

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**



**Actividad Antifúngica *in Vitro* de Aislamientos de *Trichoderma* spp.
sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum***

POR:

LUIS FERNANDO PANTOJA GUERRA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Abril de 2009**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

**DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**Actividad Antifúngica *in Vitro* de Aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre
Sclerotium cepivorum y *Sclerotinia sclerotiorum***

PRESENTADA POR:

LUIS FERNANDO PANTOJA GUERRA

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito
Parcial para Obtener el Titulo de:

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

Aprobada por:

Presidente del Jurado

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Vocal

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Vocal

M.C. Faustino Lara Victoriano

Suplente

Dr. Mariano Flores Dávila

COORDINADOR DE LA DIVISION DE AGRONOMIA "ANTONIO NARRO"

Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Abril de 2009

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
División de Agronomía
Coordinación.



AGRADECIMIENTOS

A Dios padre, por haberme prestado la vida y por no dejarme solo en aquellos momentos en donde todo parecía terminar. “Gracias señor por fortalecerme y por la maravillosa familia que me regalaste, además por haberme dado licencia de terminar mi carrera y así tener esta bonita profesión en mi vida”.

A Mi Alma Terra Mater, por brindarme todas las condiciones necesarias para mi formación como profesional, por abrigarme en su lecho y por ser la mejor universidad del mundo. “*Y de Aquí para Adelante, Buitres Buitres al Ataque*”.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo, por haberme dado su confianza y apoyo para realizar este trabajo, además por sus consejos y palabras de aliento en el salón de clases y durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por su gran apoyo y colaboración en esta investigación, por su amistad y por sus enseñanzas mostradas en el salón de clases y fuera de el.

Al M.C. Faustino Lara Victoriano, por el apoyo mostrado en la realización de este trabajo, además por su dedicación y esfuerzo para la revisión de este.

Al Dr. Mariano Flores Dávila, por brindarme su apoyo y disponibilidad en la asesoría de este trabajo de investigación.

A M^a. Cristina Sánchez Flores, por su amistad y confianza, además por todo ese apoyo que me brindo y que fue fundamental para la realización de este trabajo. Ojala que nunca cambies y que sigas apoyando a los compañeros que vienen.

A Silvia Ovalle Nava. Por todo el apoyo que me brindo al realizar este trabajo y por su confianza y amistad.

A todos mis Maestros, los cuales fueron la pieza fundamental para la obtención de conocimientos en el transcurso de mi carrera.

A Todos mis Amigos, que me brindaron su amistad desde que llegue a la universidad y hasta la actualidad: el Comonfort, Juan López Cruz, el talibán, Ángel, Sergio Ayala, José Luis Mendoza, el camarón, el chelo, marro, el Acapulco, tito, pepillo, chullillo, la K-lu, el Shima, chope y todos los demás.

A mis Compañeros de la Generación CVI, por su amistad y apoyo en todo el transcurso de la carrera.

A GREENCORP BIORGANIKS S. A. de C. V. por su disponibilidad y apoyo, porque al celebrar convenios de investigación con nuestra universidad nos permite completar nuestra formación de estudiante a través de tesis. Es una empresa dedicada a la investigación y aportaciones para el campo agrícola nacional y mundial.

DEDICATORIAS

A MI MADRE, Sra. GUADALUPE GUERRA GUERRA

A ti madre santa que me diste la vida, lo cual no se compara con nada en el mundo, porque nunca se me va a olvidar que aun sabiendo que podrías fallecer al nacer yo, no te importo. Gracias por tus oraciones, por tus bendiciones, por tus consejos tan sabios y por todo el amor de madre que has sabido brindar, no solo a mi sino a mi padre y hermanos, por algo llevas el nombre de mi virgencita de Guadalupe. Gracias madre mía, aunque ni en toda la vida podría pagarte lo que has hecho por nosotros, créeme que siempre voy a estar "orgulloso de ser tu hijo" que dios te bendiga.

A MI PADRE Sr. FRANCISCO PANTOJA GONZALES

Este logro es mas tuyo que mío, por ser un luchador incansable y un padre ejemplar, por todos esos consejos tan sabios que has sabido darme y por todo ese esfuerzo que has hecho para que tus hijos salgan adelante, ni con todo el oro del mundo podría pagarte lo que has hecho por mi y toda la familia, solo le pido a dios que sepa recompensarte y pagarte por todo, estoy orgulloso y doy gracias a dios por ser tu hijo. Y como dijieran los Invasores "*me refiero a ti mi querido padre que siempre tu mano me das con firmeza, ya en tu cabellera la nieve reflejas tu mirada es triste pero siempre es buena*" que dios te bendiga.

CON MUCHO AMOR Y CARIÑO A MIS HERMANOS:

Francisco Javier (+) porque a pesar de todo, yo se que siempre has estado conmigo, cuando camino tu estas a mi lado, en todo lo que hago siempre estas conmigo. Hermano por siempre vivirás en mi corazón, toda la familia te recuerda con amor y nunca te olvidaremos. Que dios te tenga en su santa gloria.

Maricela
Hilaria
Guadalupe
Maria
Maria Yesenia
Ernesto
Oscar Manuel

Hermanos esto no lo hubiera logrado sin ustedes, gracias por formar parte de mi vida y por todos los momentos malos y buenos que hemos pasado juntos, dios los bendiga y pague todo lo que han hecho por mi y la virgen de Guadalupe los proteja siempre en todo lo que hagan y en donde quiera que estén.

A MI TIA SANJUANA GUERRA

Por el apoyo incondicional, cariño y consejos hacia la familia. Porque a pesar de que estas lejos nunca te has olvidado de nosotros. Que dios la bendiga y le de fuerzas para seguir adelante.

A MI CUÑADO RICARDO GONZALES

Por ser una persona honesta, seria y trabajadora, además por saber ser un buen padre y esposo. Que dios te de fortaleza y te premie por todo esto.

A MIS SOBRINOS: FERNANDITA, DANI Y RICARDITO

Quien mas?, si no son ustedes los que han venido a dar alegría a esta familia, les deseo que dios les ilumine el camino de la vida que apenas empieza para ustedes y que los guie por el camino correcto para que sean personas de bien. Que dios los cuide y bendiga siempre.

A MIS ABUELITAS Y ABUELITOS:

María Dolores Guerra Alvarado (+)

Hilaria Gonzales Rodríguez (+)

Nicolás Pantoja Loza (+)

Simeón Guerra (+)

A MI NOVIA SUSI, por todo el amor que me ha demostrado, por su paciencia y apoyo. Mija independientemente de que llegemos a formalizar algo, te deseo todo lo mejor del mundo a ti y a tu familia. Te quiero mucho.

INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
INDICE DE CUADROS -----	iii
INDICE DE CUADROS DEL APENDICE -----	iv
INDICE DE FIGURAS -----	v
INTRODUCCION -----	1
REVISION DE LITERATURA -----	4
<i>Sclerotium cepivorum</i> -----	4
Importancia Economica-----	4
Etiología-----	5
Sintomatología-----	5
Epidemiologia-----	6
Control-----	7
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	8
Importancia Económica-----	8
Etiología-----	8
Sintomatología-----	8
Epidemiologia-----	9
Control-----	10
Genero <i>Trichoderma</i> -----	10
Importancia Económica-----	10
Morfología-----	11
Hábitat-----	11
Mecanismos de acción-----	12
Antagonismo-----	12
Compuestos Volátiles-----	13
Antibiosis-----	13
Micoparasitismo-----	14
Control Biológico-----	14
Control Biológico de Hongos Fitopatogenos-----	15

MATERIALES Y METODOS -----	16
Ubicación del Experimento-----	16
Obtención del Material Biológico-----	16
Incremento de Microorganismos-----	16
Actividad Antagónica en Cultivos Duales-----	17
Actividad Antagónica por Producción de Compuestos Volátiles--	18
Actividad Antagónica Mediante Incorporación de Filtrado de <i>Trichoderma</i> -----	19
Diseño Experimental-----	20
RESULTADOS Y DISCUSION -----	21
Estudios de la Actividad Antagónica en Cultivos Duales de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	21
Estudios de la Actividad Antagónica por la Producción de Compuestos Volátiles Producidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	24
Estudios de la Actividad Antagonica Mediante la Incorporación del Filtrado de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el Crecimiento de <i>Sclerotium</i> <i>cepivorum</i> -----	25
Estudios de la Actividad Antagónica en Cultivos Duales de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	27
Estudios de la Actividad Antagónica por la Produccion de Compuestos Volátiles Producidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	30
Estudios de la Actividad Antagonica Mediante la Incorporación del Filtrado de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i> -----	31
CONCLUSIONES -----	33
LITERATURA CITADA -----	34
APENDICE -----	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pagina
1.	Temperaturas tomadas en cinco días dentro del laboratorio donde se realizaron los bioensayos de antagonismo y compuestos volátiles-----	18
2.	Días al primer contacto entre los microorganismos y clases de antagonismo en las que se ubico el crecimiento micelial 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>S. cepivorum</i> -----	22
3.	Porcentaje de inhibición de <i>Sclerotium cepivorum</i> por extractos de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 4 días después de la siembra en medio de cultivo PDA -----	26
4.	Días al primer contacto entre los microorganismos y clases de antagonismo en las que se ubico el crecimiento micelial 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> -----	28
5.	Porcentaje de inhibición de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por extractos de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 3 días después de la siembra en medio de cultivo PDA -----	32

INDICE DE CUADROS DEL APENDICE

Cuadro		Pagina
1A.	Ubicación en la escala de Bell <i>et al</i> (1982) de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Sclerotium cepivorum</i> , a los 13 días después de la siembra en medio de cultivo PDA-----	40
2A.	Porcentaje de inhibición en centímetros de <i>Sclerotium cepivorum</i> por compuestos volátiles producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 5 días después de la siembra en medio de cultivo PDA-----	41
3A.	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	41
4A.	Porcentaje de inhibición en centímetros de <i>Sclerotium cepivorum</i> por extractos de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 4 días después de la siembra en medio de cultivo PDA-----	42
5A.	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de extractos producidos de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> ----	42
6A.	Ubicación en la escala de Bell <i>et al</i> (1982) de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , a los 13 días después de la siembra en medio de cultivo PDA-----	43
7A.	Porcentaje de inhibición en centímetros de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por compuestos volátiles producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 4 días después de la siembra en medio de cultivo PDA-----	44
8A.	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	44
9A.	Porcentaje de inhibición en centímetros de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por extractos de 14 cepas de <i>Trichoderma</i> a los 3 días después de la siembra en medio de cultivo PDA-----	45
10A.	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de extractos producidos por 14 cepas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	45

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Momento del contacto entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotium cepivorum</i>	23
2. Escala 1 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	23
3. Escala 2 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>S. cepivorum</i> -----	23
4. Escala 3 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	23
5. Escala 4 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	23
6. Cajas Petri inoculadas con el antagonista y el fitopatógeno en el ensayo de compuestos volátiles-----	25
7. Resultado nulo en la producción de compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	25
8. Máximo efecto de inhibición de extractos obtenidos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	26
9. Mínimo efecto de inhibición de extractos obtenidos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotium cepivorum</i> -----	26
10. Momento del contacto entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	29
11. Escala 4 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	29
12. Escala 2 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	29
13. Escala 1 de la clasificación de Bell <i>et al</i> (1982) entre <i>Trichoderma</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	29
14. Resultado nulo en la producción de compuestos volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	30

15.	Máximo efecto de inhibición de extractos obtenidos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	32
16.	Mínimo efecto de inhibición de extractos obtenidos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> -----	32

INTRODUCCION

La agricultura es una de las actividades económicas más importantes en los países desarrollados. Sin embargo esta se ve afectada por diferentes problemas, dentro de los cuales se encuentran los daños ocasionados por insectos y enfermedades.

Existen algunos hongos que viven en el suelo que tienen la capacidad de sobrevivir en materia orgánica muerta pero cuando es alterado su hábitat puede sobrevivir parasitando a las plantas ocasionando severos daños hasta llevarlo a la muerte. Dentro de estos hongos se encuentra *Sclerotium cepivorum* el cual se considera como la enfermedad más peligrosa e importante en el cultivo del ajo y cebolla. Los daños que causa se encuentran extendidos y generalizados en todos los países donde se cultivan plantas del género *Allium* (García, 1998), siendo capaz de destruir las raíces, los discos de la base de las vainas foliares y los bulbos en proceso de crecimiento (Messiaen, *et al.*, 1995).

Otro hongo de suma importancia es *Sclerotinia sclerotiorum* que produce pérdidas devastadoras en numerosas plantas suculentas. Las enfermedades por *Sclerotinia sclerotiorum* se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo afectando a las plantas en cualquiera de las etapas de su desarrollo, incluyendo plántulas, plantas maduras y órganos cosechados durante su transporte y almacenamiento. Entre los cultivos atacados por este hongo se encuentran el girasol, lechuga, col, zanahoria, frijol, calabaza entre otros.

Durante mucho tiempo se han utilizado agroquímicos para el control de plagas y patógenos de plantas, los cuales han logrado el control de estos y estabilización de los cultivos. Sin embargo, la utilización de estos productos ha provocado serios problemas ecológicos; es conocido que los plaguicidas saturan las tierras cultivables, se infiltran y contaminan los mantos acuíferos naturales modificando así los

ecosistemas.

Como consecuencia a esta problemática se introducido el uso de la agricultura orgánica; (que se caracteriza por excluir el uso de productos de síntesis química) organismos modificados genéticamente, aguas negras y radiaciones en los alimentos (Ramos, 2008).

Existen métodos biológicos no destructivos y afines al medio ambiente para el control biológico de plagas y parásitos de plantas. Estos métodos involucran, entre otros, la acción de hongos filamentosos cuyo hábitat natural es el suelo. Dichos microorganismos cuentan con características fisiológicas particulares que les permiten imponerse frente a organismos parásitos de plantas. Ejemplo de estas es el hongo del género *Trichoderma*; este hongo produce diversas enzimas hidrolíticas y moléculas con actividad antibiótica que le permite controlar biológicamente la actividad de los hongos parásitos de plantas.

El género *Trichoderma* posee grandes cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros. Los mecanismos por los que las cepas del genero *Trichoderma* desplazan al fitopatogeno son fundamentalmente de tres tipos: competencia directa por espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sea de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatogenos (Ezziyyani *et al.*,2004; Casimiro *et al.*,2005; García, 2008).

Objetivos.

- 1.- Estudiar la capacidad antagónica de 14 cepas de *Trichoderma* spp contra *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*
- 2.- Determinar los mecanismos de acción de 14 cepas de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum* *in Vitro*.

Hipótesis.

- 1.- Al menos uno de los aislados de *Trichoderma* spp. tendrá actividad antagónica sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*
- 2.- El mecanismo de acción de *Trichoderma* contra *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum* será por antagonismo y compuestos volátiles.

Palabras clave: Inhibición, antagonismo, Control biológico, *Trichoderma*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia esclerotiorum*

REVISION DE LITERATURA

Un gran numero de plantas son susceptibles a hongos de suelo causándoles podredumbres radiculares (Llacer *et al.*,1996). La necesidad de reducir el uso de fungicidas químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado paso a la práctica del biocontrol. En efecto, la demanda impuesta por la sustentabilidad esta conduciendo al uso de estrategias que mantengan una protección del medio ambiente. En este contexto, el uso de inoculos microbianos, incluyendo algunos que han sido modificados genéticamente, esta cobrando nuevamente interés. Los microorganismos mas usados pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, etc. (Sid *et al.*, 2000; Aguilar, 2006).

Los mecanismos por los que los microorganismos afectan a las poblaciones de patógenos no siempre son claros, pero en general se atribuyen a uno de cuatro efectos.

1. Parasitismo directo y muerte del patógeno.
2. Competencia con el patógeno por el alimento.
3. Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista y
4. El efecto toxico indirecto sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista (Aguilar, 2006).

Sclerotium cepivorum

Importancia Económica

Esta especie descrita en Inglaterra por Berkeley (1841) es actualmente conocida en Europa, Australia, África, Argentina, Brasil, varios estados de la Unión Americana y México; es responsable de la “Pudrición blanca” de la cebolla, ajo,

puerro y algunas especies de cebolla silvestre. En México a sido reportado en Guanajuato afectando severamente el cultivo del ajo (Romero, 1993).

La pudrición blanca ocasionada por *S. cepivorum* Berk. causa pérdidas económicas importantes en las principales áreas productoras de cebolla (*Allium cepa* L.) y ajo (*A. sativum* L.) en México y en el mundo (Pérez *et al.*, 1994).

Por su parte Anaya *et al.* (1999) menciona que hasta 1975 la enfermedad causada por *S. cepivorum* era desconocida en muchas zonas y a partir de entonces se ha ido diseminando, actualmente, se encuentra en una amplia zona del bajío, sobretodo en los terrenos que se han sembrado frecuentemente con ajo. La enfermedad puede causar la perdida total y como los esclerocios tienen larga longevidad, un terreno con alta infestación no se puede volver a usar para el cultivo de ajo y cebolla. Desde 1984 se iniciaron esfuerzos por hacer un control integrado y posteriormente se publicaron las diferentes practicas que a nivel comercial se mostraban prometedoras (Laborde, 1986).

Etiología

Sclerotium cepivorum produce un micelio abundante de color blanco, veloso y ramificado que forma numerosos esclerocios pero comúnmente es estéril, es decir, no produce esporas. *S. cepivorum* en ocasiones produce también conidios en esporodoquios; sin embargo, todo parece indicar que esos conidios son estériles (Agrios, 2006).

Sintomatología

Las plantas enfermas se hacen notar por el amarillamiento y caída de las hojas, empezando a dañar las de abajo. Una característica de esta enfermedad es el modelo de infección: las plantas enfermas se hallan esparcidas en el campo y su numero depende de la cantidad de inoculo. Para el tiempo en que ocurre la clorosis

del follaje, si se arranca una planta podrá observarse que las raíces, el bulbo y la base de las hojas ya se encuentran podridos y cubiertos por un micelio blanco, de donde se origino el nombre de “podrición blanca”; también se podrá observar que las escamas tienen un color negro, lo cual se debe a que el micelio de inmediato procede a formar esclerocios, pequeños, esféricos y justamente de color negro. La pudrición del bulo es suave y acuosa (Romero, 1993).

Agrios (2006) reporta que el hongo ataca directamente a los tejidos. Sin embargo produce una masa abundante de micelio que mata y desintegra a dichos tejidos al secretar ácido oxálico, así como también enzimas pectinolíticas, celulolíticas y otras encimas antes de que penetre en el hospedante. Una vez que se ha establecido en las plantas, el hongo avanza y forma micelio y esclerocios con gran rapidez, especialmente cuando hay suficiente humedad y la temperatura adecuada.

Epidemiologia

El hongo sobrevive en el suelo por un tiempo muy largo, algunos fitopatologos opinan que de 8 a 10 años, quizás porque los esclerocios pueden permanecer en estado de dormancia y germinar cuando encuentran humedad y hospedantes apropiados. Su diseminación depende del agua de riego y de plántulas que se mueven de un lugar a otro. Hasta donde se sabe no hay reproducción sexual y, por consiguiente, tampoco diseminación por el viento. La enfermedad es mas severa en suelo frio y ligeramente húmedo, pero la humedad es menos importante que la temperatura. En medio de cultivo *S. cepivorum* crece bien a temperaturas de 4 a 29°C, aunque para infectar requiere de 10 a 24°C, con una optima de 15 a 18°C (Romero, 1993).

Agrios (2006) reporta que al parecer, el patógeno crece, sobrevive y ataca a las plantas con mayor frecuencia cerca de la superficie del suelo, quizá debido a que a ese nivel las temperaturas son mas favorables, a que hay mayor abastecimiento de

substancias orgánicas que el hongo utiliza para alimentarse y quizá a que hay una menor competencia o antagonismo con otros organismos del suelo.

Control

El control de esta enfermedad es difícil y depende en parte de la rotación de cultivos con maíz y trigo, que al parecer no son afectados por el patógeno, y en parte de las practicas agrícolas que comprenden desde el barbecho profundo de la tierra, hasta el enterramiento de los esclerocios del hongo con los restos vegetales, aplicación de fertilizantes que contengan amonio y de la aplicación de compuestos de calcio y, en algunos casos, de la aplicación de fungicidas como el pentacloronitrobenceno (PCNB), captafol y dicloran antes de realizar la siembra o bien en los surcos durante la siembra (Agrios, 2006).

Por otro lado, Agrios (2005) menciona que es prometedor en el control biológico de la enfermedad causadas por *S. cepivorum* principalmente por el uso de especies parasitas y antagonistas como el hongo *Trichoderma*, de algunas bacterias tipo *Pseudomonas* y algunas especies de *Streptomyces*, para tratar las semillas u otros órganos de propagación vegetativa de los cultivos sembrados en suelos infestados por *Sclerotium*.

Por su parte Aguilar (2006) menciona que de los fungicidas actuales en el mercado, ninguno a dado resultados satisfactorios para el control de *S. cepivorum* , siendo el control biológico hoy en día una alternativa del control químico, que además de su elevado costo, trae como consecuencia el desarrollo de resistencia en los fitopatogenos, y problemas de contaminación y toxicidad (Aguilar, 2006).

También hay evidencias importantes de una grave contaminación derivada de los plaguicidas, que no solo afecta a la flora y a la fauna que se han expuesto en forma significativa a dichas sustancias, sino también han contribuido al deterioro en

la calidad del aire, agua, suelos y alimentos, así como también en la salud de jornaleros y consumidores (Albert, 2004).

Sclerotinia sclerotiorum

Importancia Económica

Esta especie fue descrita por Libert en 1837 con el nombre de *Peziza sclerotiorum*. Entre sus hospedantes se encuentran plantas de ornato, arbustos, malezas y principalmente hortalizas, como lechuga, col, zanahoria, frijol, alcachofa, esparrago, brócoli, rábano, papa, calabaza, sandía, etc. La enfermedad que esta especie de hongo causa se conoce con varios nombres, según el hospedante afectado; así se habla de moho blanco del frijol, pudrición suave de la zanahoria, caída de la lechuga, pudrición del tallo del esparrago, ahogamiento, esclerotiniosis de la coliflor, marchites del jitomate, etc. (Romero, 1993)

Etiología

Presenta un micelio velloso y blanco, esclerocios negros, de esféricos a alargados, 2-10 x 2-5 mm; aparentemente no necesitan de un periodo de dormancia para su germinación, pero si requieren luz para su maduración; apotecios pedicelados, en forma de copa o disco, suaves, carnosos, de color café claro; ascas claviformes, hialinas, entremezcladas con parafisos; ascosporas unicelulares, ovales, hialinas. Se desconoce su fase conidial (Romero, 1993).

Sintomatología

El síntoma primario más característico y evidente de las enfermedades por *Sclerotinia* es la aparición, sobre la planta infectada, de un micelio velloso y blanco en el que en poco tiempo se desarrollan grandes estructuras compactas de resistencia conocidas como esclerocios. Estos esclerocios son blancos al principio, pero más tarde se ennegrecen y endurecen superficialmente. En la base de los tallos de las plantas herbáceas suculentas que han sido infectadas

aparecen en primer término varias lesiones de color café u oscuro. Con frecuencia, estas lesiones se cubren con gran rapidez de varias zonas algodonosas blancas constituidas por el micelio del hongo. En las primeras etapas de desarrollo de la lesión en el tallo, el follaje muestra muy pocos signos del ataque por el hongo, de ahí que las plantas infectadas pasen fácilmente inadvertidas, hasta que el hongo se desarrolla totalmente sobre el tallo y lo pudra. Debido a esto, el follaje localizado arriba de la lesión se marchita y muere más o menos con gran rapidez. En algunos casos, la infección se inicia sobre una hoja y avanza después hacia el tallo a través de la hoja. Los esclerocios del hongo pueden formarse internamente en la médula del tallo, sin que denote signos de que ahí se encuentran, o pueden formarse fuera del tallo donde son bastante conspicuos (Agrios, 2006).

Epidemiología

S. sclerotiorum sobrevive en forma de micelio activo en plantas vivas o muertas, pero principalmente en forma de esclerocios, cuya duración puede variar de uno a siete años, según las condiciones del medio, húmedas o secas respectivamente. Bajo condiciones de alta humedad y temperatura fresca (0-28°C) con un óptimo de 19-24°C, los esclerocios germinan y producen varios apotecios, los cuales al madurar muestran su cara interna completamente expuesta y tapizada por ascas y parafisos (Romero, 1993).

Por su parte Agrios (2006) reporta que *S. sclerotiorum* inverna en forma de micelio en plantas vivas o muertas y en forma de esclerocios sobre o en el interior de tejidos infectados. En la primavera o a principios del verano, los esclerocios germinan y producen de uno a varios tallos delgados que terminan en un pequeño apotecio que tiene un diámetro de 5 a 15 mm y tienen forma de copa o disco, y en el cual se forman las ascas y las ascosporas.

Control

S. sclerotiorum es uno de los hongos mas difíciles de controlar por la resistencia de los esclerocios y la facilidad con que son diseminados en el campo durante las labores de cosecha y de cultivo. Sin embargo, se puede reducir la cantidad de inoculo con rotación de cultivos, tratamientos del suelo con Vapam o Mylone e inundación del terreno para que se pudran los esclerocios (Romero, 1993).

Por su parte Agrios (2006) menciona que en los últimos años, se ha reportado que más de 30 especies de hongos, bacterias, insectos y otros organismos, parasitan a *Sclerotinia* o inhiben su crecimiento. Se han obtenido resultados alentadores en el control biológico de las enfermedades que produce este hongo en algunos cultivos al incorporar en los suelos que ha infectado, los hongos micoparasitos *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium roseum*, *G. virens*, *Sporodesmium sclerotivorum* y *Trichoderma viride*. Estos hongos destruyen a los esclerocios que existen o inhiben su nueva formación, por lo que disminuyen en forma considerable la población de *Sclerotinia* en el suelo. Sin embargo, hasta ahora no se han hecho recomendaciones para el control practico de las enfermedades que ocasiona este hongo.

Genero *Trichoderma*

Importancia económica

Fue descrito por primera vez hace 200 años por los micólogos como Gasteromiceto y un siglo después se realizo el análisis de su estructura y características para ser clasificado como un género entre los hongos filamentosos, con propiedades y actividades biológicas. Su habilidad como antagonista fue descubierta hace 50 años (Orietta *et al.*, 2001).

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura es el antagonismo de 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 antifúngicos 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 (García, 2008).

Morfología

Es un hongo que posee conidióforos y conidios aunque también pueden producir clamidosporas. Los conidióforos son hialinos al inicio de su desarrollo, se observan ramificados pero cuando maduran comienzan a separarse por su formación aérea, son rectos y pueden llegar a presentar un aspecto piramidal, las filides son hialinas en forma de frasco e infladas por la base y unidas a los conidióforos en ángulo recto. Los conidios tienen de 2µm a 3µm de diámetro en promedio son redondos o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio. Las clamidosporas tienden a ser globosas a subglobosas, terminales a intercalares de tono verde y menores a 15µm de diámetro (Samuels, 1996 citado por Ramos, 2008).

Hábitat

El género *Trichoderma* es un tipo de hongo aerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios (Pérez, 2006 citado por García, 2008).

Por otra parte Jensen y Wolffhechel (1995) citados por García (2008) mencionan que *Trichoderma* pertenece a un género de hongos saprofitos, siendo

habitantes comunes del suelo. La presencia de alta humedad y el riego mejora sus condiciones de vida pasando de un estado latente a uno activo; se desarrolla óptimamente hasta en un 60% de capacidad del suelo de retención de humedad; a porcentajes mayores de saturación se disminuye la colonización y sobrevivencia por la baja disponibilidad de oxígeno. El hongo es favorecido por condiciones de pH ácido donde su población se incrementa por una mayor formación de conidióforos, por la germinación de conidias y por menor competencia con microorganismos como actinomicetos y bacterias que se encuentran limitados por la acidez.

Mecanismos de Acción

Las especies de *Trichoderma* pueden ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente, compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa o produciendo antibióticos (Benitez,2004).

En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agente de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo 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

rizosfera, los antagonistas producen antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (De la Garza, 1996).

Compuestos volátiles

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 este fenómeno. Dichos componentes son; dióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol, los cuales en diferentes concentraciones intervienen en la regulación del mecanismo fungistático (Dal Bello *et al*, 1997).

Por su parte Duran (2003) (citado por Ramos, 2008) menciona que 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, la suzukacilina, la alameticina, la dermadina, la penicilina, los trichotecenos, las trichorzianinas, entre otros.

Antibiosis

La antibiosis es el fenómeno por medio del cual *Trichoderma* inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1995). La producción de antibióticos confiere a los microorganismos una ventaja selectiva en la competencia por nutrientes y espacio en cualquier nicho ecológico (Méndez., 2003 citado por Lara *et al*., 2007).

Micoparasitismo

En el micoparasitismo *Trichoderma* realiza un reconocimiento y se adhiere sobre la pared del patógeno. En segundo termino, promueve la hidrólisis de las hifas y esclerocios del patógeno por medio de las enzimas producidas como lo son xilasas, quitinasas, pectinasas, glucanasas y glucosidasas, entre otras (Henis *et al.*, 1983).

Trichoderma se ha reportado como hiperparásito de un gran numero de hongos fitopatogenos al atacar directamente y producir la lisis de micelio y también de esclerocios de hongos (Correa *et al.*, 2007).

Los hongos micoparasiticos fueron clasificados en dos grandes grupos biotrofos (aquellos que mantienen una relación de equilibrio con el hospedero) y necrotrofos (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).

Control Biológico

French y Teddy (1982) indican que el control biológico es en un sentido restringido el control por medio de parásitos o antagonistas específicos.

Garrett (1965) define al control biológico de las enfermedades de plantas como cualquier condición o practica mediante la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de cualquier organismo viviente (excepto el hombre), resultando una reducción de la enfermedad causada por el patógeno; pudiéndose lograr el control biológico mediante la introducción o aumento de una o mas especies antagónicas.

El renovado interés en el control biológico, es en parte una respuesta de la humanidad, a el concerniente problema asociado con los pesticidas químicos (Olivares, 1993).

El control biológico de las enfermedades del suelo se esta investigando mediante el uso de microorganismos antagonistas que pueden ser incorporados al suelo durante el cultivo para impedir o reducir la actividad de los patógenos. Se han citado a especies de *Trichoderma* como antagonistas de *Dematophora necatrix* y *Phytophthora cinnamomi*. También se cita a *Trichoderma harzianum* y a *Dactilium dendroides* como antagonistas de *A. mellea*, cuando se ha aplicado después de un tratamiento previo del suelo con dosis subletales de fumigantes (Llacer *et al.*, 1996).

Control Biológico de Hongos Fitopatogenos

El control biológico de patógenos de suelo ha sido estudiado durante 65 años, pero durante este tiempo no se considero viable comercialmente; sin embargo desde 1905 a la fecha el interés en esta área de investigación se ha incrementado notablemente (Waller, 1988).

El estudio de las interacciones antagónicas entre los hongos tales como micoparasitismo, lisis, inhibición, competencia, antibiosis y fungistasis son particularmente importantes en el control biológico de hongos fitopatogenos (Baker y Cook, citados por Velasco, 2006).

Actualmente encontramos en el mercado productos para el control de hongos de raíz y suelo de las plantas utilizando aislados de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Backman *et al.*, 1997; Boyetcchko *et al.*, 1998).

Otros trabajos prueban que *Trichoderma* y *Amphelomyces* regulan la multiplicación de hongos parásitos de las plantas (Volcy, 1996).

MATERIALES Y METODOS

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. La Universidad se localiza en las coordenadas geográficas entre 25° 21' y 25° 21' latitud norte y 101° 01' y 101° 03' longitud Oeste del Meridiano de Greenwich, con una altitud de 1743 msnm.

Obtención del Material Biológico

Las cepas de *Trichoderma* spp. se obtuvieron de suelo proveniente de los Estados de Guanajuato, Nuevo León y Coahuila. El muestreo se realizó al azar en bosques o lugares donde no había sido perturbado por el hombre o en lugares cultivados y que se sospecho que existía la interacción de un antagonista (planta enferma y alrededor de ella plantas sanas). *Sclerotium cepivorum* se aisló del cultivo de ajo, del estado de Guanajuato. Se realizó un muestreo de plantas con síntomas de la enfermedad y se hicieron aislamientos, purificaciones y se identificaron con el apoyo del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG). El hongo *Sclerotinia sclerotiorum* fue proporcionado por el laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios (CISEF) el cual fue aislado de semillas de frijol infectadas con la enfermedad.

Incremento de Microorganismos

Las cepas de los microorganismos que se utilizaron para este trabajo fueron incrementadas 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 incubo a una temperatura de 27°C por 8 días. Del mismo modo se incrementaron las cepas de *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum* se colocaron a temperatura ambiente durante seis días.

Actividad Antagónica en Cultivos Duales

Se utilizo 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 deposito en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias fungosas del hongo patógeno y en el otro extremo a 4 cm de distancia se coloco un disco de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. Las cajas Petri se colocaron a temperatura ambiente de laboratorio (15°C como mínima y 19°C como máxima) durante cinco días, de los cuales se saco un promedio, como se muestra en el cuadro 1. Las cajas se tuvieron en observación cada 24 h para cuantificar el numero 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. En base a lo que se observó en la intersección antagónico-hongo se clasifico según la escala propuesta por Bell *et al.*, (1982) donde:

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, el hongo patógeno colonizo al menos 2/3 de la superficie del medio y resiste la invasión por *Trichoderma*

Clase 5, Sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizo toda la superficie del medio

Cuadro 1. Temperaturas tomadas en cinco días dentro del laboratorio donde se realizaron los bioensayos de antagonismo y compuestos volátiles.

Días	Mínima	Máxima
1	14	17
2	14	19
3	16	19
4	15	19
5	16	20
Promedio	15	19

Actividad Antagónica por Producción de Compuestos Volátiles

Para este ensayo se depositó en cajas petri con PDA, un disco de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* y de igual manera, en otra caja Petri un disco de 5 mm de diámetro de micelio de *S. cepivorum* u de *Sclerotinia sclerotiorum* según correspondiera. Posteriormente con la ayuda de un sacabocados de 1.5 de diámetro, se perforó cada una de las tapas de las cajas Petri inoculadas con *Trichoderma* spp. Una vez perforada las tapas, se unió la caja de *Trichoderma* con la de el fitopatógeno, es importante mencionar que a la caja en la cual se depositó el hongo fitopatógeno se le retiró la tapa para posteriormente unir las con cinta kleen pack como se muestra en la figura 6.

Cabe mencionar que se colocó el disco del hongo fitopatógeno el mismo día que el de *Trichoderma*, tomando en cuenta que la temperatura ambiental que se estaban presentando esos días eran frescas lo cual favorecía el rápido crecimiento de *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum*. La caja Petri que contenía a *Trichoderma* se colocó en la parte de abajo, esto hizo que al colocar el disco de 5 mm que contenían al hongo fitopatógeno, se le presionara contra el medio de cultivo para que se adhiriera bien a él y evitar que al momento de unir las cajas se desprendiera el explante y cayera a la caja Petri sembrada con *Trichoderma* spp. Los tratamientos se colocaron a temperatura de laboratorio (Cuadro 1) hasta que el testigo de los hongos

fitopatogenos cubriera completamente la caja Petri. Posteriormente, se midió el crecimiento micelial del hongo fitopatogeno en centímetros. Los datos que obtuvimos se transformaron a por ciento de inhibición del crecimiento micelial, considerando el crecimiento del testigo como el 100%.

Actividad Antagónica Mediante Incorporación de Filtrado de *Trichoderma*

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 discos de micelio de 5 mm de diámetro de *Trichoderma* de cultivos de cinco días de crecimiento, enseguida se puso en agitación a 100 rpm (New Brunswick Sc. Co. Modelo C25) durante 12 días. Pasado este tiempo el líquido se filtró dos veces con bomba de vacío y papel Wattman no. 44, por último en 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 *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum* 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 colocó el disco de micelio de 5 mm de *S. cepivorum* y de *S. sclerotiorum* según correspondiera. Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente de laboratorio (Cuadro 1) y se mantuvo en observación hasta que el testigo llenó la caja Petri. Para los diferentes bioensayos se utilizó un diseño completamente al azar, y se midió el porcentaje de inhibición micelial.

Diseño experimental

Para determinar el nivel de antagonismo de las cepas de *Trichoderma* sobre *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum* se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 14 tratamientos (cepas de *Trichoderma*) con cuatro repeticiones. Se utilizó la prueba de medias Tukey al 0.05% de significancia. Para esto se analizó con el programa SAS versión 8, (Online Doc, 1999) el cual nos agrupa las medias y nos da el análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudios de la Actividad Antagónica en Cultivos Duales de *Trichoderma* spp. sobre *S. cepivorum*.

En este experimento se pudo observar diferencias en el crecimiento de los hongos, principalmente en las cepas de *Trichoderma* las cuales mostraron un crecimiento más lento en comparación de *S. cepivorum*, este vario de 1 a 1.5 cm hasta el momento de hacer el contacto (Figura 1). Esto pudo deberse a la temperatura de incubación (Cuadro 1) ya que se sometieron a temperaturas favorables para el hongo fitopatógeno (14 a 19°C) y no para *Trichoderma* la cual se reporta de entre 26 a 29°C (García, 2008). La toma de datos se hizo en tres ocasiones, una al momento de que el testigo lleno la caja Petri, la segunda a los cuatro días y la tercera a los cuatro días de haber tomado la segunda, esta ultima considerada para el experimento. Se observo un lento crecimiento de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno después de tomar los datos en el testigo,

Los días al contacto entre *Trichoderma* y *S. cepivorum* fueron de 2 en todas las cepas estudiadas (Cuadro 2). De un total de 14 cepas se observo que hubo variación en los resultados de estas. Al ubicarlas dentro de la clasificación de Bell *et al* (1982), se observo que la cepa 28 fue la que mostro el máximo efecto antagónico sobre *S. cepivorum* (Figura 2) al ubicarse en la escala 1, en donde *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio, las cepas 30, 10, 8 y 31 se ubicaron en la escala 2, en donde *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio (Figura 3), las cepas 18, 15, 9, 17 y 19 se ubicaron en la escala 3, donde *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro (Figura 4) y las cepas 4, 2, 3 y 1 se ubicaron en la escala 4, en donde el hongo patógeno coloniza al menos las dos terceras partes de la superficie del medio y resiste la invasión por *Trichoderma* (Figura 5). Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por Ezziyyani *et al.* (2004), quienes mencionan que *Trichoderma*

harzianum mostro un alto nivel de antagonismo contra *Phytophthora capsici* con un desarrollo micelial de *P. capsici* menos densa y limitada por el antagonista. Estudios realizados muestran que algunas cepas de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* en comparación con el testigo (Correa *et al.*, 2007). Al utilizar las mismas cepas de *Trichoderma* que se utilizaron en el presente trabajo, se determino que estas mostraban un buen nivel de antagonismo contra *Phytophthora capsici* y *P. cinnamomi* (García 2008).

Cuadro 2. Días al primer contacto entre los microorganismos y clases de antagonismo en las que se ubico el crecimiento micelial 14 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *S. cepivorum*.

Tratamientos No. de Cepas	Días al Contacto	Clase ¹
18	2	3
30	2	2
10	2	2
15	2	3
8	2	2
31	2	2
9	2	3
28	2	1
4	2	4
2	2	4
17	2	3
3	2	4
19	2	3
1	2	4

1. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al* (1982).

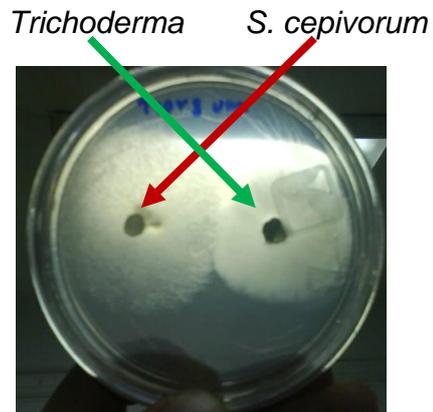


Figura 1. Momento del contacto entre *Trichoderma* y *S. cepivorum*.



Figura 2. Escala 1 de la clasificación de Bell *et al* (1982) entre *Trichoderma* y *S. cepivorum*.



Figura 3. Escala 2 de la clasificación de Bell *et al* (1982) entre *Trichoderma* y *S. cepivorum*.



Figura 4. Escala 3 de la clasificación de Bell *et al* (1982) entre *Trichoderma* y *S. cepivorum*.



Figura 5. Escala 4 de la clasificación de Bell *et al* (1982) entre *Trichoderma* y *S. cepivorum*.

Estudios de la Actividad Antagónica por la Producción de Compuestos Volátiles Producidos por *Trichoderma* sobre *Sclerotium cepivorum*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de compuestos volátiles (Figura 6) producidos por *Trichoderma* sobre *S. cepivorum* muestran que estos no tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *S. cepivorum* (Figura 7). Los datos obtenidos al momento de que el testigo cubrió la superficie de la caja con medio PDA (8 cm), muestran que en los 14 tratamientos de *Trichoderma* (4, 8, 1, 30, 18, 19, 3, 15, 9, 31, 17, 2, 10 y 28) sobre *S. cepivorum* el crecimiento de este es también de 8 cm. Al momento de la toma los datos se observó mayor rapidez de crecimiento del fitopatógeno (8 cm) en comparación de *Trichoderma* (de 1.5 a 2 cm). Esta diferencia en el crecimiento pudo deberse a la temperatura en la que se incubó el material (Cuadro 1) ya que favorecía a *S. cepivorum* y no así a *Trichoderma* el cual se reporta su óptimo crecimiento en temperaturas de 26 a 29 °C (García, 2008). Estudios realizados por Dal Bello *et al.* (1997) reportan el efecto inhibitorio causado por los compuestos volátiles que produce *Trichoderma hamatum* sobre el desarrollo de *Alternaria citri*, *Bipolaris cynodontis*, *B. sorokiniana*, *Curvularia brachyspora*, *C. lunata*, *C. oryzae*, *Rhizoctonia solani* observando alteraciones en crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos antes mencionados, todo lo opuesto con los resultados obtenidos en este ensayo. Ramos (2008) utilizando las mismas cepas de *Trichoderma* que se utilizaron en este trabajo, menciona que las cepas 1, 4, y 16 manifestaron un buen efecto de inhibición sobre *Fusarium oxysporum*.



Figura 6. Cajas Petri inoculadas con el antagonista y el fitopatógeno en el ensayo de compuestos volátiles.

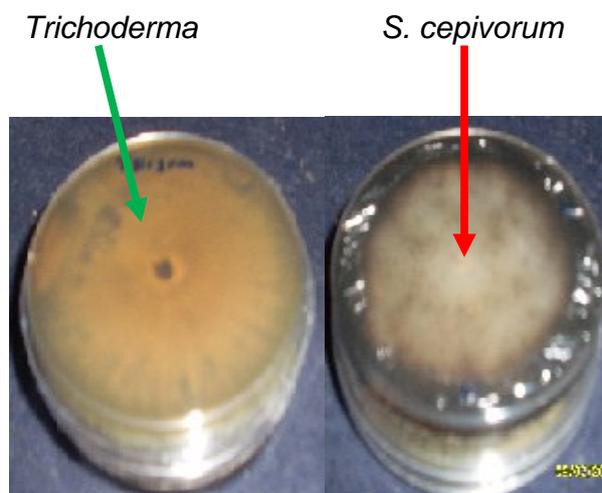


Figura 7. Resultado nulo en la producción de compuestos volátiles de *Trichoderma* sobre *S. cepivorum*.

Estudios de la Actividad Antagónica Mediante la Incorporación del Filtrado de *Trichoderma* spp. sobre el Crecimiento de *Sclerotium cepivorum*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo, la inhibición del crecimiento micelial de *S. cepivorum* vario de 0 a 81-82%, también se observó que la mayoría de las cepas utilizadas de *Trichoderma* tienen un efecto de inhibición mayor al 60% sobre *S. cepivorum* (Figura 8). También se pudo determinar que de las 14 cepas utilizadas de *Trichoderma*, 4 no mostraron ningún efecto de inhibición sobre el hongo fitopatógeno (cuadro 4, Figura 9). El análisis de varianza muestra que hay una diferencia estadística entre los tratamientos. La prueba de medias indica que las cepas de *Trichoderma* 30, 31, y 18 presentan el mayor efecto de inhibición, no presentando diferencia estadística significativa entre si (cuadro 4). Los tratamientos 1, 3, 8, 4, 10 y 15 presentaron un menor efecto en la inhibición del hongo fitopatógeno (71 al 75 %) en comparación con los tres anteriores, aunque no se detectó diferencia estadística entre ellas. El tratamiento 17 presentó un menor efecto de inhibición en comparación con los tratamientos anteriores (60-63%). En cambio los tratamientos 2, 28, 19 y 9 no mostraron ningún efecto de inhibición sobre el hongo fitopatógeno (cuadro 4). En otro trabajo realizado por Ramos (2008) donde

se utilizaron las mismas cepas de *Trichoderma* que para este trabajo, se reporta un buen efecto de inhibición, concordando así con nuestros resultados.



Figura 8. Máximo efecto de inhibición de extractos obtenidos de *Trichoderma* sobre *S. cepivorum*.



Figura 9. Mínimo efecto de inhibición de extractos obtenidos de *Trichoderma* sobre *S. cepivorum*.

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de *Sclerotium cepivorum* por extractos de 14 cepas de *Trichoderma* a los 4 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos No. de cepas	% de inhibición	1
30	81.875	A
31	81.250	A
18	79.375	A
1	75.625	AB
3	75.000	AB
8	74.375	AB
4	73.125	AB
10	71.875	AB
15	71.250	AB
17	60.625	B
2	0	C
28	0	C
19	0	C
9	0	C

1. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.

Estudios de la Actividad Antagónica en Cultivos Duales de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

Se pudo observar diferencias en el crecimiento de los hongos, principalmente en las cepas de *Trichoderma* las cuales mostraron un crecimiento mas lento en comparación de *S. sclerotiorum* el cual mostro un crecimiento mas rápido que *S. cepivorum*, el crecimiento de *Trichoderma* vario de 1 a 1.5 cm al momento de hacer el contacto (Figura 10). Al igual que con *S. cepivorum* esto pudo deberse principalmente a la temperatura en la que se incubaron (Cuadro 1) ya que se sometieron a temperaturas favorables para el hongo fitopatogeno las cuales se reportan como optimas de 19 a 24°C (Romero, 1993) y no para *Trichoderma* la cual se reporta de entre 26 a 29°C (García, 2008). La toma de datos se realizo en tres ocasiones, una al momento de que el testigo lleno la caja Petri, la segunda a los cuatro días y la tercera a los cuatro días de haber tomado la segunda, esta ultima considerada para el experimento. Esto se hizo al observar un lento crecimiento de *Trichoderma* sobre el fitopatogeno después de que se habían tomado ya los datos en conjunto con el testigo, lo cual, como se comento anteriormente, pudo deberse a la temperatura en la cual se incubo el material.

Los días al contacto entre *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum* fue de 2 en todas las cepas estudiadas (Cuadro 2). De un total de 14 cepas utilizadas se observo que hubo solo una pequeña variación en los resultados de estas. Al ubicarlas dentro de la clasificación de Bell et al (1982), se observo que la cepas 19, 18, 2, 1, 10, 4, 3, 9, 15 y 17 no mostraron ningún efecto antagónico sobre *S. sclerotiorum* al ubicarse dentro de la escala 4 (Figura 11), en donde el hongo patógeno colonizo al menos 2/3 partes de la superficie del medio y resiste la invasión por *Trichoderma*, las cepas 30, 31 y 8 se ubicaron dentro de la escala 2 (Figura 12), en donde *Trichoderma* sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio y la cepa 28 fue la única que mostro un máximo efecto antagónico sobre *S. sclerotiorum* (Figura 13) al ubicarse en la escala 1, en donde *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio. En un estudio realizado por

Vargas (2009), utilizando las mismas cepas de *Trichoderma* que se utilizaron en este trabajo, reporta un efecto de antagonismo bueno por parte de las cepas 8, 14, 3, 1, 19, y 20 contra *Alternaria alternata*. En un trabajo realizado por García (2008) menciona que utilizó 31 cepas de *Trichoderma*, de las cuales 14 son iguales a las que se utilizaron en este trabajo, reportando que 17 cepas de *Trichoderma* mostraron un buen efecto de antagonismo sobre *Phytophthora capsici*. Por otra parte Reyes *et al.* (2007) mencionan que *Trichoderma harzianum* demostró una elevada actividad antagonica sobre *Rhizoctonia solani* y *Phyricularia grisea* al mostrar una colonización total sobre ambos patógenos.

Cuadro 4. Días al primer contacto entre los microorganismos y clases de antagonismo en las que se ubico el crecimiento micelial 14 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*.

Tratamientos No de cepas	Días al contacto	Clase 1
28	2	1
19	2	4
18	2	4
2	2	4
1	2	4
10	2	4
4	2	4
3	2	4
30	2	2
9	2	4
31	2	2
8	2	2
15	2	4
17	2	4

1. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al* (1982).

Trichoderma *S. sclerotiorum*

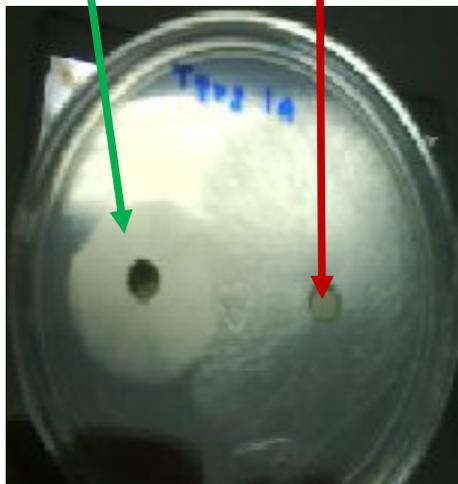


Figura 10. Momento del contacto entre *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*



Figura 11. Escala 4 de la clasificación de Bell et al (1982) entre *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*



Figura 12. Escala 2 de la clasificación de Bell et al (1982) entre *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*.



Figura 13. Escala 1 de la clasificación de Bell et al (1982) entre *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Estudios de la Actividad Antagónica por la Producción de Compuestos Volátiles Producidos por *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los resultados obtenidos en el ensayo de compuestos volátiles producidos por *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* muestran que estos no tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* (Figura 14). Los datos obtenidos al momento de que el testigo cubrió la superficie de la caja con medio PDA (8 cm), muestran que los 14 tratamientos de *Trichoderma* (4, 8, 1, 30, 18, 19, 3, 15, 9, 31, 17, 2, 10 y 28) sobre *S. sclerotiorum* el crecimiento de este, es también de 8 cm. Al momento de la toma los datos se observó mayor rapidez de crecimiento del fitopatógeno de hasta 2 veces más rápido (4 cm) en comparación de *Trichoderma* (de 1.5 a 2 cm). Esta diferencia en el crecimiento pudo deberse a la temperatura en la que se incubó el material (Cuadro 1) ya que favorecía a *Sclerotinia sclerotiorum* y no así a *Trichoderma* el cual se reporta su óptimo crecimiento en temperaturas de 26 a 29°C (García, 2008). Estudios contra otros fitopatógenos muestran que cepas de *Trichoderma* produjeron compuestos volátiles, los cuales provocaron un desarrollo micelial menos denso y reducción del tamaño de la colonia de *P. nicotianae*. (Stefanova *et al.*, 1999).

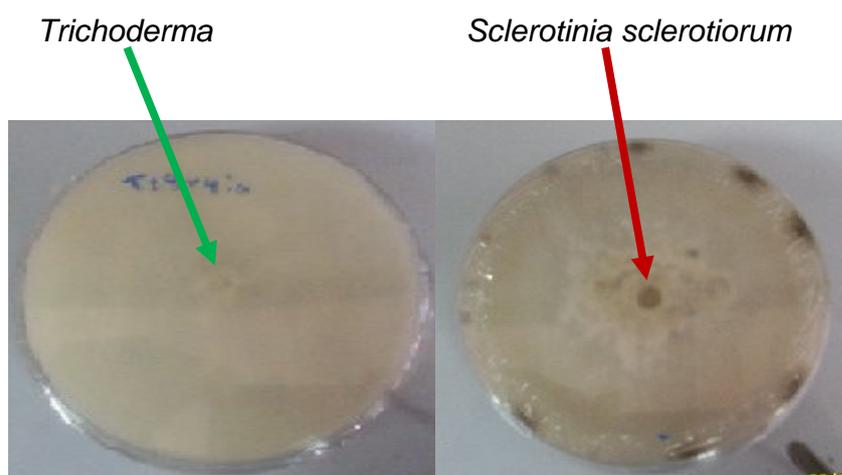


Figura 14. Resultado nulo en la producción de compuestos volátiles de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

Estudios de la Actividad Antagónica Mediante la Incorporación del Filtrado de *Trichoderma* spp. sobre el Crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo la inhibición del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* vario de 0 a 58.75%, también se observó que la mayoría de las cepas utilizadas de *Trichoderma* tienen un efecto de inhibición sobre el fitopatógeno (Figura 15). De los 14 tratamientos 3 mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 50% sobre *S. sclerotiorum*, 4 no mostraron ningún efecto de inhibición sobre el hongo fitopatógeno (Figura 16) y 7 mostraron porcentaje de inhibición menor al 50% (cuadro 7). El análisis de varianza muestra que hay una diferencia estadística entre los tratamientos. La prueba de medias indica que las cepas de *Trichoderma* 3, 1, y 30 presentan el mayor efecto de inhibición, no presentando diferencia estadística significativa entre sí (cuadro 7). Los tratamientos 18, 31, 10 y 17 presentaron un menor efecto de inhibición en comparación con los tres anteriores, aunque no son estadísticamente diferentes. Los tratamientos 4, 8 y 15 presentaron un menor efecto de inhibición en comparación con los tratamientos anteriores. En cambio los tratamientos 2, 28, 19 y 9 no mostraron ningún efecto de inhibición sobre el hongo fitopatógeno (cuadro 7). En el trabajo realizado por Vargas (2009), donde utilizó las mismas cepas de *Trichoderma* que se utilizaron en este trabajo, se reporta que las cepas 14 y 16 mostraron un muy buen nivel de inhibición de *Alternaria alternata* teniendo un máximo efecto de 55.92% de inhibición.



Figura 15. Máximo efecto de inhibición de extractos obtenidos de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.



Figura 16. Mínimo efecto de inhibición de extractos obtenidos de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de *Sclerotinia sclerotiorum* por extractos de 14 cepas de *Trichoderma* a los 3 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos No de cepas	% de inhibición	1
3	58.750	A
1	56.875	A
30	55.000	A
18	48.750	AB
31	48.750	AB
10	45.625	ABC
17	45.000	ABC
4	37.500	BCD
8	34.375	CD
15	29.375	D
2	0	E
28	0	E
19	0	E
9	0	E

1. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que:

Los días al contacto con temperaturas de 15 a 19°C de 14 aislamientos de *Trichoderma* con *S. cepivorum* y *S. sclerotiorum* fueron de dos días.

De las 14 cepas utilizadas de *Trichoderma* solo una mostró buen nivel de antagonismo en cultivos duales sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bajo las condiciones del ensayo se determino que ninguna de las 14 cepas utilizadas de *Trichoderma* producen compuestos volátiles que inhiban el crecimiento de *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los filtrados de 10 cepas de las 14 utilizadas de *Trichoderma* mostraron un porcentaje de inhibición sobre *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotinia Sclerotiorum*.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N., (2005). Fitopatología. Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores. México. 838 pp.
- Aguilar, E. P. 2006. Supresión de hongos fitopatogenos de suelo mediante agentes de biocontrol en el cultivo del chile bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. 66 p.
- Anaya, R. S. y Nápoles *et al.*, 1999. Hortalizas "Plagas y Enfermedades". Primera edición. Editorial trillas. México. 554 p.
- Backman, P. A., Wilson, M., Murphy J. F. 1997. Bacteria for biological control of plant diseases. Boca Ratón 19: 205-212.
- Baker, R., Griffin, J. G. 1995. Nuevos Enfoques para la Gestión Integrada de Plagas. Estrategias para el Control Biológico de Hongos Patógenos de Plantas. Florida. 153-182 p.
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M., Codón, A. C. 2004. Mecanismos de Biocontrol de Cepas de *Trichoderma*. International Microbiology 7:294-260.
- Boyetchko, S., Pedersen, E., Punja, Z., Reddy, M. 1998. Formulations of biopesticides. Methods in biotechnology. Humana Press 5: 487-508.
- Correa, S., Mello M., Ávila- Zila R., Minare-Brauna L., Padua, R. R., Gómez D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. SACC. FITOSANIDAD Vol. 11, no. 1.

- 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 Fitopatogenos Procedentes del Suelo. Rev. Iberoam Micol 14: 131-134.
- De la Garza, J. L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía., Marín N. L. 515 p.
- Duran, P. E., Robles M. F., Martínez, T. J., Brito, A. M. 2003. *Trichoderma* un Hongo Combatiente de Patógenos. Revista Técnico Ambiental 92:20-27.
- Ezziyyani, M., Pérez - Sánchez, C., Sid- Ahmed, A., Requena, M. E. y Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Universidad de Murcia, España. Anales de Biología 26: 35-45.
- French, E. R. y Teddy, H. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. IICA. San Jose, Costa Rica. 289 p.
- Garrett, S. D. 1965. Toward biological control of soil-borne plant pathogens. In: Baker, F. K. and W. C. Snyder (Eds): Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. C. A. Press. U.S.A. 4- 17 p.
- García A. C. R., El ajo. Segunda edición. Editorial Aedos, s. a., Barcelona, España. 1998. 205 p.
- García C. J. C. 2008. Antagonismo In Vitro de *Trichoderma* spp. sobre *Phytophthora capsici* y *Phytophthora cinnamomi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 45 p.

- Henis, Y., Adams P. B., Lewis J. A., Papavizas, G. C. 1983. Penetration of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 73: 1043-1046.
- Laborde, J. A., 1986. "Coexistence of garlic White rot with commercial production in central Mexico", en III international workshop on *Allium* white rot, national vegetable research station. Inglaterra. 24-40 pp.
- Lima, L. H. C., J. Ulhoa; A. P. Fernández; C. R. Félix. 1997. Purification of a Chitinase from *Trichoderma* sp. and Its Action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* Cell Walls. *J. Gen Appl. Microbiol.*, 43:31-37, 1997.
- Llacer G., López M. M., Trapero A., Bello A. 1996. Patología vegetal, Tomo 2. Segunda edición. Editorial aedos, S.A., Barcelona España. 1154 pp.
- Méndez, S. V. 2003. Control Biológico de Postchosecha en Uruguay. *Revista de Horticultura Internacional*.
<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/cbiologico.html>
- Messiaen C. M., Blancard D., Rouxel F., Lafon R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. Tercera edición. Editorial Aedos, S.A., Barcelona, España. 576 p.
- Olivares Z. M. E. 1993. Diagnostico y control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Ramoz Arizpe, Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 61pp.
- Orietta-F. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal la Habana Cuba. 62:96-100.

- Pérez, M., L., G. J. Salinas, and J. E. Redondo. 1994. Main diseases on *Allium* species in Mexico with emphasis on white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.). *In: Proceedings of the Fifth International Workshop on Allium White Rot*. Entwistle A. R. and J. M. Melero-Vara (eds.). Córdoba, España. pp: 6-11.
- Ramos H. M. M. 2008. Efecto Antagónico In Vitro de Aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxisporum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 51 pp.
- Reyes-Rodon T., Rodriguez-Gutierrez, G., Pupo-Zayas, A. D., Alarcon-Perez, L., 2007. Efectividad *in Vitro* de *Trichoderma harsianum* para el control de *Rhizoctonia Solani* Kuhn y *Pyricularia grisea* aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad* vol.11. no. 1.
- Romero C. S. 1993. Hongos Fitopatogenos. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 347 pp.
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research* 100:923-935.
- Sid Ahmed A., Perez-S. C, y Candela M.E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European J. of plant pathology*, 106: 817-824.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., Coronado, M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* para el control de hongos fitopatogenos del suelo. *Rev. Fac. Agron.* 16; 509-516.

- Vargas G. O. 2009. Mecanismos de la actividad antagonica de *Trichoderma* spp. contra *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler bajo condiciones in Vitro. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 30 pp.
- Velasco V. G. 2006. Evaluación de efectividad biológica de cepas de *Bacillus* spp. en la regulación de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* para el control de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) y su efecto en el desarrollo de plantas bajo condiciones de invernadero . Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 60 p.
- Volcy, Ch. 1996. Importancia de los enemigos naturales de los hongos fitopatogenos. Revista informativa Augura. 1: 11-13.
- Waller, M. D. 1908. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 379-407. U.S.A. 26: 379-407

APENDICE

Cuadro 1A. Ubicación en la escala de Bell *et al* (1982) de 14 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Sclerotium cepivorum*, a los 13 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
18	3	3	3	3
30	2	2	2	2
10	2	2	2	2
15	3	3	3	3
8	2	2	2	2
31	2	2	2	2
9	3	3	3	3
28	1	1	1	1
4	4	4	4	4
2	4	4	4	4
17	3	3	3	3
3	4	4	4	4
19	3	3	3	3
1	4	4	4	4

Cuadro 2A. Porcentaje de inhibición en centímetros de *Sclerotium cepivorum* por compuestos volátiles producidos por 14 cepas de *Trichoderma* a los 5 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
4	0	0	0	0
8	0	0	0	0
1	0	0	0	0
30	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
3	0	0	0	0
15	0	0	0	0
9	0	0	0	0
31	0	0	0	0
17	0	0	0	0
2	0	0	0	0
10	0	0	0	0
28	0	0	0	0

Cuadro 3A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Sclerotium cepivorum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	13	0	0	-	-
ERROR	42	0	0		
TOTAL	55	0			

C.V.= -

Cuadro 4A. Porcentaje de inhibición en centímetros de *Sclerotium cepivorum* por extractos de 14 cepas de *Trichoderma* a los 4 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
1	75	75	90	62.5
2	0	0	0	0
3	87.5	70	75	67.5
4	85	70	70	67.5
8	87.5	70	67.5	72.5
9	0	0	0	0
10	80	70	70	67.5
15	72.5	75	75	72.5
17	72.5	72.5	82.5	80
18	80	85	77.5	75
19	0	0	0	0
28	0	0	0	0
30	90	80	72.5	85
31	82.5	92.5	70	80

Cuadro 5A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de extractos producidos de 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Sclerotium cepivorum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	13	64673.32589	4974.87122	38.37	<.0001
ERROR	42	5445.31250	129.65030		
TOTAL	55	70118.63839			

C.V.= 21.41524

Cuadro 6A. Ubicación en la escala de Bell *et al* (1982) de 14 cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, a los 13 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
28	1	1	1	1
19	4	4	4	4
18	4	4	4	4
2	4	4	4	4
1	4	4	4	4
10	4	4	4	4
4	4	4	4	4
3	4	4	4	4
30	2	2	2	2
9	4	4	4	4
31	2	2	2	2
8	2	2	2	2
15	4	4	4	4
17	4	4	4	4

Cuadro 7A. Porcentaje de inhibición en centímetros de *Sclerotinia sclerotiorum* por compuestos volátiles producidos por 14 cepas de *Trichoderma* a los 4 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
4	0	0	0	0
8	0	0	0	0
1	0	0	0	0
30	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
3	0	0	0	0
15	0	0	0	0
9	0	0	0	0
31	0	0	0	0
17	0	0	0	0
2	0	0	0	0
10	0	0	0	0
28	0	0	0	0

Cuadro 8A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de compuestos volátiles producidos por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	13	0	0	-	-
ERROR	42	0	0		
TOTAL	55	0			

C.V.= -

Cuadro 9A. Porcentaje de inhibición en centímetros de *Sclerotinia sclerotiorum* por extractos de 14 cepas de *Trichoderma* a los 3 días después de la siembra en medio de cultivo PDA.

Tratamientos Cepas	Repeticiones			
	R1	R2	R3	R4
1	57.5	57.5	50	62.0
2	0	0	0	0
3	62.5	62.5	55	55
4	37.5	37.5	37.5	37.5
8	25	62.5	25	25
9	0	0	0	0
10	45	25	45	67.5
15	37.5	37.5	25	17.5
17	37.5	47.5	50	45
18	25	57.5	62.5	50
19	0	0	0	0
28	0	0	0	0
30	45	50	62.5	62.5
31	50	62.5	32.5	50

Cuadro 10A. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de extractos producidos por 14 cepas de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	13	27630.35714	2125.41209	22.32	<.0001
ERROR	42	4000.00000	95.23810		
TOTAL	55	31630.35714			

C.V.= 29.70131