

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**



**Mecanismos de la Actividad Antagónica de *Trichoderma* spp. Contra
Alternaria alternata (Fr.) Keissler Bajo Condiciones *in vitro*.**

**Por:
OSWALDO VARGAS GONZÁLEZ.**

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Marzo de 2009.

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**Mecanismos de la Actividad Antagónica de *Trichoderma* spp. Contra
Alternaria alternata (Fr.) Keissler Bajo Condiciones *in vitro*.**

PRESENTADA POR:

OSWALDO VARGAS GONZALEZ.

TESIS

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito
parcial para obtener el título de:

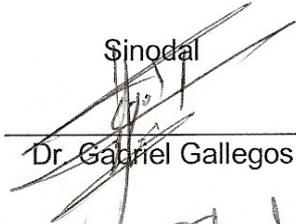
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

APROBADA

Presidente del Jurado


Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Sinodal


Dr. Gabriel Gallegos Morales

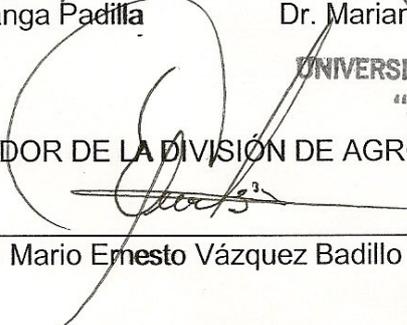
Sinodal


Mc. Angélica María Berlanga Padilla

Sinodal


Dr. Mariano Flores Dávila.

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA


Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Marzo de 2009.

**División de Agronomía
Coordinación.**

Agradecimientos

Agradezco a Dios. Por darme la oportunidad de vivir, darme las fuerzas necesarias para seguir adelante y ser mejor cada día, por guiarme en cada momento de mi vida y ser la luz que ilumina mi camino día a día, dios gracias por regalarme esta vida tan maravillosa en la cual me has permitido realizar uno de muchos sueño.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Por abrir las puertas y haberme dado la oportunidad de formarme como profesional de la cual me siento orgulloso.

AL Dr. FCO. DANIEL HERNADEZ CASTILLO. Por su valiosa contribución y aportaciones en la asesoría y revisión del trabajo y por su apoyo desinteresado.

AL Dr. GABRIEL GALLEGOS MORALES. Por sus conocimientos aportados en la elaboración de este trabajo.

Ing. Eduardo Osorio Hernández. Por brindarme su apoyo y disponibilidad en la asesoría de este trabajo de investigación.

Mc. Ma. Angélica Padilla Berlanga. Por brindarme su apoyo y disponibilidad en la asesoría de este trabajo de investigación.

A GREENCORP BIORGANIKS S. A. de C. V. por que al celebrar convenios de investigación con nuestra universidad me permite complementar nuestra formación de estudiante a través de tesis, permitiendo así graduarme como Ingeniero Agrónomo parasitólogo.

Dedicatoria

A mis padres. Quiero agradecerles lo que ahora soy....

Gracias por darme la vida, por su amor, por las caricias, por el dolor, por las sonrisas por el sufrimiento, por los regaños y por el aliento. Gracias por enseñarme a crecer, a través del sufrimiento, curándome las heridas y consolándome en mis lamentos. Gracias por el ejemplo de la honradez, del entusiasmo y la calidez, por los regaños y desacuerdos, por las verdades y descontentos. Gracias por enseñarme a dar de intensa forma y nada esperar, por los consejos y las caídas por enseñarme como es la vida. Gracias por estar a mi lado en el momento justo y el más anhelado, cuando necesito sentir sus besos y sus abrazos y escuchar un te quiero y escuchar un te amo. Gracias con todo mi corazón, gracias por ser como son, que Dios no pudo escoger de una manera mejor, a mis padres, la pareja que ustedes son.

Olivia González Huerta

Y

Adalberto Vargas Guerrero.

A mis hermanos: Marcos, Librada, Mario y Álvaro Vargas González.

Gracias a ustedes que compartieron mi sueño de ser Ing. Agrónomo Parasitólogo y lo hicieron posible. Gracias hermanos y que dios los bendiga por siempre.

A mi esposa Ramona. Por todo su amor comprensión y paciencia, es maravilloso vivir a tu lado compartiendo dichas y alegrías, problemas, quiero que sepas que a tu lado estaré siempre que me necesites, eres una mujer muy valiosa, te amo por lo que eres y por lo que has traído a mi vida, por que te admiro y respeto, por que cada vez que estamos separados ansío volver a verte.

A mi hija Valeria: Por ser el mas grande motivo de vivir.

A mis sobrinos: Rabanito, Omarcito, Alvarito, France y Vivian.

A mis Primos: Rafael y Chuchín.

A mis tíos: Tía Socorro, Vicente, Pancho y el Toreco.

A mis abuelos: (+) Pedro Guerrero y (+) Eloísa Michel
(+) Jesús González y (+) Barbarita Huerta
Luis Vargas y (+) Librada Guerrero

A mis amigos: Edel Dolores Hernandez Sandoval, José Luis Hernández, Gleyber Che Moo, David Eduardo García, Raúl Ortiz, Everts Vargas, Bernaveu de Cruz, y todos los compañeros de la generación CVI de Parasitología. A mis amigos de San Pedro mpio. de Toliman Jalisco.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS DE APENDICE	v
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	2
Hipótesis	2
REVISION DE LITERATURA.....	3
<i>Alternaria alternata</i>	3
Morfología	3
Síntomas	4
Ciclo de la Enfermedad	4
Métodos de control.....	5
Control Físico	5
Refrigeración	5
Tratamiento con Calor.....	5
Irradiación	5
Control Cultural	6
Control Químico	6
Control Biológico	7
Características de un Antagonista Ideal.....	7
Genero <i>Trichoderma</i> spp	8
Características morfológicas	8
Importancia Económica.....	9
Mecanismo de Acción	9
Antagonismo	10
Micoparasitismo	10
Antibiosis.....	11
Compuestos Volátiles.....	11
MATERIALES Y METODOS	12
Ubicación del Experimento.....	12

Microorganismos Biológicos Evaluados.....	12
Incremento de Microorganismos.....	12
Actividad Antagónica.....	12
Compuestos Volátiles.....	13
Prueba de Antibiosis.....	14
Diseño Experimental.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
Estudio de Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>A. alternata</i>	17
Estudios de Compuestos Volátiles Producidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>A. alternata</i>	18
Estudios de antibiosis Producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>A. alternata</i>	20
CONCLUSIONES.....	23
LITERATURA CITADA.....	24
APÉNDICE.....	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Porcentaje de inhibición de 17 cepas de <i>Trichoderma</i> spp sobre el crecimiento de <i>A. alternata</i> , días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.....	17
2	Porcentaje de inhibición de <i>A. alternata</i> por compuestos volátiles producidos por 17 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	19
3	Porcentaje de inhibición de <i>A. alternata</i> por antibiosis de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Conidios característicos de <i>A. alternata</i>	4
2	Confrontaciones 'in vitro' <i>Trichoderma</i> sp.- <i>A. alternata</i>	13
3	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>A. alternata</i>	13
4	Compuestos volátiles producidos por <i>Trichoderma</i> sp. inhibiendo a <i>A. alternata</i>	14
5	<i>Trichoderma</i> sp. T8 inhibiendo el crecimiento micelial <i>A. alternata</i>	18
6	Cepa de <i>Trichoderma</i> sp. que mostro el menor porcentaje de inhibición sobre <i>A. alternata</i>	18
7	Efecto de inhibición micelial de <i>A. alternata</i> por compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> sp.....	19
8	Testigo crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> sin antagonista.....	19
9	Menor efecto de inhibición micelial de <i>A. alternata</i> producido por <i>Trichoderma</i> sp.....	20
10	Mayor efecto de inhibición micelial de <i>A. alternata</i> por antibiosis producidos <i>Trichoderma</i> sp.....	21
11	Crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> sin antagonista.....	21
12	Menor efecto inhibitorio de crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por antibiosis de <i>Trichoderma</i> sp. T25.....	22

ÍNDICE DE CUADRO DEL APÉNDICE

Cuadro		Página
1A	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por confrontaciones producidos por 17 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	28
2 A	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por confrontaciones producidos por 17 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	28
3 A	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por compuestos volátiles producidos por 17 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	29
4 A	Análisis de varianza porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por compuestos volátiles producidos por 17 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	29
5 A	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por antibiosis por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	30

6 A	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. alternata</i> por antibiosis producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.....	30
-----	---	----

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas son importantes en la alimentación humana debido a la gran cantidad de vitaminas y minerales que aportan en la nutrición. Actualmente, incrementar la producción de frutas y hortalizas es prioridad mundial. Si consideramos los altos contenidos de nutrientes y agua que presentan los productos hortofrutícolas, estos poseen las condiciones adecuadas para que se desarrollen microorganismos que causan serios problemas de pudrición, destacándose los hongos fitopatogenos.

Las pérdidas durante la postcosecha de frutas tienen un gran impacto económico debido a que se acumulan a los costos de producción, de cosecha, transporte y almacenamiento. Según el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo de México, en América Latina estas pérdidas oscilan entre 20 y 50%, dependiendo mucho este valor de la especie, así como del manejo utilizado en la postcosecha. Conociendo los beneficios que brindan para la salud humana el consumo de frutas y hortalizas, es crucial que las mismas lleguen en un estado saludable al consumidor.

La papaya es un fruto de gran importancia internacional, debido a su elevado contenido vitamínico, sin embargo, una de las limitaciones para prolongar su vida de anaquel es la presencia de enfermedades de poscosecha, ocasionadas principalmente por hongos como *Colletrotichum gloeosporioides* (Penz.), Sacc., *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) y *Alternaria alternata* (Snowdor, 1991)). Pantastico (1975) reporta que, a nivel mundial, las perdidas de la fruta de papaya ocasionada por el ataque de hongos oscilan entre 8 y 12% aproximadamente. En México, se carece de información de los daños ocasionados por cada microorganismo en específico, sin embargo, se alcanzan aproximadamente un 33% de la producción total, de ello, las enfermedades contribuyen con un 24% (Bautista y Barrera, 2001). En el caso de la pudrición suave causada por *R. stolonifer* en papaya, Capellini *et al.* (1998), reportan que los daños ocasionados por este hongo alcanzan un 35%. El control de las enfermedades de postcosecha ha sido llevado a cabo principalmente a través de fungicidas; sin embargo, su uso excesivo ha generado problemas de

resistencia, daños a la salud del hombre y severa contaminación del medio ambiente. Una alternativa al control químico es el uso de antagonistas que inhiben el desarrollo de los hongos fitopatógenos; en este sentido se puede mencionar a *Candida sake* en el control de *Botrytis cinerea* y *Rhizopus nigricans* en manzanas y peras (Viñas *et al.*, 1998); además *Pantoea agglomerans* en fruta de pepita y en cítricos (Viñas *et al.*, 1999). El empleo de bacterias como *Cryptococcus laurentii* con bicarbonato de sodio al 2% causó reducciones en las pudriciones de pera de *Penicillium expansum* y *Alternaria alternata* (Yao *et al.*, 2004). El empleo de un formulado de *Trichoderma harzianum* obtuvo éxito contra *R. stolonifer* en manzana, pera, melocotón y fresa, *B. cinerea* en uva, pera, fresa, y kiwi, y *P. expansum* de uva, pera, kiwi, al obtener una reducción de 86.7% en el diámetro de las lesiones (Batta, 2007).

Palabras claves: Mecanismo, Actividad *Trichoderma* spp, *Alternaria alternata*, *in vitro*.

Objetivo

Evaluar el efecto antagonista de 17 cepas de *Trichoderma* spp. y mecanismos de acción sobre *A. alternata* bajo condiciones *in vitro*.

Hipótesis

Al menos una cepa de *Trichoderma* spp. mostrará algún efecto antagonista sobre *A. alternata*.

REVISIÓN DE LITERATUR

Alternaria alternata

Es un hongo presente en todos los continentes, causa la muerte de las plantas, daña al fruto y disminuye el rendimiento; las lesiones en frutos disminuyen su valor comercial. Ataca a tomate, papa, berenjena, zanahoria, papaya entre otros muchos hospederos. Sobrevive de una estación a otra, en el suelo y restos de cultivos (Agrios, 2005).

Morfología

Hongo filamentoso con conidióforos simples, tabicados, en cuyo extremo se forman unos conidios muriformes, de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. Por gemación de la célula apical se genera un nuevo conidio, formándose largas cadenas de 10 o más conidios. Colonias de crecimiento rápido (tres o cuatro días), algodonosa, al principio de color gris, después el centro se oscurece (tonos negros más o menos intensos) pero los bordes siguen siendo grisáceos (Jones *et al.*, 1997).

Los cultivos de *A. alternata* en PDA al principio son blancos, pero se torna a un gris oscuro con bordes blancos a las 48 h. Posteriormente, la colonia se extiende cubriendo la caja petri; la esporulación es abundante, de color casi negro. Los conidioforos son verde olivo y septados. La conidia es ligeramente verde olivo a verde oscuro, usualmente con tres a cinco septas y con una septa longitudinal en la segunda célula (figura 1). La conidia se desarrolla en número de tres a cuatro por cadena (Jones *et al.*, 1997).



Figura 1. Conidias características de *A. alternata*.

Síntomas

Los síntomas en hojas y fruto son característicos de la enfermedad: manchas alargadas café oscuro a negro, con anillos concéntricos. Las áreas afectadas se oscurecen ligeramente hasta llegar a negro. Éste manchado comienza alargándose ligeramente hasta la parte superior de la planta hasta que la planta muere. En el fruto las lesiones son firmes, hundidas y a veces con anillos concéntricos con un denso gris oscuro a verde olivo, sobre estas lesiones se producen abundantes fructificaciones (Jones *et al.*, 1997).

Ciclo de la enfermedad.

Los hongos de la pudrición negra son importantes saprofitos y causan enfermedad en fruto, la infección ocurre cuando las esporas son diseminadas, por aire, sobre la planta o cuando la planta entra en contacto con el suelo infestado y en el fruto cuando este presente una herida penetra por la cutícula o pericarpio. La germinación e infección de esporas se forman con la humedad pero solamente el patógeno puede infectar plantas heridas; penetra por lesiones en la cutícula de la hoja o del fruto. Plantas poco vigorosas o estresadas son más susceptibles; también la falta de nutrientes, aumenta la susceptibilidad (Jones *et al.*, 1997).

Métodos de Control

Control Físico

Refrigeración

Las bajas temperaturas son de los elementos que mejor controlan las enfermedades de postcosecha causada por organismos fungosos. La temperatura es variable según la fruta en que se emplee. Las temperaturas más bajas que ocuparemos será la temperatura más baja que la fruta nos permita (Palou, 2007).

Tratamiento con Calor

El curado o tratamiento de agua caliente es un procedimiento por el cual los frutos se almacenan a altas temperaturas ($> 30^{\circ}\text{C}$) y alta humedad relativa ($>90\%$) durante un periodo de tiempo variable. Los principales factores limitantes son la poca persistencia del tratamiento y el estrecho margen existente entre las temperaturas efectivas y las que causan daño irreversible en la piel de los frutos (Palou, 2007).

Irradiaciones

Las irradiaciones efectivas con radiación ionizante con rayos β (electrones acelerados) o rayos X. El principal problema de estos tratamientos, aparte de lo que resultan caros y poco prácticos (puesto que se requiere de instalaciones especiales), es que las dosis necesarias para el control efectivo pueden resultar tóxicas y manchar los frutos. Además pueden superar la dosis máxima establecida por la legislación para la irradiación de frutas y hortalizas para el consumo en fresco (1kGy) (Palou, 2007).

Control Cultural

Para el control de las enfermedades de postcosecha se dispone de prácticas de manejo cultural con las cuales se pretende reducir las vías de entrada del patógeno a los frutos, reducir los niveles de inóculo del patógeno y lograr condiciones ambientales poco conducentes al desarrollo de la enfermedad. Se debe minimizar la ocurrencia de heridas en los frutos mediante cuidadosas prácticas de cosecha y manipuleo de la fruta en la postcosecha. La reducción de los niveles de inóculo se logra mediante prácticas de sanitización de cajones, cajas de empaque y cámaras de almacenamiento. Las bajas temperaturas de almacenamiento disminuyen la velocidad de desarrollo de las enfermedades. Se deben evitar las horas de mayor temperatura para cosechar, la fruta no debe permanecer expuesta al sol en el campo, sino que rápidamente se debe preenfriar y llevar a cámara para ser conservada en temperaturas y humedad relativa óptimas de modo que se retrase la senescencia del fruto y el desarrollo de podredumbres (Palou, 2007).

Control Químico

El control de enfermedades de postcosecha se ha realizado mediante el uso de fungicidas químicos sintéticos, que se han caracterizado por su eficiencia y rapidez en el control de los patógenos de postcosecha. Algunos de los fungicidas autorizados para el control de enfermedades de postcosecha son: tiabendazol, imazalil, ortofenil-fenol, miclobutanil, procloraz, entre otros.

No obstante, se ha encontrado que diversos fitopatógenos han desarrollado resistencia frente a los mismos (Foster *et al.*, 2007).

Diversos estudios ponen en evidencia y han generado una preocupación con relación a los efectos nocivos que tienen los químicos sintéticos contra la salud humana y los daños que han provocado al medio ambiente.

Control Biológico

El control biológico puede definirse como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que causa una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas (Baker y Cook, 1974).

Hay muchos ejemplos recientes de solicitudes de patentes de microorganismos para el control de enfermedades de postcosecha, la mayoría en los EEUU; por ejemplo: *Pseudomonas cepacia*, *P. syringae*, *Acremonium breve*, *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida oleophila*. En Europa cabe destacar la patente de *Candida sake* en el control de *Botrytis cinerea*, *Rhizopus nigricans* y *Penicillium expansum* en manzana y pera (Viñas *et al.*, 1998) y la de *Pantoea agglomerans* en fruta de pepita y en cítricos (Viñas *et al.*, 1999).

Características de un Antagonista Ideal

A la hora de seleccionar un microorganismo como agente para el control biológico en postcosecha, aparte de estudiar su poder inhibitorio, se han de tener en cuenta muchas otras características (Wilson y Wisniewski, 1989). Estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, poca exigencia en cuanto a requerimientos nutricionales incluido en bajas temperaturas y en almacenamiento bajo condiciones controladas, gran capacidad de crecimiento, efectivo para un gran número de patógenos y para diversas frutas y vegetales, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, facilidad de aplicación.

Todo antagonista en potencia, para ser eficaz contra hongos de postcosecha, debe tener, la habilidad de colonizar y persistir con comodidad a niveles efectivos, ser compatible con otras prácticas, procesos y productos químicos de postcosecha, en algunos casos, en condiciones de atmósfera controlada. Además, el organismo ha de ser producible a gran escala utilizando productos de bajo costo (Viñas *et al.*, 2001).

Género *Trichoderma*

Trichoderma se encuentra en suelos abundantes en materia orgánica, es aeróbico y pueden estar en los suelos con pH neutro hasta ácido. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha permitido su uso en el control biológico. *Trichoderma* spp. Produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. El micoparasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. La competencia por el espacio y los nutrimentos es más favorable, principalmente para los hongos que se desarrollan en la superficie de las hojas antes de efectuar la penetración, no actuando sobre aquellos que penetran rápidamente (Orietta *et al.*, 2001). Pertenece a la subdivisión Deuteromicete que se caracterizan por no poseer, o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Pérez, 2006).

Características Morfológicas

Este hongo crece y se ramifica en hifas que pueden oscilar entre 3 a 12 μm de diámetro, según las condiciones del sitio en donde se esté reproduciendo. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. La esporulación asexual ocurre en conidios, los cuales son unicelulares, de color verde, hialinos, poseen un solo núcleo haploide, son ovoides, generalmente tienen 3 a 6 μm de diámetro y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fialidas. Los conidióforos son erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos; al final del conidióforo los conidios se agrupan en forma de pelota. Los conidios son de distinto tamaño y forma, pueden ser subglobosos y ovoides. Comúnmente forman clamidosporas intercaladas o raramente terminales, las cuales pueden ser azules a verdes.

Importancia Económica

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura es el antagonismo hacia microorganismos patógenos de las plantas, por su capacidad para producir secreciones enzimáticas tóxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en hongos fitopatógenos que habitan el suelo (micoparasitismo), en la degradación de paredes celulares de las hifas de hongos patogénicos (depredación), en la producción de químicos volátiles y antibióticos antifungales que inhiben hongos basidiomicetos (amensalismo), en la colonización directa del hongo por penetración hifal (predación), en la competencia por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido crecimiento. Como mecanismo de acción de *Trichoderma* al ser aplicado a las raíces, forma una capa protectora, haciendo una simbiosis; el hongo se alimenta de los exudados de las raíces y las raíces son protegidas por el hongo y al mismo tiempo reduce o elimina las fuentes de alimento del patógeno. *Trichoderma* actúa como una barrera para prevenir la entrada de patógenos a las raíces. Tienen una acción de hiperparasitismo, que es la acción del microorganismo que parasita a otro organismo de su misma naturaleza, es decir, lo utiliza como alimento y los destruye. Compete por espacio y nutrimentos con los hongos patógenos (Trabanino *et al.*, 2003; Lisboa, 2003).

Mecanismos de Acción

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno (Orietta *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2007).

Antagonismo

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista. Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógenos el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia. El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en la rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

Micoparasitismo

Es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, Beta-1-3-glucanasa y proteasa, que lisan (rompen) las paredes de las hifas, o esclerocios de hongos parasitados (Orietta *et al.*, 2001; Méndez, 2003). *Trichoderma* se ha reportado como hiperparásito de un gran número de hongos fitopatógenos al atacar directamente y producir la lisis de micelio y también de esclerocios de hongos (Correa *et al.*, 2007). Los hongos micoparasíticos fueron clasificados en dos grandes grupos: biotróficos (aquellos que mantienen una relación de equilibrio con el hospedero) y necrotróficos (llamados también destructivos). Las enzimas son un componente de gran importancia en el micoparasitismo. Los mecanismos involucrados en este fenómeno poseen enzimas denominadas constitutivas que forman parte de su morfología y metabolismo, existen otras que son reguladoras en el micoparasitismo. Estas degradan la pared celular del hospedero (Lara *et al.*, 2007).

Antibiosis

Es la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm). La antibiosis se considera como uno de los principales mecanismos de biocontrol que tiene como base la producción de metabolitos tipo antibióticos. La producción de antibióticos confiere a los microorganismos una ventaja selectiva en la competencia por nutrientes y espacio en cualquier nicho ecológico (Méndez, 2003; Lara *et al.*, 2007).

Compuestos Volátiles

Dal Bello *et al.* (1997) mencionan que *Trichoderma* posee mecanismos fungistáticos que impiden el desarrollo de los hongos fitopatógenos, así como la capacidad de especies de *Trichoderma* para sintetizar sustancias volátiles involucradas en el complejo responsable de ese fenómeno. La producción de antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático debilitando al agente patógeno y haciéndolo más sensible a los antibióticos solubles. Algunos antibióticos producidos por *Trichoderma harzianum* son la trichodermina, Isuzukacilina, la alameticina, la dermadina, la penicilina, los trichotecenos, latrichorzianinas, entre otros (Olivier y Germain, 1993 citado por Duran, 2003). El 6-pentil-a-pirona (6PAP) es gas producido por *T. viride* mostró ser primisorio *in vitro* y también *in vivo* en el control de muchos hongos en Nueva Zelanda, entre ellos *Armillaria*, *Botrytis* y *Phytophthora* (Cutler y Hill, 1994), es tóxico a un número de fitopatógenos y ha demostrado ser efectivo en tratamientos tópicos en el control de *Botrytis cinerea* causando pudrición en kiwi bajo condiciones de almacén (Poole y Whitmore, 1997; Poole *et al.* 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, (UAAAN), ubicada en Buenavista a 7 km al Sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila.

Microorganismos biológicos evaluados

Se evaluaron 17 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo, semillas y plantas colectadas en diferentes Estados de México, identificadas y conservadas a 4 °C. El hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* fue aislado de zanahoria con síntomas de la enfermedad y purificado por cultivo monospórico e identificado por claves (Rotem, 1998) y conservadas a 4 °C.

Incremento de Microorganismos

Los microorganismos bajo estudio fueron incrementados en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Se depositó un explante de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* en el medio de cultivo y se incubaron a 28 °C, de igual manera se hizo para el incremento de *A. alternata*.

Actividad antagónica

Se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990), la cual consiste en estudiar cuantitativamente la zona de intersección o traslape entre el hongo antagónico y el fitopatógeno. En cajas petri con PDA se depositó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias fungosas del *A. alternata* y en el otro extremo se colocó un explante de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. Se observó cada 24 h para cuantificar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el fitopatógeno, se midió el crecimiento de

ambas colonias y el diámetro de intersección y/o traslape (figura 2 y 3). En base a lo que se observó en la intersección hongo antagónico-hongo fitopatógeno, se clasificó según la escala propuesta por Bell *et al.*(1982): Clase 1, *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio; clase 2, *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio; clase 3, *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro; clase 4, hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resiste la invasión por *Trichoderma*; Clase 5, sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio.

Trichoderma spp.

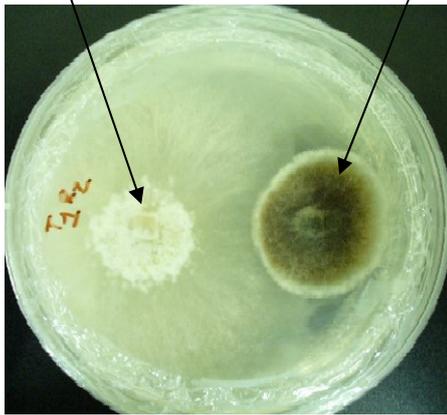


Figura 2. Confrontaciones 'in vitro' *Trichoderma* sp. – *A.alternata*.

A. alternata

Trichoderma spp.

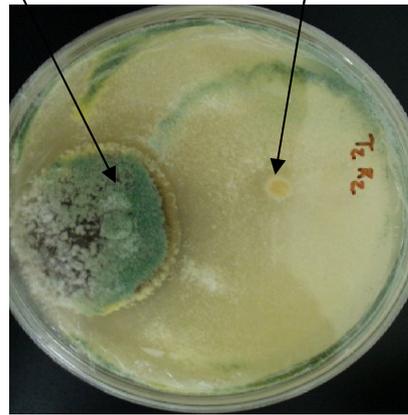


Figura 3. Sobrecrecimiento de *Trichoderma* sp. sobre *A. alternata*.

Compuestos volátiles

En cajas petri con PDA se inocularon, explantes de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* spp, se sellaron con cinta kleen pack se dejó crecer por 2 h, de la misma manera se inocula a *A. alternata* y se retiró la tapa superior de la caja petri, con un sacabocados de 1.5 cm de diámetro se perforó la caja petri con inóculo de *Trichoderma* se unen las cajas, se sellan con cinta kleen pack dejando en la parte de abajo los explantes del fitopatógeno por 12 h, con la finalidad de que se adhiera el micelio al medio de cultivo posteriormente se voltea las cajas dejando

la parte superior al fitopatógeno, de esta manera los gases que produzcan los tratamientos de *Trichoderma* pasen a través del orificio (figura 4). Los tratamientos se mantuvieron en observación hasta que el testigo del fitopatógeno cubrió la caja Petri con medio de cultivo, y se midió el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno, en cm. Los datos se transformaron a porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, considerando el crecimiento del Testigo como el 100%.

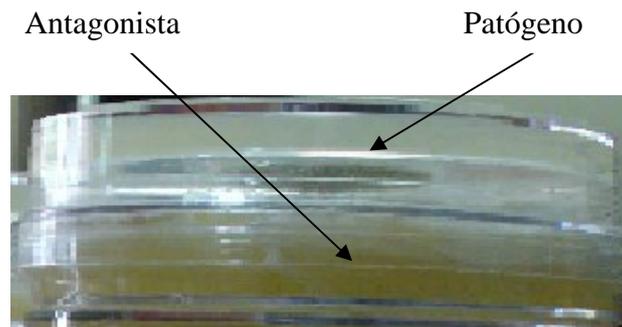


Figura 4. Compuestos volátiles producidos por *Trichoderma* sp. inhibiendo a *A. alternata*.

Prueba de antibiosis.

Para la obtención de sustancias tóxicas de *Trichoderma* se utilizaron matraces de Erlenmeyer (250 mL) previamente esterilizados, con medio de cultivo líquido, a base de papa fresca-dextrosa. Los matraces con 150 mL de medio, se inocularon con tres explantes de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* de cultivos de cinco días de crecimiento, enseguida fueron puestas en agitación a 100 rpm (modelo Incubator Saker C25) durante 12 días. Pasado este tiempo, el líquido se filtró dos veces con bomba de vacío y papel wattman no. 44; enseguida se filtró en el filtro milipor de 0.22 μm para obtener un líquido estéril con los metabolitos de las cepas de *Trichoderma*. Posteriormente el extracto obtenido se refrigeró a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Para la evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma* sobre *A. alternata* se utilizaron cajas petri con medio PDA a las que se les agregó 200 μL del filtrado de *Trichoderma* y se distribuyó perfectamente con una varilla bacteriológica, enseguida en el centro de la caja petri se inoculó el explante de 5 mm de *A. alternata*, enseguida se incubó a 28 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ durante 8 días, transcurrido este tiempo se realizó la evaluación. El porcentaje de inhibición se registró a los 8 días después de la aplicación.

Diseño Experimental

Para determinar el nivel de antagonismo, compuestos volátiles y metabolitos secundarios de las cepas de *Trichoderma* sobre *Alternaria alternata* se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 17 tratamientos (cepas de *Trichoderma*) y cuatro repeticiones. Se utilizó la prueba de medias DMS al 0.05% de significancia. Para ello se analizó con el programa estadístico SAS versión 8 (Online Doc, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *A. alternata*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *A. alternata* se observó que el porcentaje de inhibición de desarrollo micelial del fitopatógeno varió de 0 en el testigo a 37 % en la cepa de *Trichoderma* T8 (cuadro 1) (figura 5 y 6). El análisis de varianza (cuadro 2 del apéndice), detectó diferencia altamente significativa en los tratamientos; la prueba de medias (DMS al 0.05) indica que la cepa de *Trichoderma* que mejor inhiben el crecimiento micelial de *A. alternata*, son la T8, T14, T3, T1, T19, T23 las que son estadísticamente iguales entre si. Estudios contra otros fitopatógenos muestran que algunas cepas de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* en comparación con el testigo (Correa *et al.*, 2007).

Los días a contacto entre *Trichoderma* y *A. alternata* se presentó a los dos días para todos los tratamientos (cuadro 1). De acuerdo a la clasificación de Bell *et al.* (1982), Podemos ubicar a nuestras cepas en las siguientes escalas; 16 cepas de *Trichoderma* se ubicaron en la escala 1, donde el antagonista sobrecrece el micelio del fitopatógeno y cubrió toda la superficie del medio de cultivo y 1 cepa de *Trichoderma* se ubica en la escala 2, donde *Trichoderma* cubrió las tres cuartas partes de la superficie del medio de cultivo.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de 17 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *A. alternata*, días al primer contacto entre microorganismos y clases de antagonismo.

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Porcentaje de inhibición	de 1.	Días contacto	a Clase ²
8	37.00	A	2	1
14	35.50	AB	2	1
3	34.50	ABC	2	1
1	34.00	ABCD	2	1
19	32.00	ABCD	2	2
23	32.00	ABCDE	2	1
18	31.50	BCDE	2	1
30	30.25	BCDE	2	1
17	30.11	CDE	2	1
24	30.00	CDE	2	1
31	30.00	CDE	2	1
25	30.00	CDE	2	1
15	29.50	CDE	2	1
10	29.00	DE	2	1
4	29.00	DE	2	1
16	29.00	DE	2	1
2	27.00	E	2	1
Testigo	0.00	F	2	1

¹. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

². Clase de antagonismo según la escala de Bell *et al.* (1982).

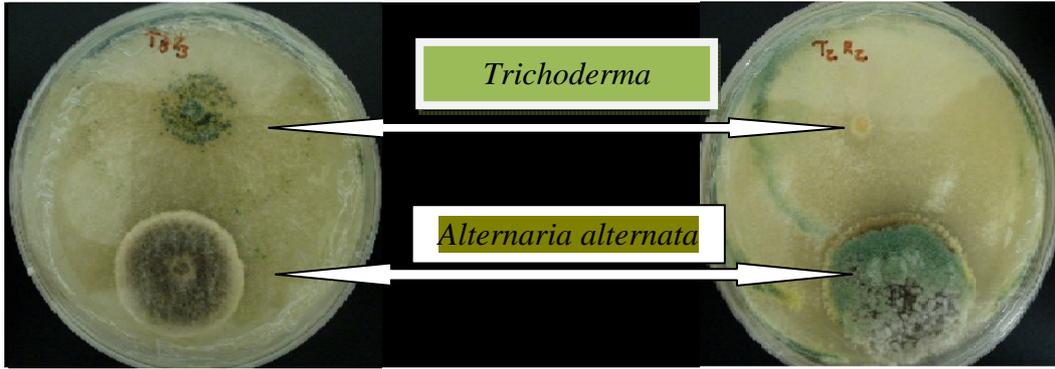


Figura 5. *Trichoderma* ps.T8 inhibiendo el crecimiento micelial *A. alternata*

Figura 6. Cepa de *Trichoderma* sp. que mostró el menor porcentaje de inhibición sobre *A. alternata*.

Estudios de Compuestos Volátiles Producidos por *Trichoderma* spp. Sobre *A. alternata*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por compuestos volátiles de *Trichoderma* varió de 0 en el testigo a 28.22% en la cepa de *Trichoderma* T23 (cuadro 2). El análisis de varianza (cuadro 4 del apéndice) detecto diferencia altamente significativa entre los tratamientos. La pruebas de medias (DMS al 0.05) indica que la cepa T23 de *Trichoderma* estadísticamente inhibe en mayor proporción el crecimiento micelial (cuadro 2) siguiéndose las cepas: T19, T24, T8 T1, T10 siendo estadísticamente similares entre si. Los tratamientos T4, T25, T2, T16, T31, T17, T3, T18, T15, T14 mostraron el nivel más bajo de porcentaje de inhibición y no existe diferencia significativa entre si. Es importante señalar que todas cepas estudiadas inhiben en mayor o menor proporción el crecimiento del fitopatógeno (figura 7, 8 y 9), lo que indica que todas las cepas de *Trichoderma* spp. producen compuestos volátiles con actividad antagonista. *T. harzianum* produce un metabolito volátil identificado como alquil pirona, es capaz de inhibir *in vitro* a muchos hongos, entre ellos a *R. solani* (Fravel, 1988). Los trabajos realizados por Ramos – Hernández (2008) se encuentra que el porcentaje de inhibición micelial de *Furarium oxysporum* por compuestos volátiles varia de 1.12 a 65.17% *in vitro*.

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición de *A. alternata* por compuestos volátiles producidos por 17 cepas de *Trichoderma* a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Cepas <i>Trichoderma</i>	de Porcentaje de inhibición	de ¹ .
23	28.22	A
19	23.55	B
24	22.35	BC
8	21.55	BCD
1	21.33	BCD
10	20.27	BCDE
30	19.73	CDEF
4	19.16	CDEFG
25	19.16	CDEFG
2	19.16	CDEFG
16	18.72	CDEFG
3	18.20	DEFG
17	17.44	EFG
31	16.86	EFG
18	16.52	FG
15	16.34	FG
14	16.16	G
TESTIGO	0.00	H

¹. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.



Figura 7. Efecto de inhibición micelial de *A. alternata* por compuestos volátiles de *Trichoderma* sp.



Figura 8. Testigo, crecimiento micelial de *A. alternata* sin antagonista.



Figura 9. Menor efecto de inhibición micelial de *A. alternata* producido por *Trichoderma* sp.

Estudios de antibiosis producidos por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *A. alternata*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por antibiosis de *Trichoderma* varió de 0 en el Testigo a 55.92% en la cepa de *Trichoderma* T16 (cuadro 3, figura 10). El análisis estadístico (cuadro 6 del apéndice) indica que las cepas de *Trichoderma* estudiadas inhiben el crecimiento micelial de *A. alternata*. Los mejores resultados se obtienen en las cepas T16 y T14 las que son estadísticamente similares entre si (figura 10). Los extractos obtenidos de las cepas de *Trichoderma* T32 y T25 (figuras 11 y 12) no mostraron actividad antagónica. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Osorio y Hernández (2008), quienes evaluaron las mismas cepas de *Trichoderma* spp. pero con *Phytophthora cinnamomi* y obtuvieron una actividad inhibitoria variable de crecimiento micelial, el mejor resultado es obtenido con la cepa de *Trichoderma* T2 alcanzando 52% de inhibición micelial. Mientras que con *A. alternata* el mejor resultado T16 con 55.92% de inhibición.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de *A. alternata* por antibiosis producidos por 14 cepas de *Trichoderma* spp. a los ocho días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Cepas <i>Trichoderma</i>	de Porcentaje de inhibición	de ¹
16	55.92	A
14	50.21	AB
31	48.14	BC
8	47.14	BC
1	47.62	BC
30	44.51	BC
18	44.51	BC
10	43.47	BC
3	42.71	C
17	41.40	C
15	31.35	D
4	29.52	D
2	6.33	E
25	0.00	E
TESTIGO	0.00	E

¹. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.



Figura 10. Mayor efecto de inhibición micelial de *A. alternata* por antibiosis producidos por T16 *Trichoderma* sp.



Figura11. Crecimiento micelial de *A. alternata* sin antagonista.

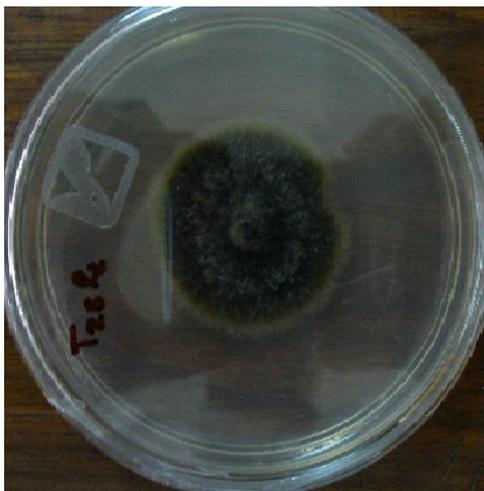


Figura 12. Menor efecto inhibitorio de crecimiento micelial de *A. alternata* por antibiosis de *Trichoderma* sp. T25.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se concluye lo siguiente:

Todas las cepas de *Trichoderma* sp. estudiadas demuestran actividad antagonica sobre *Alternaria alternata*.

Los mecanismos de la actividad antagonica de las 17 cepas estudiadas es variable; pueden ser por competencia, producción de compuestos volátiles y antibiosis.

Las cepas de *Trichoderma* que mejor inhiben el crecimiento micelial de *A. alternata* por confrontaciones son: T8, T14, T3 y T1.

Las cepas de *Trichoderma* que mejor inhiben el crecimiento micelial de *A. alternata* por compuestos volátiles son: T23, T19, T24 y T8.

Las cepas de *Trichoderma* que mejor inhiben el crecimiento micelial de *A. alternata* por antibiosis son: T16, T14, T31 y T8.

Las cepas de *Trichoderma* T8 y T14 mostraron los más altos porcentajes de inhibición de crecimiento micelial en confrontaciones, compuestos volátiles y antibiosis.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. México. 838p.
- Batta, Y. 2007. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. Postharvest Biology and Technology 43: 143- 150
- Baker, R. and Cook, R. 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman. San Francisco USA, 433 p.
- Bautista, B.S. y Barrera, N.L. L 2001. Tecnologías empleadas en el control de las enfermedades postcosecha de los productos hortofrutícolas. Biotica 1:111-120.
- Capelline, R. A, Ceponis., M.J. and Lightner, G.W. 1998. Disorders in apricot and papaya shipments to the New York market 1972-1985. Plant Disease 72:366-368.
- Bell, D.K., Well, H.D. and Markham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:79-82.
- Correa, S., Mello M., Ávila-Zila R., Minaré-Braúna L., Pàdua, R. R., Gómez D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. SACC. FITOSANIDAD vol. 11, no. 1.
- Cutler, H.G. y R.A. Hill. 1994. Natural fungicides and other delivery systems as alternative to synthetics. In: Wilson, C.L., M.E. Wisniewski (eds.) Biological control of postharvest diseases. Theory and practice. pp. 135-152. Keameysville, W. V. U.S. Department of Agriculture. U.S.A.
- Dal Bello, G. M., Mónaco C. I., y Chávez A. R. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. Rev. Iberoam Micol 14: 131-134.
- De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín N. L. 515 p.
- Durán, P. E., Robles M. F., Martínez, T. J., Brito, A. M. 2003. *Trichoderma* un hongo combatiente de patógenos. Revista Técnico Ambiental 92:20-27.

- Foster, H., Driever, G.F., Thomposon, D.C. and Adaskaveg, J. E. 2007. Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the Reduced-risk fungicides fludioxonil and fenhexamamil. *Plant Disease* 91:209-215.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the Biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopatology*. 26:75-91.
- Jones J.B., J.P. Jones, R.E. Stall y T.A. Zitter.1997. Compendium of tomatoes diseases. The America Phytopathological Society. 73 p.
- Lisboa-Minguzzi, M. A. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en vid (*Vitis vinífera*). Tesis de licenciatura. Universidad de Talca Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía. Chile. 35 p.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the Biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopatology*. 26:75-91.
- Neergaard P. 1997. Seed Pathology. pp 202-209.
- Orrieta, F., Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *International Microbiology* 62:96-100.
- Pantastico E. B. 1975. Postharvest physiology, handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables. AVI Publishing Co. Inc. Westport Connecticut. 560 p.
- Palou L. 2007. Evaluación de alternativas para el tratamiento antifungico en poschosecha de cítricos de producción integrada. *Revista Especial*. pp. 82-93.
- Poole, P.R. y K.J. Whitmore. 1997. Effects of tropical postharvest application of 6-pentyl-2-pyrone on properties of stored kiwifruit. *Postharvest Biology y Technology*. 12:229-237.
- Poole, P.R., Ward, B.G. y Whitaker, G. 1998. The effects of tropical tratament with 6-pentyl-2-pyrone and structural analogues on stem and postharvest rots in kiwifruit due to *Botrytis cinerea*. *Journal of the Science of Food y Agriculture*. 77:81-86.
- Rotem, B.J. 1998. The Genus *Alternaria* Biology, epidemiology, and Pathogenicity. Minnesota. 4326 p.

- Snowdon, A. L. 1991. Acolour Atlas of Postharvest Diseases Disorders of Fruits Vegetables. Vol. 1 Fruits CRC Press London. 302 p.
- Viñas I., J. Usall; N. Telxido; M. Abadias; Abadias; R. Torres y E. Fons. 2001. Control Biológico de Mohos en Postcosecha de Frutas. Preservación de calidad. Pp. 90 – 100.
- Vivekananthan, R., Saravakumar, D., Kumar, N., Prakasam, V., and Sarayappan, R. 2004. Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection* 23:1061-1067.
- Yao, H., Tians, S. and Wang, Y. 2004. Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food microbiology* 93: 297-304.

APÉNDICE

Cuadro 1A. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por confrontaciones producidos por 17 cepas de *Trichoderma* spp. a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
1	36.00	38.00	30.00	32.00
2	30.00	26.00	26.00	26.00
3	36.00	36.00	36.00	30.00
4	30.00	26.00	30.00	30.00
8	38.00	40.00	34.00	38.00
10	32.00	30.00	26.00	28.00
14	32.00	34.00	36.00	40.00
15	34.00	28.00	30.00	26.00
16	30.00	30.00	28.00	28.00
17	26.96	29.52	31.99	31.99
18	24.00	38.00	36.00	28.00
19	28.00	24.00	42.00	36.00
23	38.00	36.00	28.00	26.00
24	32.00	24.00	32.00	32.00
25	30.00	30.00	28.00	32.00
30	31.01	29.52	29.48	31.01
31	30.00	36.00	26.00	28.00
32	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 2A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por confrontaciones producidos por 17 cepas de *Trichoderma* spp. a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

FUENTE	DF	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	17	4142.78924	243.693485	17.17	<.0001
ERROR	54	766.6202	14.19667		
TOTAL	71	4909.40944			

C. V.= 12.77549

Cuadro 3A. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por compuestos volátiles producidos por 17 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos	Repetición			
	RI	RII	RIII	RIV
1	19.27	22.02	24.32	19.73
2	17.44	15.14	22.02	22.02
3	15.14	19.73	19.73	18.20
4	19.4	18.71	19.40	14.11
8	24.32	19.73	23.17	18.96
10	23.17	18.01	20.15	19.73
14	15.14	16.16	15.14	18.20
15	16.29	16.5	17.44	15.14
16	19.40	21.95	19.40	14.11
17	15.14	19.73	15.14	19.73
18	16.19	15.00	15.15	19.73
19	19.73	22.02	23.55	28.90
23	26.61	28.22	28.90	29.15
24	17.44	17.44	26.61	26.61
25	17.44	22.02	19.73	17.43
30	19.73	19.73	19.73	19.73
31	19.73	15.14	17.44	15.14
TESTIGO	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 4A. Análisis de varianza porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por compuestos volátiles producidos por 17 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

FUENTE	DF	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	17	2063.193	121.364	19.28	0.0001
ERROR	54	339.910	6.294		
TOTAL	71	2403.104			

C. V. = 13.505

Cuadro 5A. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por antibiosis producidos por 14 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			
	R1	R2	R3	R4
1	48.14	46.06	48.14	48.14
2	19.91	2.49	0.40	2.49
3	35.69	43.99	43.01	48.14
4	23.24	27.39	33.84	33.61
8	52.29	58.51	43.99	37.76
10	37.76	50.21	43.99	41.91
14	41.91	58.51	50.21	50.21
15	33.39	37.24	27.39	27.39
16	54.36	58.51	58.51	52.29
17	43.99	35.69	37.76	48.14
18	43.99	43.99	43.99	46.06
25	0.00	0.00	0.00	0.00
30	46.06	39.84	43.99	48.14
31	48.14	52.29	46.06	46.06
TESTIGO	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 6A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata* por antibiosis producidos por 14 cepas de *Trichoderma* a los 8 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

FUENTE	DF	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	14	19345.5952	1381.82823	54.35	<0.0001
ERROR	45	1144.16237	25.42583		
TOTAL	59	20489.7576			

C. V. =14.16916

