

Facultad de Ciencias Naturales y Agropecuarias

Departamento Ciencias Agropecuarias

Trabajo de Diploma

**TÍTULO: Evaluación de la efectividad del
Trichoderma spp. controlador biológico *in
vitro* de *Stemphylium lycopersici***

Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero en
Agronomía

Autor: Jonathan Pozo Serrano

Tutores: MSc. María Teresa Cardoso Barreras

MSc. Enrique Reynaldo de la Cruz

Curso: 2018 - 2019

Año 61 de la Revolución

Resumen

Trichoderma spp. constituye uno de los bioplaguicidas más empleados en la actualidad por sus propiedades anti fúngicas. El objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro*, las potencialidades de *Trichoderma spp.* cepas (A-53), (A-34) y (TS-3) frente a *Stemphylium lycopersici*, hongo patógeno en cultivos del tomate. Se realizó el enfrentamiento entre *S. lycopersici* con *Trichoderma harzianum* (A-34), (A-53) y *T. viride* (TS-3), mediante un ensayo de antagonismo en PDA. Los indicadores evaluados fueron el índice de crecimiento (IC) y porcentaje de inhibición micelial (%IM). De las cepas evaluadas la de mayor efectividad fue A-53 (%IM=87.52 ± 4.53), (IC=0.78 ± 0.06), presentando este último indicador diferencias estadísticas con la cepa TS-3 ($p \leq 0.05$). La cepa A-53 fue la de menor variabilidad en relación al número de réplicas, los valores del %IM estuvieron entre 94.49 % a 82.98 % y el IC 0.88 a 0.68. A diferencia de la cepa TS-3 que presentó mayor variabilidad en el índice de crecimiento (0.84 a 0.40) y la (A-34) en el % del índice de inhibición micelial (90.71 % a 63.54 %). No se encontró diferencias estadísticas del %IM entre las tres cepas. Estos resultados demuestran las potencialidades de *Trichoderma spp.* como biocontrolador de *Stemphylium lycopersici* en cultivos de tomate.

Palabras clave: *Trichoderma spp.*; inhibición micelial (IM), bioplaguicida.

Abstract

Trichoderma spp. it is one of the most used biocontroller currently for its antifungal properties. The objective of this investigation was to evaluate *in vitro* the potentialities of *Trichoderma spp.* strains (A-53), (A-34) and (TS-3) against *Stemphylium lycopersici*, pathogenic fungus in tomato crops. The confrontation between *S. lycopersici* with *Trichoderma harzianum* (A-34), (A-53) and *T. viride* (TS-3) was carried out by means of an assay of antagonism in PDA. The indicators evaluated were the growth index (IC) and percentage of mycelial inhibition (%IM). Of the strains evaluated, the most effective was A-53 (%IM = 87.52 ± 4.53), (IC = 0.78 ± 0.06), this last indicator showing statistical differences with the TS-3 strain ($p \leq 0.05$). Strain A-53 was the lower variability in relation to the number of replicates, the % IM values were between 94.49% and 82.98% and the IC 0.88 and 0.68. Unlike the strain TS-3 that showed a lower value in the growth index (0.84 a 0.40) and the (A-34) in the % of the mycelial inhibition index (90.71 % a 63.54 %). There were no statistical differences in %IM between the three strains. These results demonstrate the potentialities of *Trichodrema spp.* as a biocontroller of *Stemphylium lycopersici* in tomato crops.

Key words: *Trichodrema spp.*; mycelial inhibition (IM), biological control.

Pensamiento.

El que labra su tierra se saciará de pan; mas el que sigue a los ociosos se llenará de pobreza. Proverbios 28:19.

Agradecimientos.

A Dios por todo lo bueno y lo malo.

Dedicatoria

A Dios por permitirme vivir y alcanzar todo lo logrado.

Y a todos aquellos que me han apoyado de alguna manera.

ÍNDICE

Introducción.....	1
II Revisión Bibliográfica	3
II.1 Generalidades del género <i>Trichoderma</i>.....	3
II.1.1 Taxonomía.....	4
II.1.2 Características de las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i>.	5
II.1.2.1 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai. Cepa A-34.	5
II.1.2.2 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai. Cepa A-53.	5
II.1.2.3 <i>Trichoderma viride</i> Persoon. Cepa TS-3.	6
II.1.3 Modos de acción.	6
II.2 Funciones en la agricultura del <i>Trichoderma</i> spp.	9
II.2.1 Estimulador del crecimiento de las plantas.	9
II.2.2 Actividad protectora y estimulante a semillas, suelos y diferentes cultivos.	9
II.2.2.1 Protección de semillas contra el ataque de hongos patógenos.	9
II.2.2.2 Protección directa a suelos y diferentes cultivos.	10
II.2.2.3 Estimulador de los mecanismos de defensa de las plantas.....	10
II.2.2.4 Facilitador de la solubilización y absorción de nutrientes.	11
II.2.3 <i>Trichoderma</i> como alternativa para el ahorro de fertilizantes químicos y pesticidas.	11
II.3 Importancia de los bioplaguicidas en la agricultura.	12
II.3.1 Bioplaguicidas fúngicos empleados en Cuba.....	13
II.4 <i>Trichoderma</i> como bioplaguicida.....	13
II.4.1 Empleo de <i>Trichoderma</i> spp. en Cuba.....	14
II.5 Principales afectaciones de <i>Stemphylium lycopersici</i> en cultivos de tomate.	14

III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
IV.1 Valoración económica de los resultados obtenidos.....	24
Conclusiones.	26
Recomendaciones.	27
Referencias bibliograficas	
Anexos	

Introducción

La contaminación ambiental se debe principalmente al uso indiscriminado y no planificado de sustancias tóxicas en diferentes procesos industriales. Para evitar la contaminación del ambiente podemos emplear soluciones naturales, beneficiosas para la atmósfera y a su vez económico (Martínez y Reyes., 2013).

Los bioplaguicidas son alternativas empleadas en la actualidad para sustituir los plaguicidas químicos, constituyendo una alternativa para disminuir la contaminación al Medio Ambiente. La producción agrícola se encuentra cada día más afectada por el uso de plaguicidas, ya sean insecticidas y fertilizantes químicos. Estos productos químicos usados de forma excesiva no solo perjudican el ambiente, también provocan daños a las cosechas y a la salud humana (Castro y Osorio, 2012).

Trichoderma spp. actualmente es empleado como bioplaguicida por sus propiedades para eliminar a otros hongos considerados fitopatógenos. Este hongo se puede encontrar distribuido en diferentes zonas y hábitat, especialmente en zonas que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Presenta además potencialidades como estimulador del crecimiento vegetal (Scarlet *et al.*, 2016).

El género *Trichoderma* posee un rápido crecimiento y desarrollo, produce gran cantidad de enzimas, inducibles en la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para su uso en la agricultura. Presenta gran tolerancia a condiciones ambientales extremas, hábitat en sitios donde existe una alta incidencia de hongos fitopatógenos causantes de diversas enfermedades en cultivos vegetales, pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas (Montalvo, 2012).

Trichoderma spp. absorbe nutrientes de los hongos que degrada, además de materiales orgánicos en descomposición, facilitando la incorporación de materia orgánica al suelo. La velocidad de crecimiento de este organismo es alta, por esto es capaz de establecerse en el suelo rápidamente y controlar diferentes enfermedades. Probablemente sea el hongo beneficioso más versátil y polifacético que abunda en los suelos (Lobaina, 2014).

Martínez *et al.* (2018) desarrollaron cepas promisorias de *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg para el control de aislamientos de *Fusarium spp.*, un patógeno de garbanzo (*Cicer arietinum L.*). Evaluando la actividad antagónica de las cepas de *T. asperellum* por el método del cultivo dual. Todas las cepas de *T. asperellum* analizadas mostraron alta capacidad competitiva por el espacio frente a los aislados de *Fusarium*, varias cepas de se destacaron por su micoparasitismo frente a *Fusarium nygamai* (F-11) y *F. oxysporum f. sp. ciceri* (F-50).

Dentro de las enfermedades foliares que más afectan los cultivos de arroz se encuentra (*Pyricularia grisea*), comúnmente llamada el tizón del arroz (De Souza *et al.*, 2017). Para su control el método más empleado es el uso de *Trichoderma spp.* Siendo para Cuba la especie *T. harzianum* la más promisorias en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos foliares (Pérez *et al.*, 2017).

En el cultivo del frijol el hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc. como agente fitopatógeno ocasiona la enfermedad conocida como el tizón sureño, provocando amarillamiento, marchitez, caída de las hojas y finalmente la muerte de la planta (Hernández *et al.*, 2012).

En la actualidad no se conoce que sea patógeno de ninguna planta; sin embargo, es capaz de parasitar, controlar y destruir muchos hongos fitopatógenos, nemátodos y otros agentes perjudiciales para la salud vegetal; debido a esto, muchos investigadores lo clasifican como un hongo hiperparásito.

Esto convierte a *Trichoderma* en un microorganismo de imprescindible presencia en los suelos y cultivos, y de un incalculable valor agrícola. En el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín se ha registrado en los últimos 10 años una afectación recurrente y masiva del *S. lycopersici*, donde se han registrados grandes pérdidas de cosechas del tomate *Lycopersicon esculentum*. Por lo anterior expuesto es que se prevé realizar un estudio sobre su aplicación *in vitro* en aislamiento del patógeno *Stemphylium lycopersici*, por lo que se presenta el siguiente problema:

Problema científico de la investigación: ¿Cuál será la efectividad de control *in vitro* de *Trichoderma spp.* frente a *Stemphylium lycopersici*?

A partir de este problema, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis: Si la efectividad *in vitro* de *Trichoderma spp.* en el control de *Stemphylium lycopersici* es elevada, entonces se logrará atenuar eficientemente la afectación de patógenos fungosos.

Objetivo General: Evaluar la efectividad de inhibición *in vitro* del género *Trichoderma spp.* frente a *Stemphylium lycopersici*.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar las cepas (A-53), (A-34) y (TS-3) para comprobar los indicadores más estables frente al patógeno de plantas de tomate *Stemphylium lycopersici*.
2. Determinar la efectividad *in vitro* como controlador biológico de tres cepas de *Trichoderma spp.* (A-53), (A-34) y (TS-3) frente al patógeno de plantas de tomate *Stemphylium lycopersici*.

II Revisión Bibliográfica

II.1 Generalidades del género *Trichoderma*.

El género *Trichoderma spp.* pertenece a un grupo aislado de hongos Deuteromicetos u hongos imperfectos. Se reproducen asexualmente por conidios, los micelios forman una superficie blanca clara y más tarde se presentan de color verde azulado oscuro (Lobaina, 2014).

Las especies de este género son aerobios, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas. La relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma spp.*, al parecer depende de la especie y del propio aislamiento. Se conoce que el *T. viride* tolera 31°C, mientras que el *T. harzianum* tolera hasta 38°C,

para esta última, en algunos aislamientos la temperatura óptima para el crecimiento fue de 20°C, aunque de manera general esta varía entre 25 y 30°C.

Sin embargo a 30°C, la actividad antagónica de esta especie fue casi nula; lo cual constituyen evidencias de que la temperatura óptima para el crecimiento, no necesariamente coincide con la de su actividad antagónica (Martínez y Reyes., 2013).

Se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios, se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos.

Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere al *Trichoderma spp.* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos (Rodas, 2016).

II.1.1 Taxonomía.

Clasificación taxonómica del género *Trichoderma* (Lobaina, 2014)

- Subdivisión: Deuteromicotina
- Clase: Deuteromicetos
- Orden: Moniliales
- Familia: Moniliaceae
- Género: *Trichoderma*

La mayor importancia, del género *Trichoderma* es su función como agente del control biológico de hongos fitopatógenos y nematodos, su acción como inductor de resistencia en las plantas y estimulador de crecimiento (Martínez y Reyes, 2013). Se pueden encontrar las especies *T. piluliferum* Webster y Rifai, *T. polysporum* (Link ex Pers) Rifai, *T. hamatum* (Bon) Bain, *T. koningii* Rifai, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T.*

longibrachiatum Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai y *T. viride* Pers ex S. F Gray (Martínez y Reyes, 2013). Siendo el *T. viride* y *T. harzianum* las especies más conocidas del género (Lobaina, 2014).

II.1.2 Características de las diferentes cepas de *Trichoderma*.

II.1.2.1 *Trichoderma harzianum* Rifai. Cepa A-34.

Características fisiológicas: Las colonias presentan crecimiento rápido en PDA a 28-30°C, micelio aéreo algodonoso, la conidiación es difusa en grumos o agregados en pústulas, blanco o verde de hasta 8 mm. Reverso de las colonias amarillo caramelo rojizo. Difunde pigmento al medio de cultivo (Ver anexo 1).

Características microscópicas: Conidióforos complejamente ramificados. Fiálides en verticilos de 2 a 4, muy agrupadas en número de hasta de 6, en ramas terminales relativamente cortas y anchas 3.5 - 7.5 x 2.5 - 3.8µm, ampuliformes a lageniformes. Conidios incoloros a verdes, lisos, elipsoides a obovoides; 1.7 - 3.2 - 1.3 x 2.5µm. Clamidosporas intercaladas o terminales, 4 - 2µm de diámetro (Ver Anexo 1).

II.1.2.2 *Trichoderma harzianum* Rifai. Cepa A-53.

Características culturales: Colonias de rápido crecimiento en PDA a 28-30°C, micelio aéreo blanco, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8 mm en diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Reverso de la colonia color carmelita. Difunde pigmento al medio de cultivo.

Características microscópicas: Conidióforos hialinos, con estructura piramidal con un ápice estéril. La conidiación comienza por la base de este patrón de conidióforo y las ramas jóvenes son estériles. Fiálides ampuliformes a subglobosas; muy constreñidas en la base, e hinchadas en el medio y abruptamente estrechas en el ápice en número hasta de seis. Conidios subglobosos a ovoides o ligeramente elipsoidales con ápice ampliamente redondeado, pared lisa o ligeramente rugosa, subhialinos a verde pálido, 1.7-3.2x1.3-2.5 µm (Ver anexo 2).

II.1.2.3 *Trichoderma viride* Persoon. Cepa TS-3.

Características culturales: Colonias en PDA a 28-30 °C con esporulación difusa de color verde intenso, micelio blanco hacia el borde de la colonia. Conidios abundantes en anillos concéntricos, ausencia de pigmento que se difunde al medio, ocasionalmente con aroma a coco (Gutiérrez, 2010). (Ver anexo 3).

Fiálides que surgen solitarias del eje principal al extremo de las ramas laterales o en grupos de 2-3 del extremo del conidióforo. Verticiladas ampuliformes a lageniformes, constreñidas en la base más o menos engrosada, atenuadas en el extremo. Clamidosporas hialinas verdosas. Conidios ligeramente verrucosos, globosos, verdosos (Martínez y Reyes, 2013). (Ver anexo 3).

II.1.3 Modos de acción.

El género *Trichoderma* se caracteriza por ejercer su acción biocontroladora por varios mecanismos de acción, un mecanismo en sí constituye tan solo una parte de un complejo sistema aun cuando parezca que cada uno tenga un papel prominente por separado (Guerrero, 2016).

En la actualidad, se reconocen varios mecanismos de acción de *Trichoderma spp.* como: micoparasitismo, antibiosis, competencia con el patógeno, promoción del crecimiento de la planta, incremento de su tolerancia frente a estreses abióticos y estimulación de sus defensas contra patógenos (Carrero, 2016).

La antibiosis ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos de un organismo en acción directa sobre otro, inhibiendo el crecimiento de un organismo por los metabolitos secundarios (SMs) producidos por otro, sin que medie contacto físico entre ellos.

Los SMs son moléculas que no esenciales para el crecimiento del organismo pero tienen un importante papel en señalización, desarrollo e interacción con otros organismos. Las cepas de *Trichoderma spp.* tienen la capacidad de producir una amplia variedad de SMs volátiles y no volátiles distribuidos en más de 120 estructuras de SMs con una fuerte actividad inhibitoria del crecimiento de muchos patógenos de plantas (Guerrero, 2016; Carrero, 2016).

El micoparasitismo producido por *Trichoderma spp.* es un proceso complejo que conlleva una serie de eventos secuenciales. Primero, la especie de *Trichoderma* localiza al patógeno y crece orientado hacia él por quimiotropismo. Una vez que los hongos parásitos y huésped establecen contacto, las hifas de *Trichoderma* pueden enroscarse alrededor de la hifa de su presa y formar estructuras especializadas de tipo apresorio, desde las que se produce la penetración en el interior de las hifas del patógeno.

Al establecer el contacto, el *Trichoderma* produce varias Enzimas de degradación de pared celular, entre las que destacan quitinasas, glucanasas y proteasas y antibióticos como los peptaiboles que producirían poros en la pared celular del hongo parasitado. Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido intracelular del hongo, fase que va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del huésped (Carrero, 2016).

Se entiende por competencia el desigual comportamiento de dos o más organismos por un mismo requerimiento o recurso, de manera que la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para los demás. Estos requerimientos o recursos pueden ser nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etc. (Paulitz, 1990).

Es difícil determinar hasta qué punto *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista solo a través de la competición o si, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competición se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2006).

Aun así, existen varios ejemplos en los que la captación de nutrientes es el mecanismo de competición directo de *Trichoderma* frente algunos patógenos (Howell y Stipanovic, 1995; Handelsman y Stabb, 1996; Lo *et al.*, 1996).

Las especies de *Trichoderma* son capaces de promover el crecimiento y el desarrollo de las raíces laterales de las plantas (Chang *et al.*, 1986), con el consiguiente incremento de la productividad en los cultivos (Harman, 2006). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son: la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores, o la conversión de material

no utilizable (metales como hierro, zinc, manganeso y cobre) en formas que puedan ser utilizadas por las plantas (Carrero, 2016).

Sin embargo, no todas las especies y/o cepas de *Trichoderma* estimulan el desarrollo de las plantas (Muñoz, 2012). Este hecho está condicionado por el genotipo de la planta y por la especie de *Trichoderma* en cuestión (Guigón, 2010). De hecho, algunas especies de *Trichoderma* causan efectos negativos sobre el crecimiento de la planta, como es el caso de *Trichoderma brevicompactum*, cuyos efectos adversos se han asociado con una producción de trichodermina (Carrero., 2016).

Trabajos llevados a cabo con mutantes de plantas y/o transformantes de *Trichoderma spp.* han demostrado que algunas especies pueden producir ácido indol acético (IAA), provocando la regulación de los niveles de esta hormona en la rizosfera (Carrero, 2016).

Durante muchos años, la capacidad de distintas cepas de especies de *Trichoderma spp.* para proteger a la planta contra patógenos de raíz se atribuyó a un efecto directo sobre el patógeno. Sin embargo, se ha demostrado que, al colonizar las raíces de la planta, dichas cepas estimulan los mecanismos de defensa de la misma (Sarayasi, 2012).

Está demostrado que *Trichoderma spp.* inicialmente coloniza la superficie de las raíces de la planta para, posteriormente, penetrar en las primeras capas de células de la epidermis, donde permanece como un microorganismo simbiote no patogénico, induciendo cambios en la arquitectura de la raíz y otros sistémicos que influyen sobre su capacidad de defensa contra patógenos y estreses abióticos (Carrero, 2016).

Sería establecida la interacción con la planta, *Trichoderma spp.* produce una gran variedad de los patrones moleculares asociados por microorganismo (MAPMs) y algunos los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como la endopoligalacturonasa ThPG1, que activa la inmunidad provocada (MTI); siendo la MTI una respuesta más fuerte que la Primaria Inducible (PTI) (Guerrero, 2016).

Los efectos beneficiosos de *Trichoderma spp.* en plantas sometidas a estrés abiótico están bien documentados, aunque muchos de los factores que controlan el estrés en las plantas son todavía desconocidos (Guerrero, 2016).

El tratamiento de semillas con *T. harzianum* acelera su germinación, incrementa el vigor de las plántulas y aminora los efectos provocados por estrés térmico, osmótico, salino e hídrico, ya que induciría cambios fisiológicos en la planta contra los daños oxidativos.

Estas respuestas son comparables a los efectos provocados por *Piriformospora indica* durante la simbiosis que establece con la planta (Lobaina, 2014). Un mecanismo común a través del cual los hongos beneficiosos y las bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) aumentan la tolerancia de éstas a los estreses abióticos, disminuyendo el daño causado por la acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) que ocurre en las plantas estresadas (Carrero, 2016).

II.2 Funciones en la agricultura del *Trichoderma* spp.

Se conocen muchas funciones beneficiosas que realiza este hongo en la agricultura, especialmente en el campo de la Sanidad Vegetal. A modo de resumen se han demostrado las siguientes:

II.2.1 Estimulador del crecimiento de las plantas.

Se ha comprobado que *Trichoderma* spp. produce sustancias estimuladoras del crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estas sustancias actúan como catalizadores o aceleradores de los tejidos meristemáticos primarios (los que tienen potencial de formar nuevas raíces en las partes jóvenes de éstas, acelerando su reproducción celular, logrando que las plantas alcancen un desarrollo más rápido que aquellas plantas que no hayan sido tratadas con dicho microorganismo (Montalvo, 2012).

II.2.2 Actividad protectora y estimulante a semillas, suelos y diferentes cultivos.

II.2.2.1 Protección de semillas contra el ataque de hongos patógenos.

Este hongo coloniza las semillas botánicas protegiendo las futuras plántulas en la fase post-emergente de patógenos fúngicos. Cepas de *Trichoderma* spp. son capaces de colonizar la superficie de la raíz y de la rizósfera a partir de las semillas tratadas y de las plantas adultas existentes en el suelo, protegiendo a las mismas de enfermedades

fungosas. Así las semillas reciben una cobertura protectora cuyo efecto se muestra cuando la misma es plantada en el sustrato correspondiente.

Las semillas agrícolas, tratadas con *Trichoderma spp.* protegen eficientemente las plántulas en el semillero sin necesidad de tratamiento del suelo previo a la siembra. El empleo del género *Trichoderma* por medio de las semillas es probablemente la forma más económica y extensiva para introducir el biocontrol en la producción, este método consiste en tratar las semillas con una suspensión acuosa de esporas o en forma de polvo, con o sin necesidad de adherente (Scarlet, 2016).

II.2.2.2 Protección directa a suelos y diferentes cultivos.

El manejo de las plantas mediante la rotación de cultivos favorece a este género a limpiar el suelo de propágulos de fitopatógenos, vulnerables durante su latencia en ausencia del hospedante, por esta razón la utilización del biopreparado en los cultivos a rotar en las áreas altamente infectadas será una forma a contribuir en la reducción de la población del patógeno en un menor plazo de tiempo (Scarlet, 2016).

La aplicación de *Trichoderma spp.*, directamente al suelo ofrece incluso una protección mayor a los cultivos. Cuando es utilizado para el control de hongos del suelo, pueden mezclarse con materia orgánica y otras enmiendas utilizadas como biofertilizantes, inoculantes bacterianos usados como fertilizantes ecológicos.

Aunque la aplicación del biopreparado al suelo puede ser directa, la introducción de una enmienda orgánica en los canteros previa a la siembra favorecerá el establecimiento del bioagente y el desarrollo posterior de las plantas (Montalvo, 2012).

II.2.2.3 Estimulador de los mecanismos de defensa de las plantas.

La propiedad del género *Trichoderma* de proteger las plantas contra patógenos radicales ha sido atribuida a un efecto antagónico contra la invasión del patógeno. Sin embargo, las asociaciones hongo-raíz también estimulan los mecanismos de defensa

de las plantas. *Trichoderma* spp. ejerce una protección a las plantas frente a patógenos que producen daños radicales y aéreos, inclusive infecciones virales.

Estos mecanismos de inducción de resistencia son similares a la respuesta hipersensitiva, resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida “RSI” en plantas (Montalvo, 2012).

II.2.2.4 Facilitador de la solubilización y absorción de nutrientes.

Para desarrollar su metabolismo *Trichoderma* spp. necesita de fuentes de carbono difícilmente biodegradables, como ligninas y celulosas. Por ello, es capaz de movilizar nutrientes del suelo mediante excreción de enzimas extracelulares que transforman compuestos nitrogenados orgánicos en nitrógeno inorgánico, fundamentalmente amonio, y compuestos fosforados orgánicos en fósforo inorgánico, entre otros. Esta solubilización de nutrientes permite su utilización por las plantas, aumentando su salubridad y resistencia al ataque de patógenos (Carrero, 2016).

II.2.3 *Trichoderma* como alternativa para el ahorro de fertilizantes químicos y pesticidas.

Trichoderma spp. posee propiedades antibióticas, los cuales actúan contra varios microorganismos fitopatógenos. Se comporta como saprofito en la rizosfera, siendo capaz de destruir residuos de plantas infectadas por patógenos. Su acción es antagonista, siendo capaz de sacar el mejor provecho por su alta adaptación al medio, competir por el sustrato y por espacio (Lobaina, 2014).

Es un microorganismo competitivo, ofrece una protección biológica a la planta, destruye el inóculo patógeno presente y contribuye a prevenir su formación, actúa por medio de la competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas y micoparasitismo (Guerrero, 2016).

Tiene efecto en la solubilización de los fosfatos insolubles del suelo, facilitando su asimilación por los cultivos, forma asociaciones con micorrizas, aumentando de manera significativa la rizósfera del suelo, permitiéndole a las plantas hacer una mayor extracción de nutrientes con un alto grado de asimilación.

También es compatible con el biofertilizante *Azotobacter chroococcum*, una bacteria que fija nitrógeno en el suelo; por lo que se establecen relaciones de ayuda mutua, con el consiguiente beneficio para la nutrición de los cultivos. Como es empleado como bioagente para el control de diferentes fitopatógenos, contribuye a sustituir en muchos cultivos las aplicaciones de pesticidas químicos, potenciando de manera significativa una agricultura orgánica (Guerrero, 2016).

II.3 Importancia de los bioplaguicidas en la agricultura.

La agricultura como proceso antropológico tiene un gran impacto en el medio ambiente. En los últimos años, algunos aspectos de la agricultura a nivel industrial han sido cada vez más polémicos. La creciente influencia de las grandes compañías productoras de semillas y productos químicos y las procesadoras de comida, preocupan cada vez más, tanto a los agricultores como al público en general. La agricultura intensiva ha causado que vastas áreas fértiles hayan dejado de serlo por completo (Lobaina, 2014).

Los bioplaguicidas tienen una gran importancia en la agricultura para la sustitución de los agroquímicos dirigidos contra plagas y enfermedades. La toxicidad y/o amplio espectro de estos productos químicos ha contribuido a una disminución de la biodiversidad y por tanto a una pobre regulación de las poblaciones macro y microbianas (Hermosa *et al.*, 2014).

Además, el interés creciente sobre la salud humana, que ha conllevado a fuertes restricciones sobre el uso de plaguicidas químicos, ha hecho necesario implementar estrategias más saludables, insertados en los sistemas de producción orgánica y sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), donde el uso del control biológico, con los bioplaguicidas viene a ofrecer una solución viable (Jiménez *et al.*, 2010).

En la actualidad se conocen más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y controladores de otras poblaciones microbianas directamente. Sin embargo, solo unos pocos se usan rutinariamente en los programas de control de plagas (Carrero, 2016).

El uso de hongos antagonistas ha revolucionado el control de enfermedades de naturaleza fúngica en plantas, y se está investigando activamente en el efecto contra

otros patógenos, debido a la capacidad de estos hongos de estimular el crecimiento de las plantas y activar los mecanismos de defensa locales y sistémicos, lo que hace posible su uso a una escala mucho más amplia (Malmierca *et al*, 2015).

Los antagonistas de naturaleza fúngica dominan alrededor del 90% del mercado para biocontrol de hongos fitopatógenos, representados en gran extensión por *Trichoderma spp.* Para el control de enfermedades fúngicas y también para nemátodos donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii* (Lobaina, 2014).

II.3.1 Bioplaguicidas fúngicos empleados en Cuba.

Los medios biológicos o controladores biológicos, que se reproducen masivamente para realizar aplicaciones o liberaciones masivas se adquieren en los Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (CREEs).

Dentro de los microorganismos que estos centros se reproducen se encuentran los hongos entomopatógenos. Como el *Beauveria bassiana* (BASISAV) siendo efectivo contra coleópteros aunque también tiene efectos sobre otras órdenes de insectos principalmente mosca blanca, trips, y chinches sobre todo en la época de mayor calor; el *Verticillium lecanii* (VERTISAV) es más efectivo en los períodos frescos presenta sus efectos frente la mosca blanca, pulgones, cochinillas harinosas, chinches, thrips entre otras pudiendose aplicar mezclado con *Beauveria bassiana*.

También se produce el *Metarhizium anisopliae* (METASAV) que se emplea contra coleópteros, lepidópteros, salta hojas entre otras plagas; entre los hongos que se producen en los CREEs los del género *Trichoderma spp.* (TRICOSAV) son muy codiciados por los agricultores por su efectividad en la reducción de los patógenos del suelo en los semilleros y vivero, así como en los sustratos de los canteros, resultando igualmente de efectivo en el tratamiento botánicas y agámicas (Vázquez y Fernández, 2007).

II.4 *Trichoderma* como bioplaguicida.

El *Trichoderma spp.* conocido por su capacidad de controlar enfermedades de tipo fungosas y controlar plagas que atacan las plantas y principalmente los cultivos de hortalizas de gran importancia económica (Gato *et al*, 2014). Entre los diferentes

hongos fitopatógenos que puede controlar se encuentra la *Rhizoctonia solani*, causante del Damping-off del café, soya, tomate, arroz, tabaco, caña de azúcar, berenjena y papa.

Además el *Sclerotium rolfsii*, causante de la pudrición de los tubérculos de malanga, boniato y papa y de los tallos de berenjena, frijol y plantas ornamentales; *Pythium spp.*, que afecta las posturas de arroz, cucurbitáceas, legumbres, pimientos y tomate; *Colletotrichum spp.* que ataca mayormente los cultivos de ñame, piña, col china, papaya, orquídeas, café, pepino, soya, tabaco y caña.

También el *Fusarium oxysporum* que causa la pudrición del bulbo de la cebolla, atacando además piña, col, café, malanga, pepino, cacao, soya, boniato, tomate, plátano, tabaco y papa. Los daños severos causados por estos hongos pueden provocar el colapso total en las plantas, fundamentalmente en la fase temprana del cultivo (Caballero *et al.*, 2016).

II.4.1 Empleo de *Trichoderma spp.* en Cuba.

Las cepas cubanas *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 y A-53 y *Trichoderma viride* Persoon TS-3, con efecto sobre hongos y nematodos, son las más empleadas dentro de los programas nacionales de Manejo Integrado de Plagas (MIP) en cultivos de importancia económica. Estas cepas se utilizan para el control de fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, con una disminución importante de los niveles de infectación (Gato *et al.*, 2014).

El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) cuenta con cepas promisorias de *T. asperellum* identificadas y caracterizadas morfo-fisiológica y molecularmente, las cuales tienen efecto frente a una gama de hongos causantes de enfermedades en cultivos de importancia económica como: tomate (*Solanum lycopersicum L.*), pimiento (*Capsicum annum L.*), tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) y arroz (*Oryza sativa L.*) (Ronnie y Martínez, 2018).

II.5 Principales afectaciones de *Stemphylium lycopersici* en cultivos de tomate.

S. lycopersici produce síntomas en hojas, peciolo y tallos. Los primeros síntomas consisten en pequeñas manchas en las hojas, oscuras, circulares o alargadas, que

aparecen en hojas de la parte baja de la planta y se distribuyen sin respetar un patrón. Al avanzar la enfermedad, las manchas aumentan de tamaño, el centro se vuelve de color gris y el borde más oscuro, donde se encuentran la mayor cantidad de conidióforos y conidios. Las manchas viejas se secan y se agrietan de lado a lado quedando la hoja perforada. Generalmente las manchas están rodeadas de un halo clorótico. Si bien, al inicio de la enfermedad, los síntomas parecen no tener importancia, al cabo de pocos días, estas manchas coalicionan para formar grandes áreas necróticas, las hojas se vuelven amarillas y mueren; reduciendo el área fotosintética y provocando pérdida de los rendimientos (Syngenta, 2018). (Ver anexo 4 y 5).

En cultivos de tomate en Argentina se ha observado una elevada incidencia por patologías de *Stemphylium lycopersici* en las hojas. Recientemente se ha determinado un incremento en la incidencia de esta enfermedad, en Sur América (Franco *et al.*, 2013).

En el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín se ha registrado en los últimos 10 años una afectación recurrente y masiva del *S. lycopersici*, donde se han registrados grandes pérdidas de cosechas del tomate *Lycopersicon sculentum*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales Empleados:

- Alcohol etílico 70%
- Mechero.
- Algodón.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Lactofenol azul.
- microscopio de contraste de fase.
- microscopio estereoscopio.
- tubos capilares.

- agujas de siembra.
- pipetas 1 y 10 ml.
- Cabina de flujo laminar vertical o gabinete de seguridad biológica.
- Autoclave.
- Bandejas metálicas.
- Incubadora BINDER.
- Medio de cultivo PDA.
- Inóculos de *Trichoderma spp.* (A-53), (A-34) y (TS-3).
- Inóculo del patógeno *S. lycopersici*.

Metodología empleada:

Los ensayos de antagonismo se realizaron en el Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Holguín en el departamento de micología durante los meses de enero a junio del 2018. *Stemphylium lycopersici* se aisló a partir de hojas infectadas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) tomadas en una parcela de la ETPP de Mayabe, Holguín (Ver anexo 6), siguiendo la metodología de Abbas *et al.* (2014).

El enfrentamiento entre el *S. lycopersici* con *T. harzianum* (A-34) *T. harzianum* (A-53) y el *T. viride* (TS-3) se realizó mediante el ensayo de antagonismo descrito por Iraima y Joksan (2018). Se realizó el cultivo en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo agar papa y dextrosa (PDA).

Se colocó en un extremo de la placa un disco de 7 mm de diámetro de micelio del patógeno (tomado del crecimiento en placa de Petri inoculada con suspensión micelial en medio de cultivo PDA) y en el extremo opuesto otro disco de 5 mm con micelio del antagonista con 50 mm de separación entre ellos.

Se empleó un diseño experimental de bloques al azar con número desigual de tratamientos y replicas. Los indicadores evaluados: índice de crecimiento (IC) y porcentaje de inhibición micelial (%IM) (Campuzano, 2017). Para establecer la cepa de

menor y mayor variabilidad %IM y IC se determinaron ambos índices en el séptimo para seis replicas por cepa.

Diariamente se tomaron medidas en el desarrollo de cada una de las especies fúngicas. Para determinar el área influenciada por *Trichoderma spp.* se empleó el software ImageJ de NHI (Rueden *et al.*, 2016).

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis múltiple de medias por PERMANOVA con 10 000 permutaciones, para comparar el %IM y IC entre las cepas, empleando la distancia euclidiana, con un nivel de significación del 5 % para una comparación del valor de p sin corrección, este método utiliza permutaciones para estimar la distribución de la prueba estadística bajo la hipótesis nula entre los distintos grupos. Se empleó el Software estadístico PAST 3.18 (Hammer *et al.*, 2018).

IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizada la siembra dual en las placas Petri se observó el crecimiento cada cepa, donde en las primeras 24 horas ninguna cepa mostraba diferencias entre sí (ver anexo 7,8 y 9). A partir de las 48 horas comenzó a observarse las diferencias en cuanto al hábito de crecimiento entre las tres cepas (ver anexo 10, 11 y 12).

A las 72 horas de haber comenzado el enfrentamiento la cepa A-53 mostrando la mayor velocidad de crecimiento respecto a las cepas A-34 y TS-3, apreciándose el quimiotaxismo de estas cepas, siendo la cepa A-53 la única que mostro contacto con el patógeno y la cepa TS-3 se comportó de forma más discreta en cuanto el crecimiento (ver anexo 13,14 y 15).

Una vez cumplido en plazo de las 168 horas para concluir el enfrentamiento, todas las cepas evidenciaron efecto inhibitorio sobre el patógeno objeto de estudio, destacándose la cepa A-53 en comparación con las otras dos cepas debido al crecimiento tan invasivo sobre los micelios del patógeno dejándolo casi sin poder observarse el *S. lycopersici*. Se observó nuevamente que la inhibición más conservadora la efectuó la cepa TS-3 (ver anexo 16, 17 y 18).

Las tres cepas no presentaron diferencias estadísticas en relación al %IM. La cepa A-53 fue la de mayor %IM (87.52 ± 4.53), seguido por la cepa TS-3 (81.13 ± 13.80) y A-34 (78.28 ± 9.78) respectivamente. Analizando el índice de crecimiento antagónico la cepa de mayor efectividad fue A-53, ($IC=0.78 \pm 0.06$), encontrando diferencias estadísticas con la TS-3 (0.56 ± 0.15), ($p=0.01$), (Figura 1 y 2).

Presentó una menor variabilidad en dependencia al número de réplicas la A-53 valores del IC (0.88 a 0.68) y %IM (94,49 % a 82.98 %) (Figura 3 y 4). Seguido por la TS-3 IC (0.84 a 0.40) y %IM (96.02 % a 60.00 %), cepa A-34 IC (0.78 a 0.36) y %IM (90.71 % a 63.54 %).

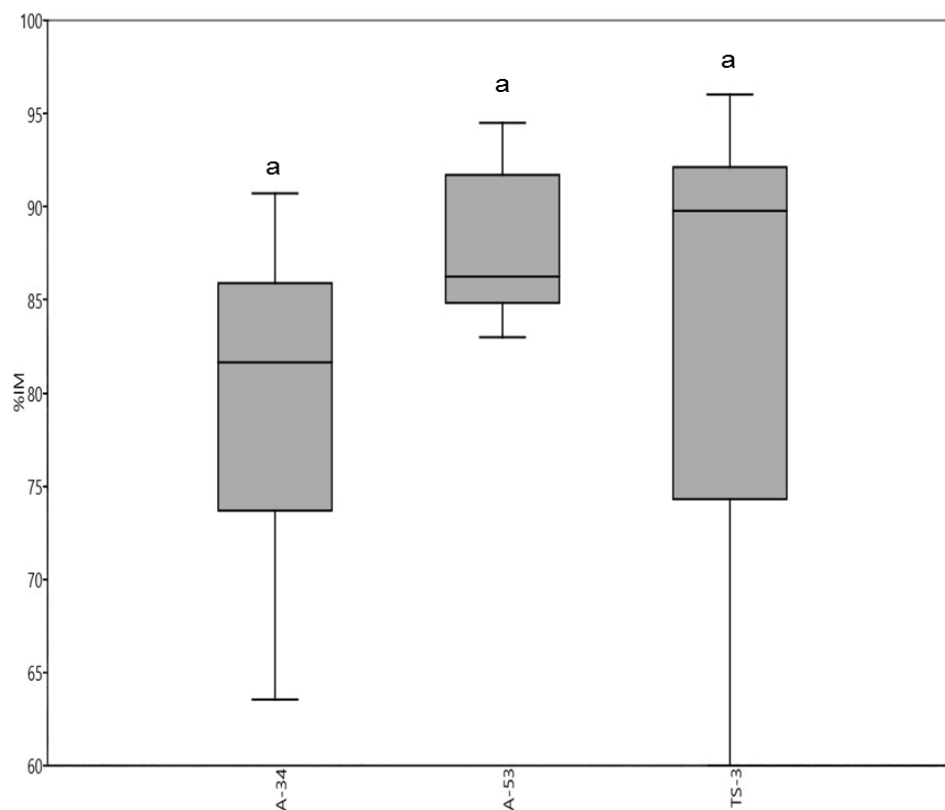


Figura 1. Variación del %IM entre las cepas A-34, A-53 y TS-3 a partir de la prueba PERMANOVA para 10 000 permutaciones ($p=0.29$ y $F= 1.31$). Letras iguales representa que no existe diferencia entre las medias, $p \leq 0.05$.

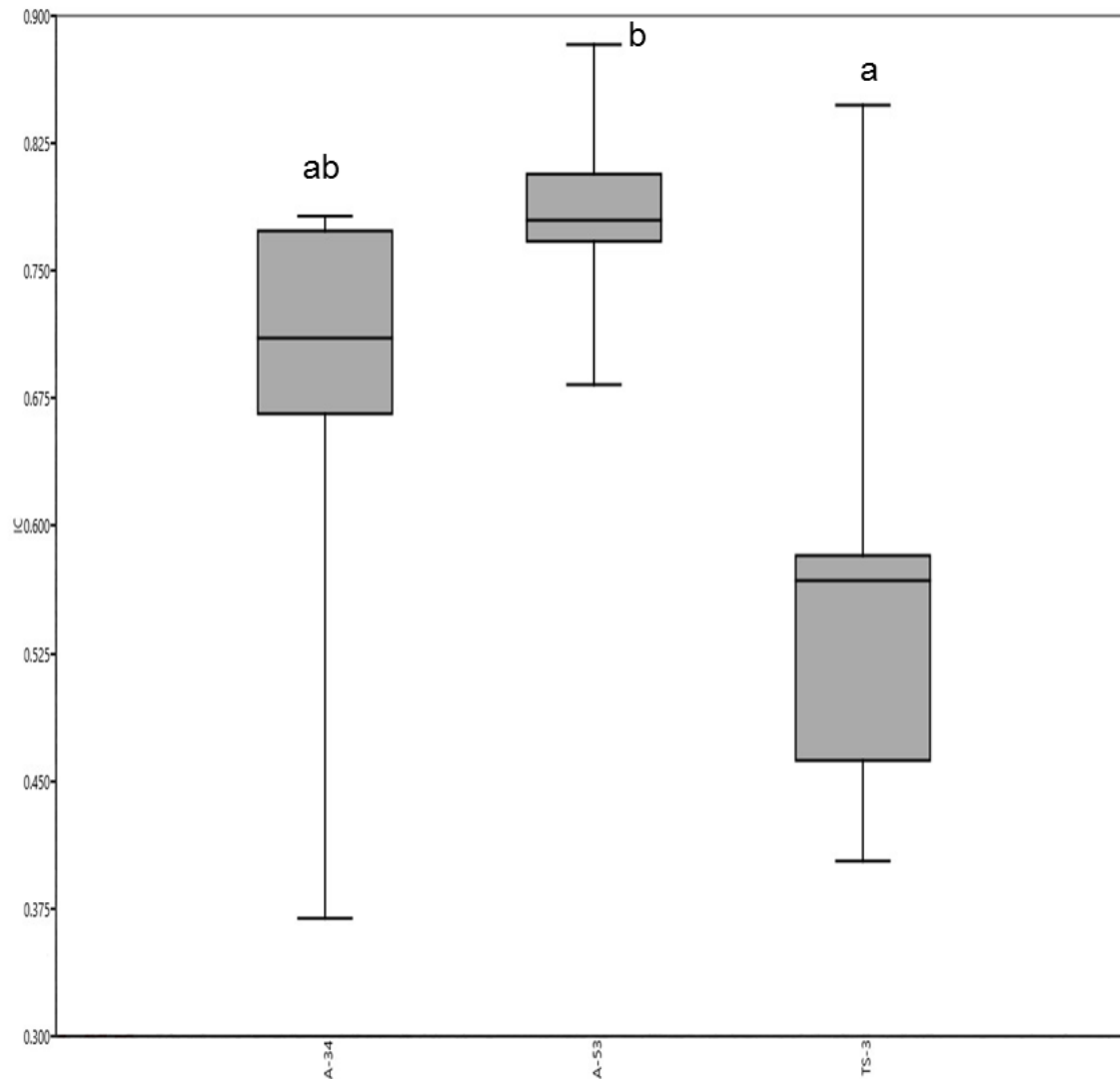


Figura 2. Variación del IC entre las cepas A-34, A-53 y TS-3 a partir de la prueba PERMANOVA con 10 000 permutaciones ($p=0.03$ y $F= 4.12$). Letras iguales representa que no existe diferencia entre las medias, letras diferentes representa que existe diferencias significativas entre las medias $p \leq 0.05$.

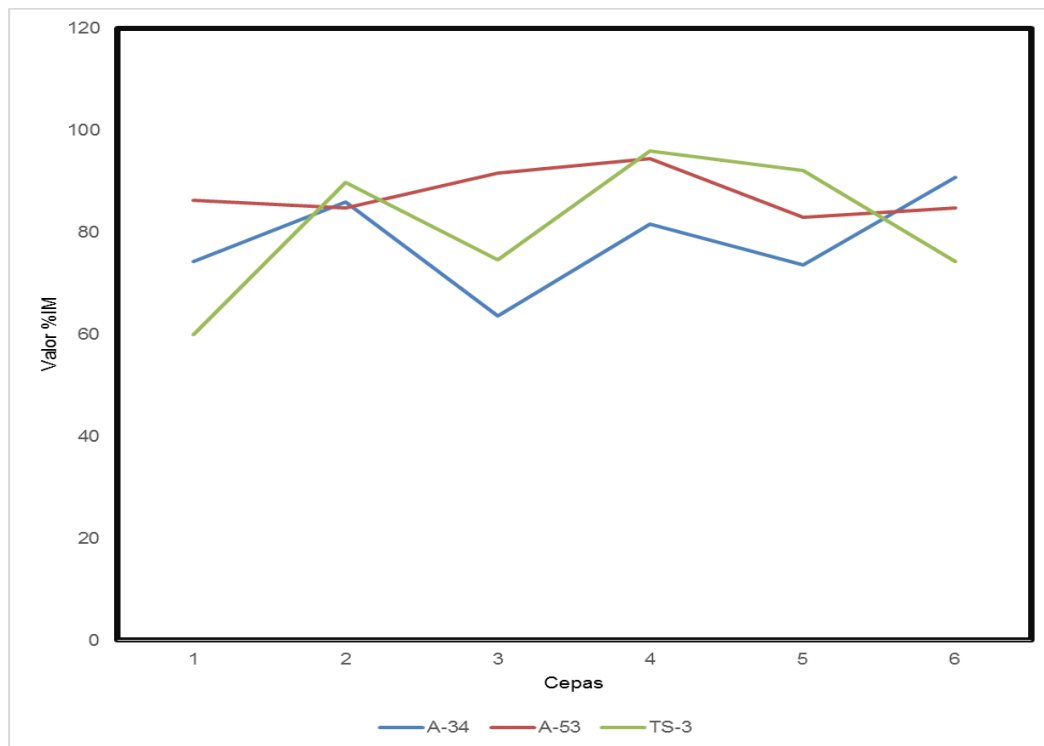


Figura 3. %IM por réplicas y cepas.

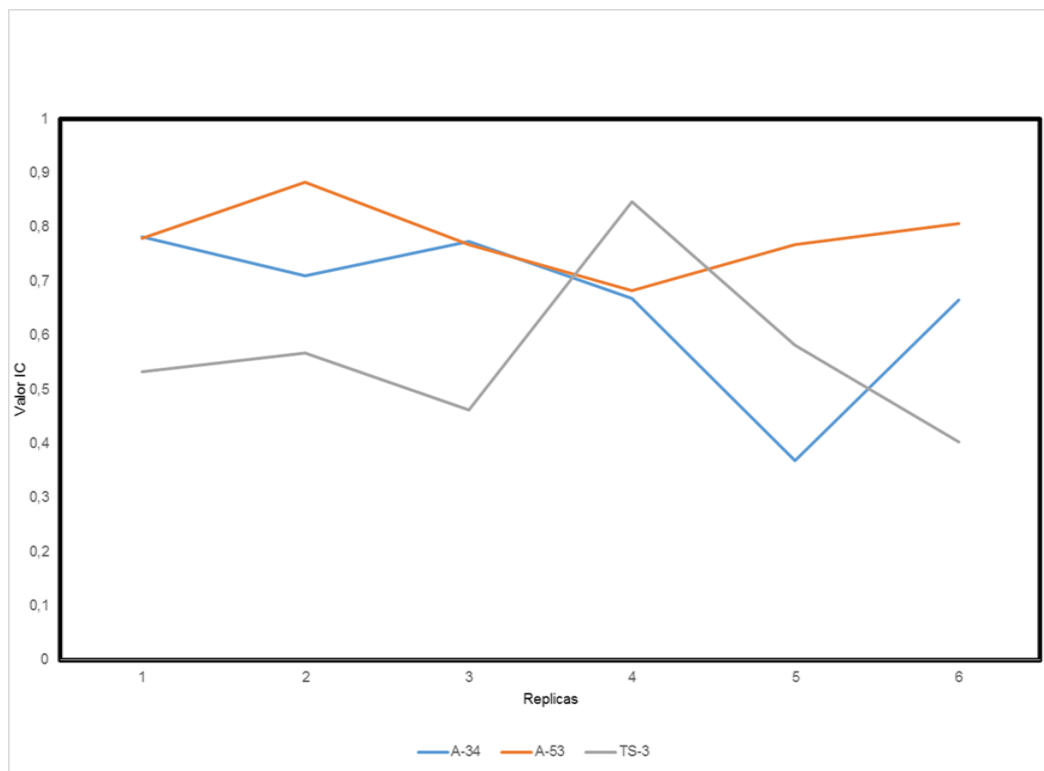


Figura 4. IC por réplicas y cepas.

Aislados de *Trichoderma spp.* en PDA en siembras antagónicas con el patógeno *Macrophomina phaseolina* se observó una fuerte inhibición de *Trichoderma spp.* al punto del contacto con el agente patógeno, midiendo el diámetro de la colonia en el tercer y quinto día después de la inoculación.

Este resultado demostró las cualidades como biocontrolador *in vitro* de *Trichoderma spp.*, la actividad antagónica de los aislados estuvo entre un 25.49 % y 27.58 % en el tercer día y entre un 60.60 % y 118.06 % en el quinto día (Habu, 2018).

Valores ligeramente superiores al obtenido en nuestro estudio en relación a las tres cepas empleadas para seis días de cultivo, obteniendo un %IM en un rango del 63.54 % al 96.02 %. Esta diferencia pudiera estar dada al tipo de patógeno, cepas de *Trichoderma spp.* utilizadas, como las diferentes condiciones medioambientales controladas en el laboratorio.

Cepas nativas mexicanas del género *Trichoderma spp.* demostraron una inhibición del crecimiento de patógeno *Phytophthora capsici* en un (22.1 %) especie *T. harzianum* y *T. yunnanense* (10.3 %) (Cruz, 2018). *T. longibranchiatum* mostró la mayor capacidad de inhibición contra *Colletotrichum gloeosporioides* con valores de 22.5 % y 21.9 %, respectivamente.

La actividad antagónica del *Trichoderma spp.* contra *Fusarium verticillioides* en PDA después de 14 días de enfrentamiento fue de 23.86 % a 43.14 % y una media de 32 % (Ann, 2017). Los valores obtenidos en las diferentes investigaciones fueron inferiores 0.23 y 0.44 veces respectivamente al obtenido en nuestro estudio, a pesar haber realizado el enfrentamiento antagónico en solamente seis días.

Ensayos antagónicos realizados en *in vitro* de *T. harzianum* cepa CCIBP-T4 frente *Mycosphaerella fijiensis*, patógeno foliar de cultivos de plátanos y bananos en Cuba. Se obtuvo una elevada actividad de hiperparasitismo contra *M. fijiensis* en seis días de inoculación. Causando ruptura en la pared celular de la hifas además de la salida del contenido extracelular (Wolna, 2017).

Esta actividad anti fúngica de *T. harzianum* se le atribuye a enzimas extracelulares con actividad lítica sobre las hifas del patógeno. Diferentes investigaciones han identificado

enzimas con actividad antagónica producida por el género *Trichoderma*, entre ellas destacan las quitinasas, glucanasas y proteasas (Neves, 2010). Hernández *et al.* (2011) evaluaron el efecto antagonista *in vitro* de 31 cepas de *Trichoderma spp.* frente a *Phytophthora capsici* mostrando las cepas un 97 % de inhibición micelial.

El moho foliar *Cladosporium fulvum* es una de las enfermedades que más ataca el cultivo de tomate en el Perú. Se trazó como alternativa para controlar este patógeno su enfrentamiento con cuatro hongos antagonistas bajo condiciones *in vitro* los mismos son: *Hansfordia pulvinata*, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. virens*.

Se pudo determinar que a 24 °C y 72 h, el crecimiento de *T. harzianum* fue estadísticamente diferente de las otras tres especies ensayadas, y a 28 °C fue similar a *T. viride*. A diferencia de *T. virens* que a 24 °C y 120 h, fue diferente de todas las especies evaluadas.

A las 168 h el crecimiento de las tres especies de *Trichoderma* fue estadísticamente similar, diferenciándose a la especie *H. pulvinata*. Se estableció como mecanismo de acción más común para los cuatro hongos antagonistas el micoparasitismo. Demostrando una mayor eficacia *T. harzianum* reduciendo al patógeno en un 19,35 % bajo condiciones de invernadero (Torres, 2008).

Este valor comparado con el %IM de la cepa (A-34) misma especie *T. harzianum* fue 0.21 veces inferior al obtenido en nuestros resultados. La evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de *Trichoderma spp.* frente a *Fusarium spp.*, se obtuvieron porcentajes de inhibición de crecimiento micelial del patógeno en un 50 y 67 %, estableciéndose una temperatura óptima de inhibición en el rango de 20 a 30°C (Arbitro, 2017).

El tizón del arroz, ocasionado por el hongo *Pyricularia grisea* Sacc, es considerado el causante de la enfermedad fúngica de mayor importancia económica mundialmente y para Cuba, al reducir los rendimientos agrícolas entre un 25 % y 90 %, respectivamente (Manimegalai *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2015). El antagonismo de *T. harzianum*(cepa A-34) sobre *P. grisea* manifestó a las 96 h un porcentaje de inhibición del crecimiento radial del hongo fitopatógeno de 93,1 % y a partir de las 120 h se alcanzó un 100 % de

capacidad antagónica, demostrando el micoparasitismo sobre el agente causal de tizón del arroz.

El mecanismo de acción de competencia a las 48 h muestra al antagonista cubriendo las tres cuartas partes de la placa, lo que evidenció el rápido crecimiento de la cepa A-34 de *T. harzianum* y la reducción del crecimiento hifal de *P. grisea* (Juniors *et al.*, 2017).

La causa de la Fusariosis en el garbanzo, se debe a distintas especies del género *Fusarium* [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.:*Fr. f. spp. Ciceri* (Padwik) Matuo y K. Sato, *Fusarium solani* (Martius) Appel y Wollenweber, Snyder y Hansen y *Fusarium redolens* Wollenweber] (Trapero y Jiménez, 1985).

En Cuba, la identificación de las especies de este hongo se relacionó con la marchitez ascendente causada por *F. oxysporum* y, la descendente, por *F. solani* (Shagarodsky, 2007). El efecto antagónico de 13 cepas de *T. asperellum* evaluadas manifestaron un crecimiento más rápido que los aislamientos del patógeno, cubriendo completamente la colonia del patógeno a las 96 h.

Además, *T. asperellum* esporuló sobre la colonia del patógeno afectando su textura y esporulación, lo que contribuyó a frenar el crecimiento de los aislados de *Fusarium spp.* el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial ratificó el análisis cualitativo donde la mayoría de las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de los aislamientos de *Fusarium spp.* en más de 40 %, respecto a sus controles (Martínez, 2018).

Sclerotium rolfsii Sacc. es un hongo fitopatógeno que causa pudriciones de raíces, tallos, tubérculos y frutos en numerosos cultivos, como son: frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), manzano (*Malus domestica* Borkh.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.) soya (*Glycine max* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.), entre otros (Hernández *et al.*, 2012; Granados, 2005).

Las cepas de *T. asperellum* evaluadas inhibieron, significativamente, el crecimiento del agente fitopatogéno desde las 48 h, en comparación con el testigo, aunque este efecto se observó, más marcado, a las 72 h (Duarte *et al.*, 2017).

Phytophthora capsici y *Colletotrichum gloeosporioides* patógenos foliares del tomate siendo los hongos más dañinos que causan importantes pérdidas de cultivos en México (Blaya *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2013). Las cepas *T. harzianum*, *T. longibranchiatum*, *T. yunnanense* y *T. asperellum* fueron capaces de inhibir ambos fitopatógenos durante la prueba del cultivo dual, pero el efecto más importante fue el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre los micelios de los fitopatógenos.

En cada caso se utilizó el micelio fitopatogéno como fuente de carbono y energía para *Trichoderma spp.*, demostrando el acto micoparasitismo de todas las cepas. El crecimiento de *P. capsici* fue inhibido por *T. harzianum* (22.1 %) y *T. yunnanense* (10.3 %). El resto de las cepas inhibieron menos del 5 %. En el caso del *C. gloeosporioides*, *T. asperellum* y *T. longibranchiatum* mostraron la mayor capacidad de inhibición con valores de 22.5 y 21.9 %, respectivamente, las otras cuatro cepas mostraron porcentajes de inhibición en un rango de 9 a 16 % (De la Cruz *et al.*, 2018).

Los resultados anteriormente descritos comprueban que de acuerdo a los intereses de cada grupo investigativo, se realiza la evaluación del comportamiento de *Trichoderma spp.* en condiciones de laboratorio, siendo similar en cada uno de ellos, a pesar de esto sí existe un resultado común que es demostrando la efectividad del *Trichoderma spp.* para diferentes patógenos.

IV.1 Valoración económica de los resultados obtenidos

Los resultados económicos obtenidos considerando que los medios de cultivo están compuestos por los mismos ingredientes o sea no son diferentes, las cepas son las que difieren de acuerdo con su finalidad, las tres cepas no presentaron diferencias estadísticas en relación al %IM, sin embargo con respecto al índice de crecimiento antagónico, la cepa de mayor efectividad fue A-53, teniendo en cuenta estos

elementos podemos plantear la relación entre los siguientes indicadores desde el punto de vista económico.

Valor de la producción \$ 9.85/ kg

Costo de la producción \$ 5.00/ kg

Ganancia \$ 4.85/ kg

Costo por peso de producción \$ 0.50

Conclusiones.

1. Las potencialidades como controlador biológico de las cepas (A-53), (A-34) y (TS-3), sobre el *Stemphylium lycopersici* son altas para las tres cepas.
2. De las tres cepas (A-53), (A-34) y (TS-3), la (A-53) presento los indicadores más estables por presentar menor variabilidad en los mismos.

Recomendaciones.

1. Es necesario valorar las potencialidades de las cepas de (A-53), (A-34) y (TS-3), en vitro plantas induciéndoles la enfermedad del *Stemphylium lycopersici*, para llevar el tratamiento a nivel de campo.
2. Estudiar detenidamente a la cepa (A-53), para verificar si a nivel de campo mantiene los indicadores más estables en comparación a las otras dos cepas.

Referencias bibliográficas

- Abbas, N., Jugah, B. K., Mehdi, N, E., Farshid, M., Elham, G., Shamima, A., y Hajar, G. (2014). Cultural and physiological characteristics of *Stemphylium lycopersici* causing leaf blight disease on vegetable crops. *Archives of phytopathology and plant protection*. 47(14):1658-65. doi: 10.1080/03235408-2013-853905.
- Ann, J, C., Santos, C, C, D., Federico, G., Pineda, L., y Lopez, L, M, A. (2017). In vitro evaluation of the antagonistic activity of *Trichoderma* sp. against *Fusarium verticillioides*. *International Journal of Agricultural Technology*. 13(7.3): 2539-48.
- Arbitro, M, P, R. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. [Tesis de pregrado]. [Cuenca]: Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. 76 p.
- Blaya, J., Lloret, E., Ros, M., y Pascual, J., (2015). Identification of predictor parameters to determine agroindustrial compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* diseases in muskmelon and pepper seedlings, *J. Sci. Food Agric*. 95 (7) 1482e1490.
- Caballero, Á, M, W., Torres, G, Y., y Maza, E, N. (2016). Aplicación de *Trichoderma harzianum* Rifai en el manejo de enfermedades radiculares en viveros de papaya (Carica papaya Lin.) *Rev. Agricultura Tropical* 2 (2), 39-49, ISSN on line: 2517-9292.
- Carrero, C, I. (2016). Aproximación molecular al antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Verticillium dahliae* para el biocontrol de la Verticilosis en genotipos de *Olea europaea* susceptibles y resistentes al patotipo defoliante. (Tesis doctoral). Universidad de Córdoba. Centro Hispanoluso de investigaciones agrarias.
- Campuzano, S., Laura, U., y Jessica, V. (2017). Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de rhizoctonia solani. *NOVA*, 15(28):45-5.
- Castro, T, Á, M., y Osorio, C, A, R. (2012). *Trichoderma* sp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. *Cenicafé*.

- Chang, Y, C., Baker, R., Kleifeld, O., y Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis*, 70: 145-148.
- De Souza, I.T., Tavares, J, B., Obes, G., Daltrozo, A., y Bittencourt. (2017). Expansion of the biocontrol spectrum of foliar diseases in rice with combinations of rhizobacteria. *Revista Ciência Agronômica*, 48 (3): 513-522.
- De la Cruz, R, D, Q., Roussos, S., Rodríguez, R, H., Hernández, D, C., y Aguilar, N, C. (2018). Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International Journal of Modern Science*, 20:1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>.
- Franco, M, E, E., Vera, B, J., Barcena, A., López, S, M, Y., Medina, R., Pastorino, G, N., et al. (2013). *Stemphylium lycopersici* agente causal de la Mancha Gris de la hoja del tomate en las zonas de producción hortícola de Argentina In: VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología REDBIO. Mar del plata. Argentina: Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. p. 491.
- Gato, C, Y., Pérez, B, Y., Carreras, S, B., Baró, R, Y., Quesada, M, Y., y Ramírez, O, R. (2014). Actividad antagónica de cepas autóctonas de *Trichoderma sp.* frente a fitopatógenos de suelo. *Fitosanidad*, 18(1). 45-48.
- Granados, M, M., (2005). Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. *Agronomía Costarricense*, 29(2): 143-156.
- Guerrero, R. (2016). *Selección y efectividad del uso de aislamientos de Trichoderma spp. para el control del Cancro Bacteriano (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis) del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Ecuador.
- Guigón, C., Guerrero, V., Vargas, F., Carvajal, E., y Ávila, G. (2010). Molecular Identification of *Trichoderma sp.* Strains, in vitro Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28: 87-96.

- Gutiérrez, M, E, M. (2010). Formas de Obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAG. La Habana. Cuba.
- Habu, M., Khairulmazmi, A., y Nusaibah, S, A. (2018). Assessment on *Trichoderma* sp. mixture as a potential biocontrol agent of *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. *Journal of Oil Palm Research*. 10:1-13. doi: <https://doi.org/10-21894/jopr-2018-0035>.
- Handelsman, J., y Stabb, E, V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869.
- Hammer, Ø., Harper, D, A, T., y Ryan, P, D. (2018). Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. PAST [Software]. Version 3.18. Norway: Paleontological Museum, University of Oslo. Palaeontologia Electronica. Available from: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.
- Howell, C, R., y Stipanovic, R, D. (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.
- Harman, G, E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* sp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Hermosa, R., Cardoza, R, E., Rubio, M, B., Gutiérrez, S., y Monte, E. (2014). *Trichoderma*: Their uses and application in bioengineering and biotechnology. In Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. (eds. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Druzhinina I, Upadhyay RS y Tuohy M), Elsevier: Amsterdam, Holanda.
- Hernández, J. S. (2015). *Evaluación del efecto de Trichoderma harzianum en la producción de posturas de Carica papaya L. (papayo) en la CCS Artemio Mastrapa, municipio Holguín*. [Tesis de pregrado]. Universidad de Holguín Oscar Lucero Moya, Holguín, Cuba.

- Hernández, C, A., Quintero, E., y Herrera, L. (2012). Respuesta varietal y pérdidas causadas por el hongo *Sclerotium rolfsii* en frijol común en diferentes épocas de siembra. *Centro Agrícola*. 39(1): 75-78.
- Hernández, O. E., Hernández, C, F, D., Gallegos, M, G., Rodríguez, H, R., y Castillo, R, F. (2011). In vitro behavior of *Trichoderma* sp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research*. 6(19):4594-60.
- Iraima, C, R., y Joksan, F. (2018). Capacidad antagónica in vitro de *Trichoderma* sp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*. 30(1):49-8.
- Jiménez, D, R, M., Melgarejo, P., Bonnaterra, A., Landa, B, B., Monte, E., y Montesinos, E. (2010). Manejo integrado de enfermedades causadas por hongos. En Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos (eds. Jiménez-Díaz RM y Montesinos E), *Phytoma*: Valencia, España.
- Lobaina, E, L. (2014). *Aplicación de campos magnéticos a Trichoderma harzianum sobre soporte sólido.*, [Tesis de pregrado]. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. Cuba.
- Liu, F., Damm, U., Cai, L., y Crous, P., (2013). Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae, *Fungal Divers*. 61 (1) 89-105.
- Lo, C, T., Nelson, E, B., y Harman, G, E. (1996). Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis* 80: 730-741.
- Malmierca, M, G., McCormick, S, P., Cardoza, R, E., Alexander, N, J., Monte, E., y Gutiérrez, S. (2015). Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. *Environ Microbiol* 17: 2628-2646.
- Manimegalai, V., Ambikapathy, V., y Panneerselvam, A. 2011. Antifungal potentiality of some medicinal plant extracts against *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan). *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1 (3): 77- 80.

- Martínez, C, Benedicto., Infante, D., Carballo, W., Duarte, L, Y., y Echevarría, H, A. (2018). Antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislamientos de *Fusarium sp.* procedentes de garbanzo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2), E-ISSN: 2224-4697.
- Martínez, D, I., y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma sp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.*, 28, 1-11.
- Miguez, M, A, G. (2014). *Determinar la eficiencia de Trichoderma harzianum en el control biológico de Bremia lactucae en el cultivo de la lechuga Lactuca sativa.* [Tesis de pregrado]. Universidad técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Montalvo, C, M, A. (2012). Evaluación del efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* para el control de marchitez en mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) en el cantón pillaro, provincia de tungurahua. [Tesis de pregrado]. Escuela superior politécnica de chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Muñoz, J. (2012). Caracterización funcional y molecular de *Trichoderma sp.*, recolectadas en fincas orgánicas de la región sierra del Ecuador. ESPE-USFQ. Quito. Ecuador.
- Neves, M, V., Nascimento, R., Stecca, A., Teles, F., Ferreira, E., Ornelas, C, A., et al. (2010). New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology*. 61:298-0
- Paulitz, T, C. (1990). Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In new directions in biological control: Alternatives for supressing agricultural pests and diseases (eds. Baker RR y Dunn PE), Alan R. Liss: Nueva York, EE.UU. pp. 713-724.
- Pérez, N., González, M, C., Márquez, R., Castro, R, I., y Aguilar, M. (2015). Utilización de haplotipos de *Pyricularia grisea* Sacc. aislados en Cuba para la selección de cultivares de arroz resistentes a la Piriculariosis. *Cultivos Tropicales*, 36 (1): 129-133.
- Pérez, T, E, J., Bernal, C, A., Milanés, V, P., Leiva, M, M., Sierra, R, Y., y Cupull, S, R. (2017). Actividad antagónica de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre el agente

causal del tizón del arroz (*Pyricularia grisea* Sacc.) *Revista Centro Agrícola*. 44(3)
ISSN 2072-2001.

Rodas, F, E, A. (2016). *Evaluación de dos cepas de trichoderma (T. harzianum, T. koningii) como estimulantes del desarrollo radicular de estacas de mora de castilla (Rubus glaucus, Benth)*. (Tesis de Maestría) Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

Ronnie, G, E., y Martínez, C, B. (2018). Antibiosis y efecto de pH-temperatura sobre el antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* frente a *Alternaria solani*. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2). E-ISSN: 2224-4697.

Rueden, C., Dietz, C., Horn, M., Schindelin, J., Northan, B., Berthold, M., et al. (2016). ImageJ Ops [Software]. Version 1.51j8. Wayne, USA: National Institutes of Health. Available from: <http://imagej.net/Ops>.

Sánchez, M, D, R, C. (2016). Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma sp.* para el manejo de hongos causantes de mal del talluelo en tomate (*Solanum lycopersicom L.*). (Tesis de pregrado) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

Sarayasi, S, R. (2012). Control biológico de plagas: Una alternativa a los insecticidas. LEISA, *Revista de Agroecología*, 28(1).

Scarlet, S, S, de P., Maria, L, M, R., Sisne, L., Aliuska, S, P., y Ioan, A, R, S. (2016). Efectividad de *Trichoderma harzianum* sobre la población de nemátodos fitopatógenos en café (*coffea arábica l.*) En condiciones de vivero. *Universidad y Ciencia*, 5, 175-187.

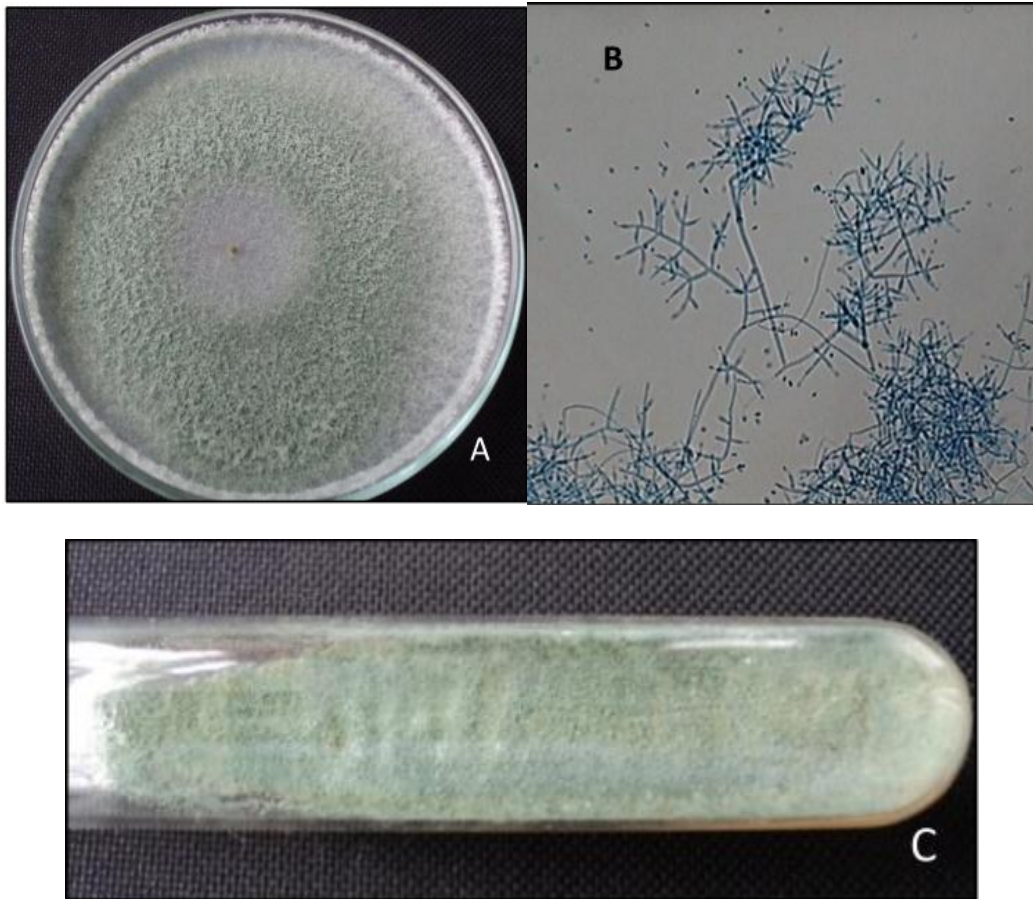
Shagarodsky, T., Morffi, L., Chiang, M, L., Dueñas, M., Vega, M., López, M, R., et al. (2007). Producción de semilla de Garbanzo (*Cicer arietinum L.*). Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT); Unidad de Semilla y Extensión Banao, Sancti Spíritus (INIFAT) y ETIAH, Velasco. Conferencia en Curso de Producción de Semillas, INIFAT. Holguín.

Syngenta. (2018). Manual Técnico en Tomate y Pimiento. Recuperado de <http://www.syngenta.com.ar>

- Tahua, J, D, M. (2016). *Evaluación de Trichoderma harzianum para el control de la pudrición blanca en el cultivo de Allium cepa L. (cebolla de bulbo)*. (Tesis de pregrado) Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.
- Torres, E., Iannaccone, J., y Gomez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia Campinas*. 67(1):169-78.
- Trapero, C, A., y Jiménez, D, R, M. (1985). Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in southern Spain. *Phytopathology*; 75:1146-1151.
- Ugale, S, G, S., Narayan, M., y Sumangala, B. (2015). Functional validation of plant transformation vector with stacked ech42 and bgn from *Trichoderma* in tomato for fungal disease resistance. *Indian J. Genet*, 75, 86-92.
- Vázquez, M, L, L., y Fernández, G, E. (2007). Bases para el manejo agroecológico de plagas en sistemas agrarios urbanos. Habana, Cuba: Editorial CIDISAV. ISBN 978-959-7194-13-2.
- Vinueza, J, M, L. (2014). Respuesta a la aplicación de las cepas de *Trichoderma harzianum* y Micorriza (*Glomus intraradices*) en dos tipos de sustratos en la propagación de patrones de rosa en la zona de San Antonio de Ibarra, provincia de Imbabura. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Babahoyo, Carchi, Ecuador.
- Wolna, A, M., Piechota, T., Niewiadomska, A., Dach, J., Szczech, M., Jędryczka, M., et al. (2017). An assessment of adaptive and antagonistic properties of *Trichoderma* sp. strains in vegetable waste composts. *Archives of Environmental Protection*, 43(4):72-1. doi: 10.1515/aep-2017-0039. 5.

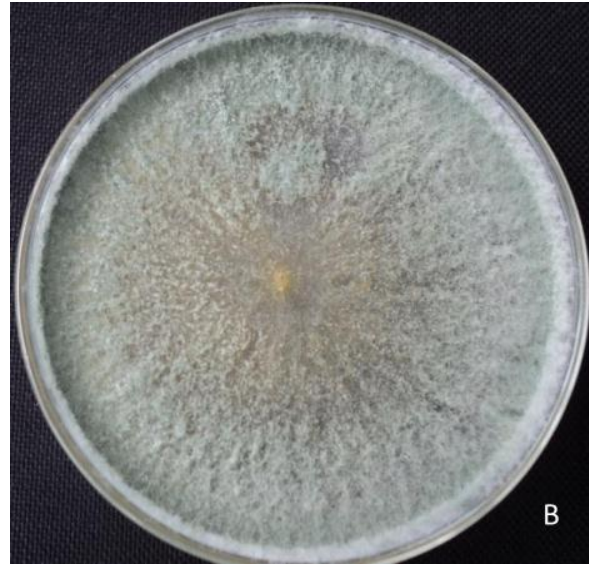
Anexos

Anexo 1



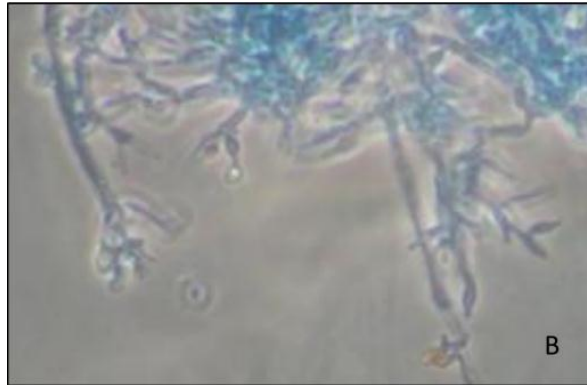
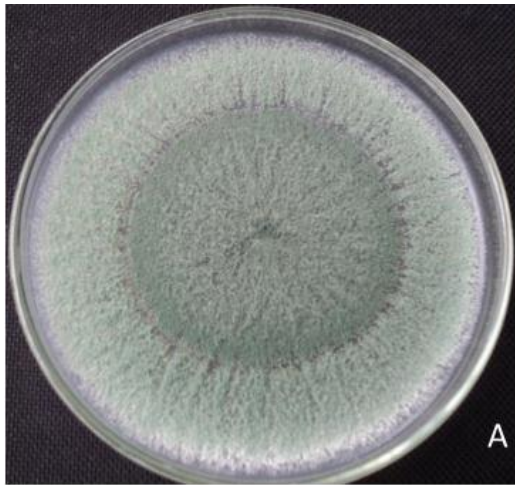
Trichoderma harzianum cepa A-34 A) Fotografía al microscopio estereoscópico [20 X] de una colonia de *T. harzianum* crecida en PDA (3 días). B) Microfotografía al microscopio óptico [400 X] de la tinción con azul algodón y lactofenol en la que se observan el conidióforo típico de esta cepa. C) Tubo de ensayo con cuña de PDA.

Anexo 2



T. harzianum cepa A-53 A) Microfotografía al microscopio óptico [400 X] de la tinción con azul algodón y lactofenol en la que se observan el conidióforo típico de esta cepa. B) Fotografía al microscopio estereoscópico [20 X] de una colonia de *T. harzianum* crecida en PDA (3 días). C) Tubo de ensayo con cuña de PDA.

Anexo 3



T. viride cepa TS-3. A) Fotografía al microscopio estereoscopio [20 X] de una colonia de *T. viride* crecida en PDA (3días). B) Microfotografía al microscopio óptico [400 X] de la tinción con azul algodón y lactofenol en la que se observan conidios y conidióforos. C) Tubo de ensayo con cuña de PDA.

Anexo 4



Primeros síntomas del *S. lycopersici*.

Anexo 5

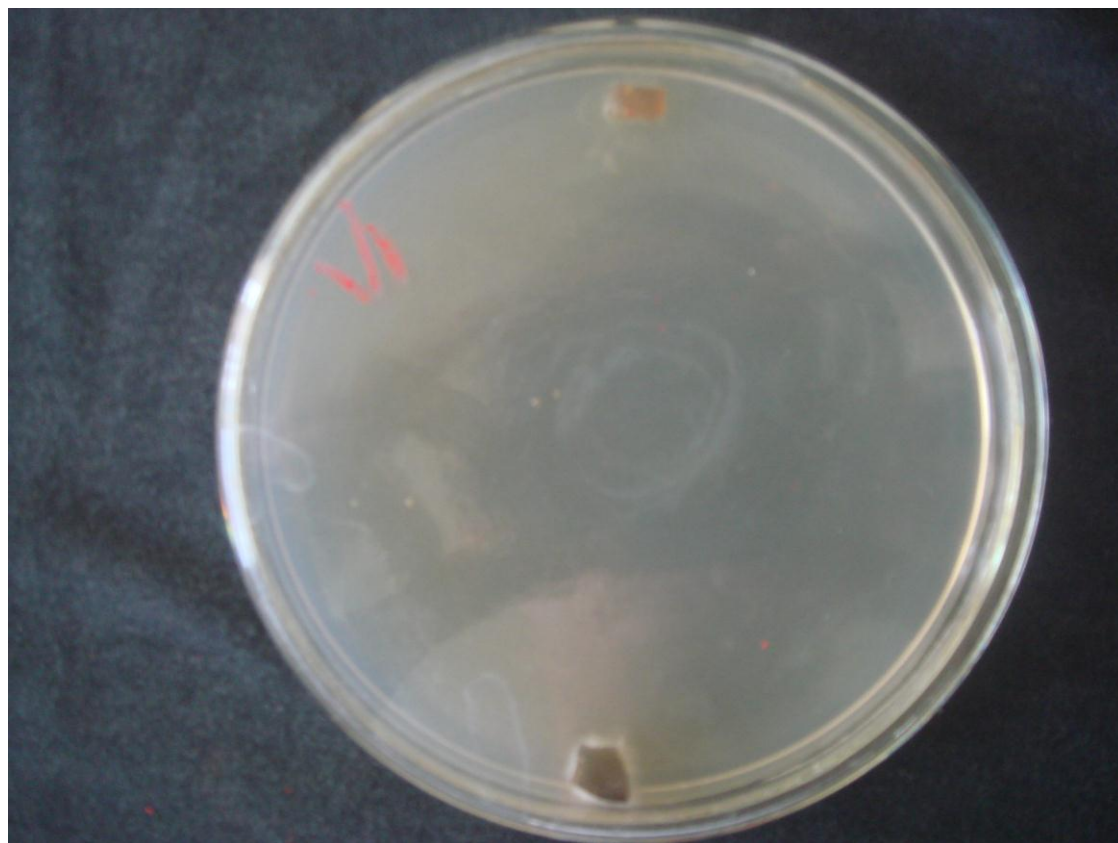


Síntomas avanzados del *S. lycopersici*.

Anexo 6

MINISTERIO DE LA AGRICULTURA	INFORME DEL RESULTADO DE LAS MUESTRAS.	No. ENTRADA: 124-1
LABORATORIO PROVINCIAL DE SANIDAD VEGETAL HOLGUIN		Código:1-5
PROCEDENCIA: Holguín. Mayabe Parcela EPP Holguín Area:0.001ha		
CULTIVO: Tomate var Desquite		
Fecha de Entrada:12/02/18 Hora:8:00 am Fecha de Salida: 13/2/18 Hora:12:00 am		
SINTOMAS: Micología: a)En hojas manchas de color pardo b)En hojas manchas de color pardo con centro grisáceo.		
ESPECIALIDAD: Micología.		
RESULTADO: Micología: En la muestra analizada se detecto a) Corynespora casalicola(Berk et Cur)Wel y en b) Stemphyllum lycopersici (Enjoji) Yamamoto.		
OBSERVACION:		
Firma del Director: Lc. Leandro D. Aguiar	Firma Especialista: Ing. Ania Rodriguez	No. R / Salida -

Anexo 7



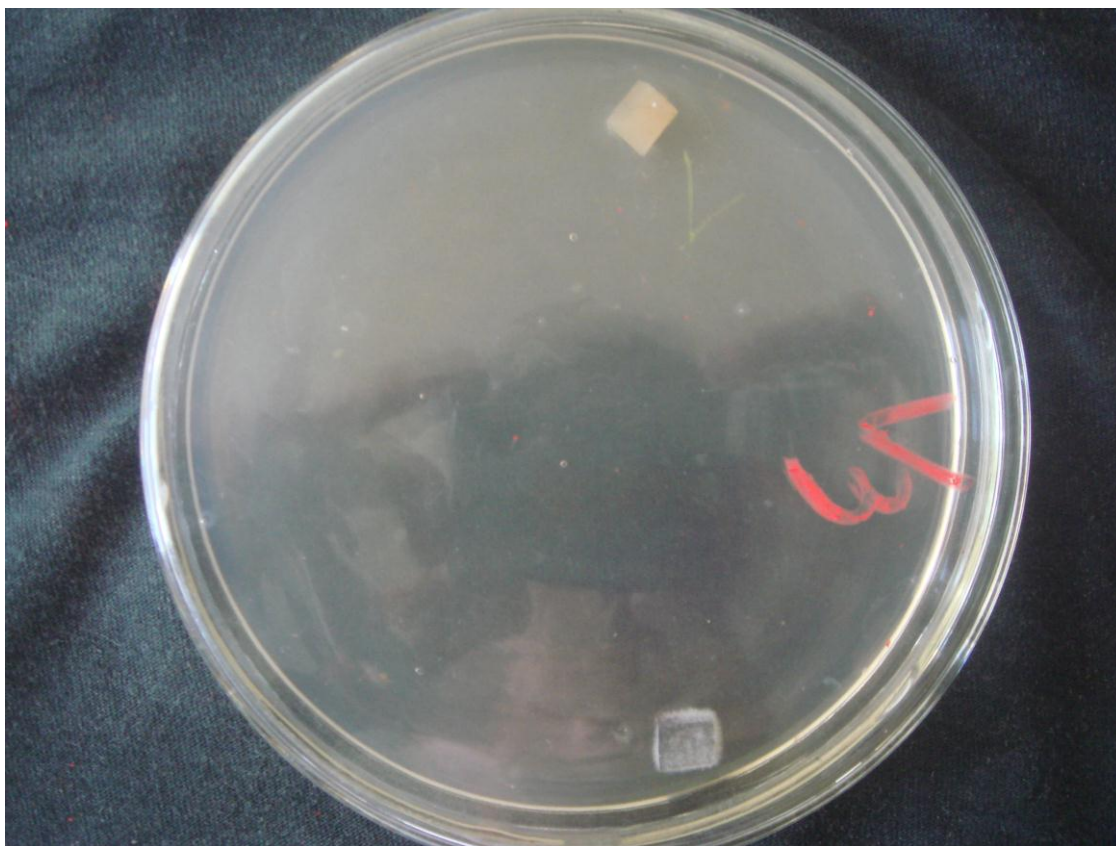
Primeras 24 horas *T. harzianum* cepa A-53 vs *S. licopersici*

Anexo 8



Primeras 24 horas *T. viride* cepa TS-3 vs *S. lycopersici*.

Anexo 9



Primeras 24 horas *T. harzianum* cepa A-34 vs *S. licopersici*.

Anexo 10



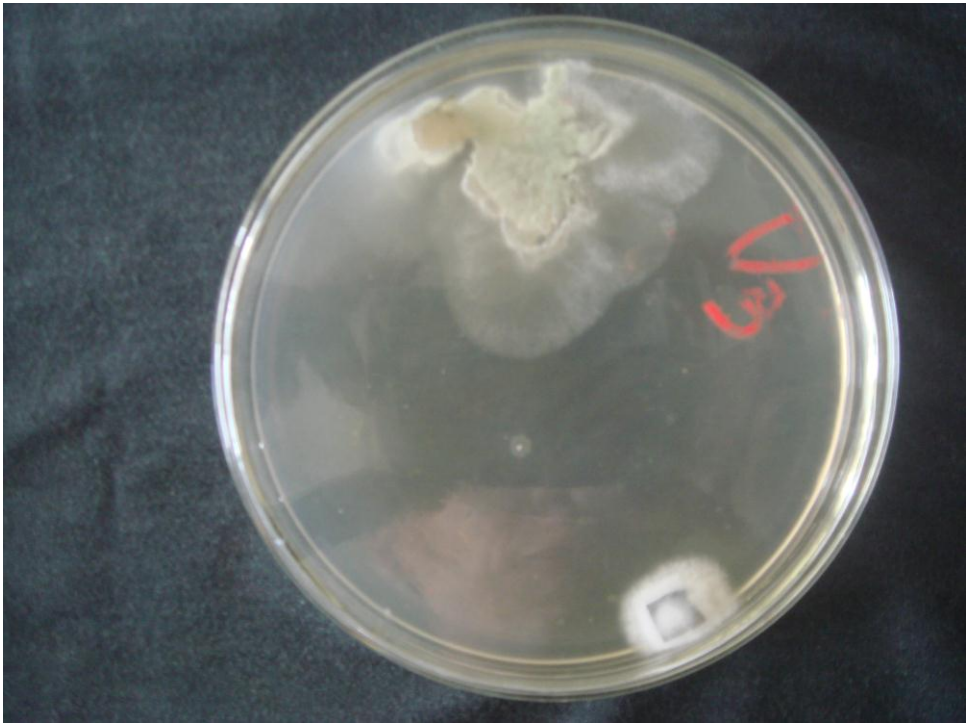
48 horas *T. harzianum* cepa A-53 vs *S. licopersici*.

Anexo 11



48 horas *T. viride* cepa TS-3 vs *S. licopersici*.

Anexo 12



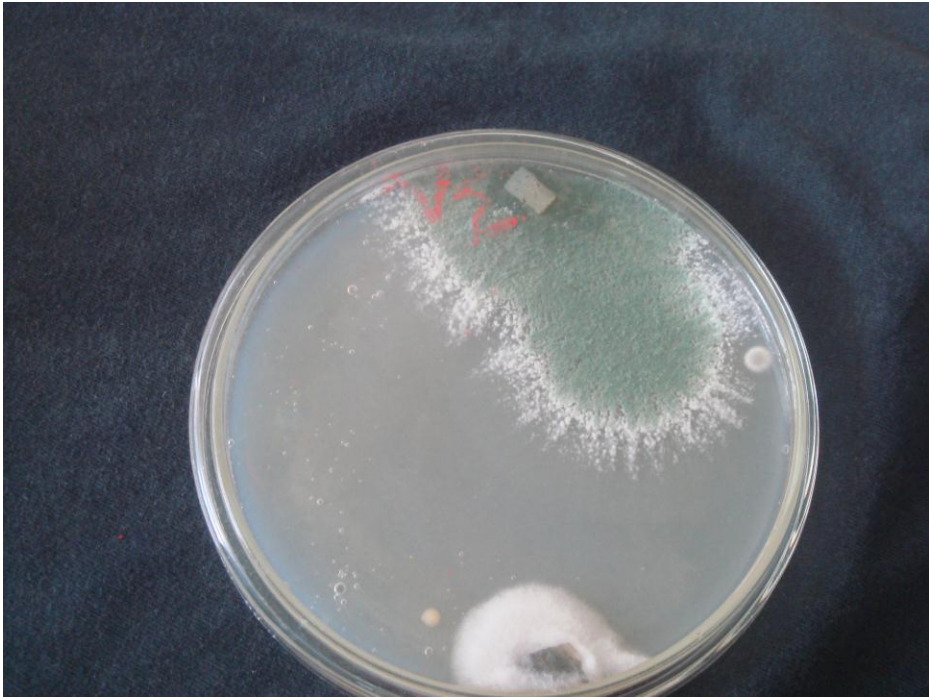
48 horas *T. harzianum* cepa A-34 vs *S. licopersici*.

Anexo 13



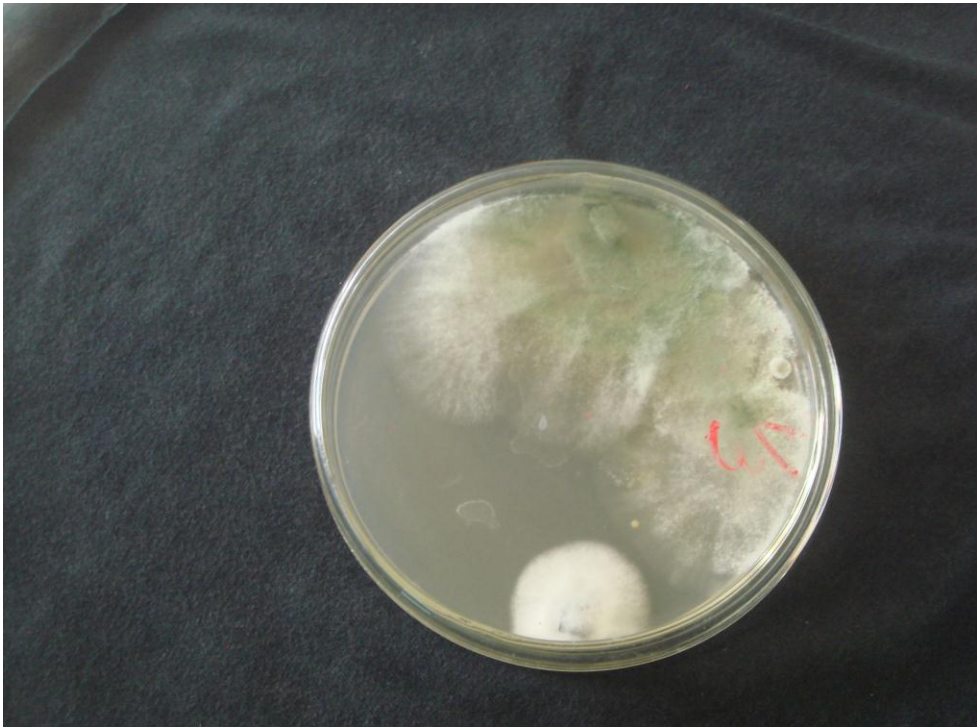
72 horas *T. harzianum* cepa A-53 vs *S. licopersici*.

Anexo 14



72 horas *T. viride* cepa TS-3 vs *S. licopersici*.

Anexo 15



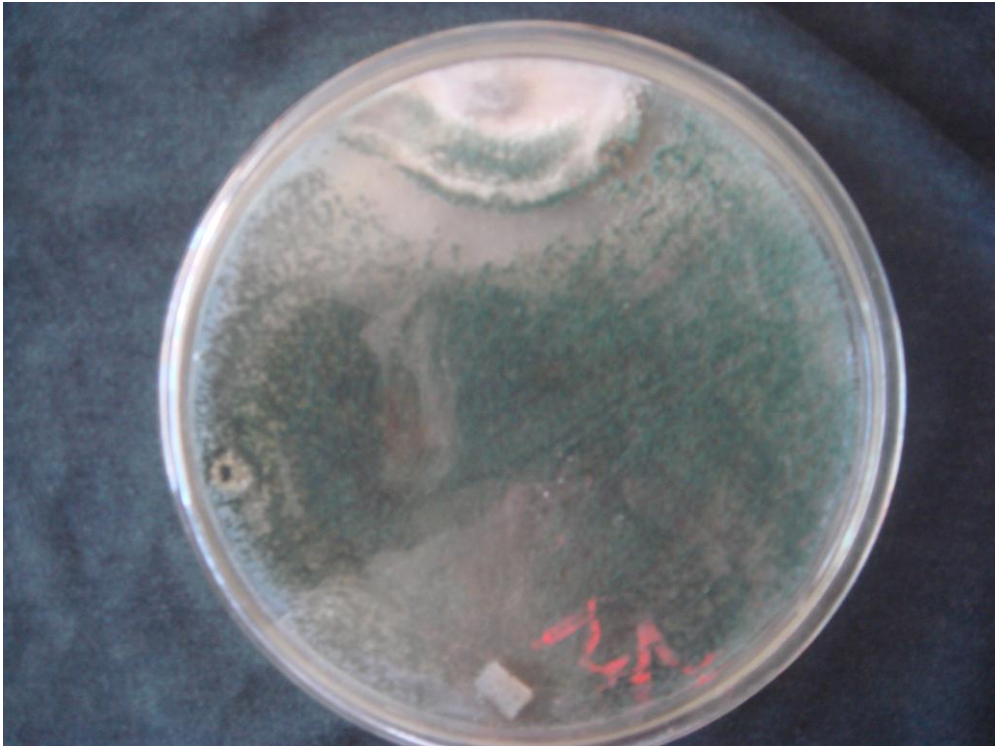
72 horas *T. harzianum* cepa A-34 vs *S. licopersici*.

Anexo 16



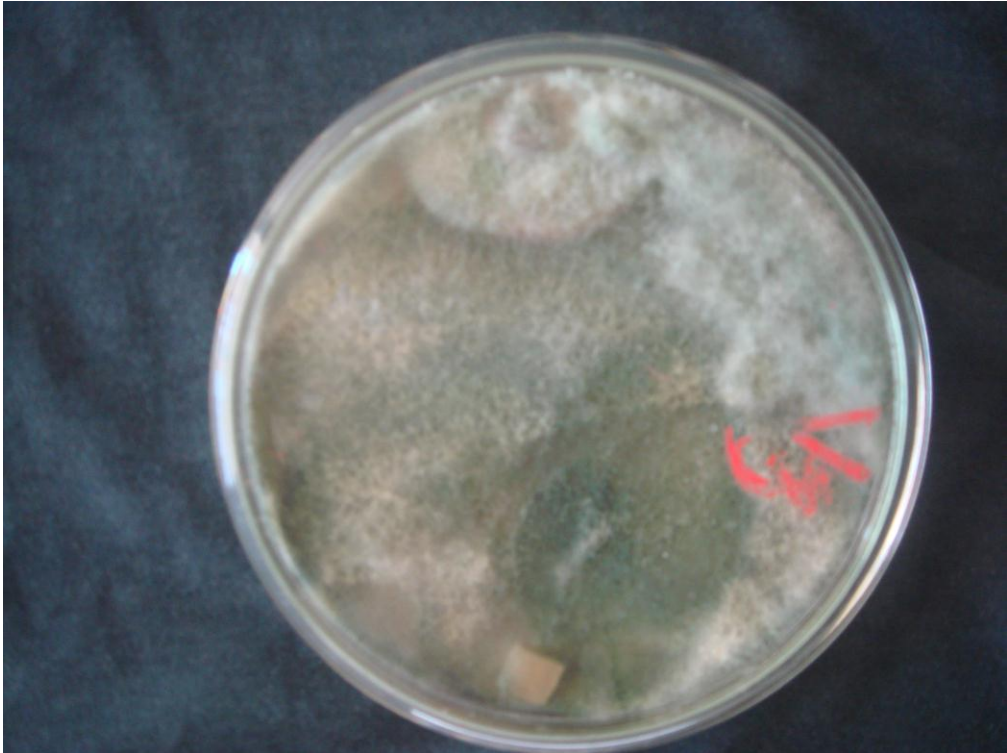
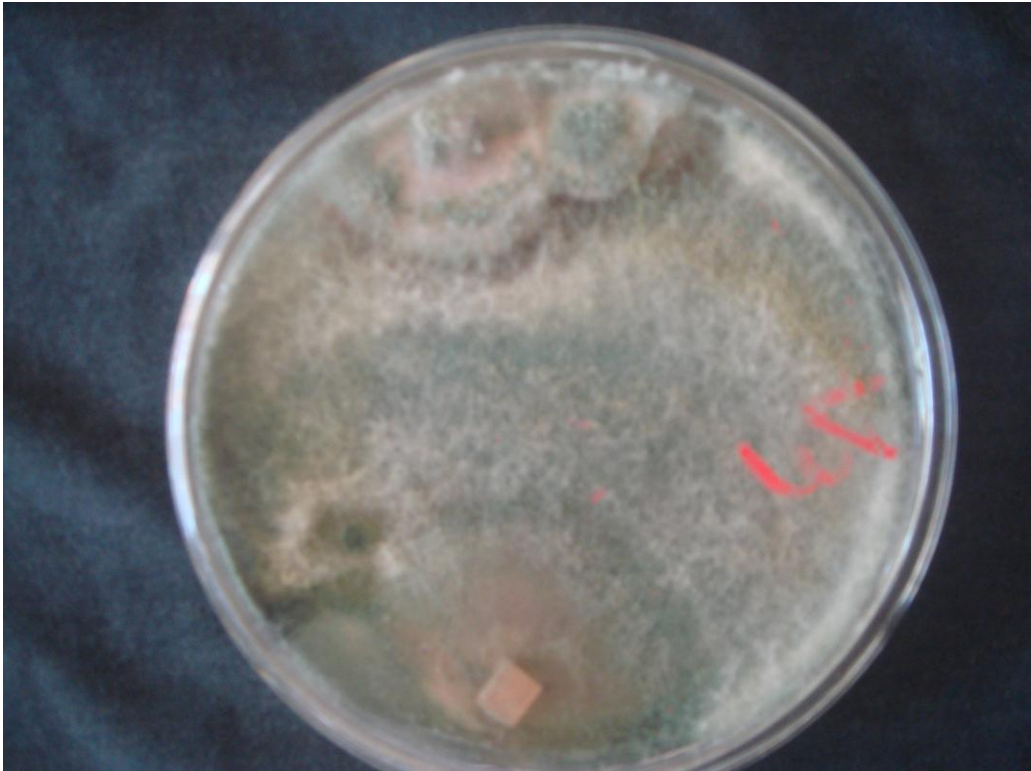
168 horas *T. harzianum* cepa A-53 vs *S. lycopersici*.

Anexo 17



168 horas *T. viride* cepa TS-3 vs *S. lycopersici*.

Anexo 18



168 horas *T. harzianum* cepa A-34 vs *S. lycopersici*.