nacional de Agronomía Medellín, Colombia. Consultado el 10 de septiembre del 2013. Disponible en <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/rt/printerFriendly/24872/36678>.

Jacas, J., Caballero, P. y Avilla, J. 2005. El control biológico de las plagas y enfermedades. (en línea) Universitat Jaume I. D.L. Consultado el 20 de julio del 2014. Disponible en http://books.google.hn/books?id=4hZ0loEeCPUC&pg=PA116&lpg=PA116&dq=control+biol%C3%B3gico+reducci%C3%B3n+de+la+densidad+del+in%C3%B3culo+baker&source=bl&ots=KInDPs7TLA&sig=J31eShFM6P_Q4RmbKT4E5691U&hl=es-419&sa=X&ei=IVBaVP6lHMGcNuGogpAP&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=control%20biol%C3%B3gico%20reducci%C3%B3n%20de%20la%20densidad%20del%20in%C3%B3culo%20baker&f=false

Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos (en línea). Departamento de Fitopatología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). San José de las Laja, La Habana, Cuba. Consultado el 24 de septiembre del 2014. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>

Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez, P. y Marcos, José F. 2007. Herramientas biotecnológicas en fitopatología. (en línea). Madrid, España. Consultado el 12 de septiembre del 2014. Disponible en http://books.google.hn/books?id=XWcJAQAAQB AJ&pg=PA1&dq=Herramientas+biotecnol%C3%B3gicas+en+fitopatolog%C3%ADa+pallas&hl=es-19&sa=X&ei=hF5aVIZOLcWkNo_Kg9gN&ved=0CBsQ6wEwAA#v=onepage&q=Herramientas%20biotecnol%C3%B3gicas%20en%20fitopatolog%C3%ADa%20pallas&f=false.

Páez, M. y Sanabria A. 2007. Evaluación de la capacidad antagonica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici. Ministerio del Ambiente, Centro Nacional de Conservación de los Recursos Genéticos. Apartado 4661, Maracay 2101-A 2 Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. p. 7.

Reyes, R., Rodríguez, G., Pupo, Z., Alarcón, P. y Limonta, C. 2007. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc.) en el cultivo de arroz (*Oriza sativa*). Instituto de investigaciones de sanidad vegetal. La Habana. p. 5

Sarro, Á., Lara, J. y Fernández, C. 2008. Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEEP TL0601 frente a *Fusarium oxysporum* f.sp.lycopersici. Futureco Bioscience sl, Departamento de I+D. Barcelona, España.

SAS. 2009. SAS® User's Guide (Release 9.4). SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Suárez, C., Fernández, R., Valero, O., Gámez, R. y Páez, A. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez de maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. p. 9

Yedidia, I., Benhamou, N. y Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 65:1061-70.

7. ANEXOS

Anexo 1 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial a los días 3 y 7 después de la siembra.

		PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL				
		03-sep	04-sep	05-sep	06-sep	07-sep
TRT 1		PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL				
	1.1	0.00	16.00	21.43	26.67	28.13
	1.2	9.52	41.18	48.72	53.33	58.49
	1.3	-5.26	27.59	38.24	53.19	52.00
	1.4	0.00	23.08	37.50	50.00	58.33
TRT 2						
	2.1	-16.67	0	11.76	25.00	34.78
	2.2	-7.69	6.25	11.76	25.00	31.82
	2.3	0	0	19.05	32.00	37.04
	2.4	7.69	27.78	38.10	48.00	53.57
TRT 3						
	3.1	-11.76	8.70	22.22	36.36	43.59
	3.2	10.00	23.08	33.33	47.37	51.22
	3.3	0.0	-10.00	0.00	4.35	8.33
	3.4	-20.00	9.09	12.00	18.52	36.11
TRT 4						
	4.1	5.00	20.00	28.57	33.33	37.50
	4.2	14.29	44.12	48.72	55.56	62.26
	4.3	-5.26	31.03	41.18	57.45	60.00
	4.4	-11.11	23.08	37.50	47.50	56.25
TRT 5						
	5.1	66.67	73.33	76.47	80.00	82.61
	5.2	30.77	43.75	47.06	55.00	59.09
	5.3	25.00	47.06	57.14	64.00	66.67
	5.4	61.54	72.22	76.19	80.00	82.14
TRT 6						
	6.1	-11.76	13.04	25.93	39.39	48.72
	6.2	35.00	26.92	36.67	47.37	51.22
	6.3	35.00	5.00	9.09	13.04	16.67
	6.4	-26.67	13.64	24.00	22.22	41.67
TRT 7						
	7.1	25.00	36.00	42.86	46.67	50.00
	7.2	9.52	41.18	48.72	53.33	60.38
	7.3	-5.26	27.59	38.24	55.32	58.00
	7.4	-16.67	15.38	31.25	45.00	54.17
TRT 8						
	8.1	-8.33	-6.67	5.88	20.00	30.43
	8.2	15.38	25.00	29.41	40.00	45.45
	8.3	-8.33	17.65	33.33	40.00	44.44
	8.4	0.00	-16.67	0.00	16.00	25.00
TRT 9						
	9.1	23.53	34.78	44.44	51.52	58.97
	9.2	5.00	19.23	30.00	44.74	48.78
	9.3	30.00	25.00	31.82	13.04	16.67
	9.4	-13.33	18.18	20.00	25.93	44.44

Anexo 2. Datos del crecimiento radial desde el día 3 al día 7 después de la siembra

CRECIMIENTO RADIAL DÍA 3 AL DIA 7										
TRT 1	ZAMORANO	FUSARIUM								
1.1	3	2	3.2	2.1	3.2	2.2	3.2	2.2	3.4	2.3
1.2	3.4	1.9	3	2	3.3	2	3.6	2.1	3.9	2.2
1.3	3.3	2	3.2	2.1	3.3	2.1	3.4	2.2	3.7	2.4
1.4	3.7	1.8	3.5	2	3.7	2	4	2	4	2
TRT 2	ZAMORANO	ALTERNARIA								
2.1	3.9	1.4	4.5	1.5	4.5	1.5	4.5	1.5	4.6	1.5
2.2	4	1.4	4.5	1.5	4.5	1.5	4.5	1.5	4.6	1.5
2.3	3.9	1.2	4.1	1.7	4.1	1.7	4.5	1.7	4.5	1.7
2.4	3.9	1.2	4.2	1.3	4.5	1.3	4.5	1.3	4.5	1.3
TRT 3	ZAMORANO	PHYTOPHTH	ZAMORANO	PHYTOPHTH	ZAMORANO	PHYTOPHTH	ZAMORANO	PHYTOPHTH	ZAMORANO	PHYTOPHTHORA
3.1	4	1.9	4.1	2.1	4.1	2.1	4.1	2.1	4.1	2.2
3.2	4	1.8	4.3	2	4.3	2	4.3	2	4.3	2
3.3	3.8	2	3.9	2.2	4.2	2.2	4.2	2.2	4.2	2.2
3.4	3.2	1.8	3.1	2	3.7	2.2	3.9	2.2	4	2.3
TRT 4	CHOLUTECA	FUSARIUM								
4.1	4	1.9	4	2	4	2	4	2	4	2
4.2	4.1	1.8	4.1	1.9	4.1	2	4.1	2	4.1	2
4.3	3.8	2	3.8	2	4	2	4	2	4	2
4.4	3.9	2	3.9	2	4	2	4	2.1	4	2.1
TRT 5	CHOLUTECA	ALTERNARIA								
5.1	2.5	0.4	2.5	0.4	2.5	0.4	2.5	0.4	3	0.4
5.2	3.5	0.9	3.5	0.9	3.6	0.9	4	0.9	4	0.9
5.3	2.6	0.9	2.8	0.9	2.8	0.9	2.8	0.9	3	0.9
5.4	3.3	0.5	3.4	0.5	3.4	0.5	3.4	0.5	3.4	0.5
TRT 6	CHOLUTECA	PHYTOPHTH	CHOLUTECA	PHYTOPHTH	CHOLUTECA	PHYTOPHTH	CHOLUTECA	PHYTOPHTH	CHOLUTECA	PHYTOPHTHORA
6.1	3.9	1.9	3.9	2	4	2	4	2	4.4	2
6.2	4	1.3	4	1.9	4	1.9	4.1	2	4.5	2
6.3	4	1.3	4	1.9	4	2	4	2	4.1	2
6.4	4.2	1.9	4.3	1.9	4.3	1.9	4.3	2.1	4.4	2.1
TRT 7	KONINGII	FUSARIUM								
7.1	2.5	1.5	2.8	1.6	2.8	1.6	2.8	1.6	4.6	1.6
7.2	3.4	1.9	3.6	2	3.7	2	3.8	2.1	4.9	2.1
7.3	2.3	2	2.9	2.1	2.9	2.1	4.4	2.1	4.5	2.1
7.4	3.2	2.1	3.9	2.2	3.9	2.2	3.9	2.2	3.9	2.2
TRT 8	KONINGII	ALTERNARIA								
8.1	4	1.3	4.5	1.6	4.5	1.6	4.6	1.6	4.7	1.6
8.2	2.4	1.1	2.5	1.2	5	1.2	5.3	1.2	5.3	1.2
8.3	2.4	1.3	3.3	1.4	3.3	1.4	4.8	1.5	4.8	1.5
8.4	2.5	1.3	3.8	2.1	4	2.1	4.1	2.1	4.2	2.1
TRT 9	KONINGII	PHYTOPHTH	KONINGII	PHYTOPHTH	KONINGII	PHYTOPHTH	KONINGII	PHYTOPHTH	KONINGII	PHYTOPHTHORA
9.1	1.5	1.3	1.8	1.5	4.7	1.5	4.7	1.6	4.8	1.6
9.2	2.6	1.9	3.1	2.1	3.2	2.1	3.3	2.1	4.5	2.1
9.3	1.5	1.4	1.5	1.5	1.5	1.5	1.7	2	1.8	2
9.4	2.5	1.7	3.3	1.8	4	2	4.1	2	4.2	2
TESTIGOS		FUSARIUM								
1.1		2		2.5		2.8		3		3.2
1.2		2.1		3.4		3.9		4.5		5.3
1.3		1.9		2.9		3.4		4.7		5
1.4		1.8		2.6		3.2		4		4.8
TESTIGOS		ALTERNARIA								
1.1		1.2		1.5		1.7		2		2.3
1.2		1.3		1.6		1.7		2		2.2
1.3		1.2		1.7		2.1		2.5		2.7
1.4		1.3		1.8		2.1		2.5		2.8
TESTIGOS		PHYTOPHTHORA								
1.1		1.7		2.3		2.7		3.3		3.9
1.2		2		2.6		3		3.8		4.1
1.3		2		2		2.2		2.3		2.4
1.4		1.5		2.2		2.5		2.7		3.6

Anexo 3. Invasión de *Trichoderma spp.* hacia los patógenos.

TRATAMIENTO	REP	CRECIMIENTO PATÓGENO	INVASIÓN AL PATÓGENO	PORCENTAJE
zamofusa	1	3.8	0.0	0.0
zamofusa	2	3.8	0.0	0.0
zamofusa	3	3.9	0.0	0.0
zamofusa	4	3.5	0.0	0.0
zamoalte	1	2.4	3.0	93.8
zamoalte	2	2.3	2.8	93.3
zamoalte	3	2.7	3.2	88.9
zamoalte	4	2.0	2.3	78.0
zamophyt	1	3.5	1.8	53.0
zamophyt	2	3.2	1.9	60.0
zamophyt	3	3.5	3.0	87.0
zamophyt	4	3.6	3.3	91.0
cholufusa	1	3.3	2.7	83.0
cholufusa	2	3.2	1.8	58.0
cholufusa	3	3.2	2.0	63.0
cholufusa	4	3.5	2.4	71.0
cholualte	1	0.8	0.7	92.0
cholualte	2	1.5	1.5	97.0
cholualte	3	1.5	1.4	92.0
cholualte	4	1.1	1.0	93.0
cholphyt	1	3.5	3.2	93.0
cholphyt	2	3.2	2.9	92.0
cholphyt	3	3.2	3.0	95.0
cholphyt	4	3.5	3.4	98.0
konifusa	1	2.6	0.0	0.0
konifusa	2	3.5	0.0	0.0
konifusa	3	3.5	0.0	0.0
konifusa	4	3.6	0.0	0.0
konialte	1	1.8	0.3	16.7
konialte	2	2.0	0.2	10.3
konialte	3	2.4	0.5	20.8
konialte	4	3.5	0.3	8.7
koniphy	1	2.6	0.3	11.8
koniphy	2	3.5	0.2	5.8
koniphy	3	3.2	0.0	0.0
koniphy	4	3.5	0.0	0.0