

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS
LICENCIATURA EN AGRICULTURA ALTERNATIVA

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Fusarium solani*, CAUSANTE DE LA PUDRICIÓN DEL TRONCO DE ARALIA FABIAN (*Polyscias scuterallia*), AISLADAS EN LA ZONA DE LA TIGRA DE SAN CARLOS.

Trabajo de graduación sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional para optar al grado de Licenciatura en Agricultura Alternativa.

LEONEL ADELSON ARAYA ROJAS

Heredia, Costa Rica

Mayo, 2021

Trabajo de graduación aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, para optar al grado de Licenciatura en Agricultura Alternativa.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR



MSc. Fabio Chaverri Fonseca
Decano a.i. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar



Dr. Rafael Evelio Granados Carvajal
Director de la Escuela de Ciencias Agrarias



Lic. Steffany Orozco Cayasso
Tutora



MSc. German Rivera Coto

Lector



Lic. Rafael Ocampo Sánchez

Lector



MSc. Leonel Adelson Araya Rojas

Postulante

RESUMEN

Fusarium solani (Mart.) es un hongo patógeno que afecta muchas plantas de interés comercial en todo el mundo. Este organismo es la principal enfermedad en poscosecha de la planta ornamental *Polyscia scuterallia* (Burm.f.). El método de combate común es el uso de fungicidas sintéticos, careciendo de efectos deseados en los niveles de severidad, superando el umbral económico. *Trichoderma* spp. son microorganismos con potencial antagonista en hongos de importancia económica como *F. solani*, lo cual sería una alternativa de combate para esta enfermedad. Aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. procedentes de áreas de bosque, cultivo y de descanso en la Tigra, San Carlos, fueron utilizados para evaluar la capacidad antagónica contra *Fusarium solani*, causante de la pudrición vascular da planta ornamental *Polyscia scuterallia*. Quince aislados de *Trichoderma* spp. fueron estudiados utilizando la técnica de competencia dual, midiendo la capacidad antagonista por competencia de sustrato, basándose en los postulados de Bell et al. (1987) y crecimiento radial (CR), así como por el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) sobre *F. solani*. Los mayores valores de antagonismo de *Trichoderma* spp. en *F. solani* fueron dados por los aislados B7 y T3 con inhibición de crecimiento de *F. solani* de 55,6% y 67,1% de exposición con un crecimiento radial de 8,5 y 9 cm. Estos aislamientos colonizaron y redujeron el crecimiento de *F. solani* y se consideraron antagonistas de categoría I (según Bell), después de 96 h de exposición. Aislamientos de *Trichoderma* spp. presentaron potencial para el control biológico de *F. solani*, destacando B7 y T3 que compiten por la inhibición del sustrato y el crecimiento con este patógeno.

Palabras clave: antibiosis, control biológico, competencia, confrontación dual, crecimiento radial.

ABSTRACT

Fusarium solani (Mart.) is a pathogenic fungus; it affects many plants of commercial interest in the world. This organism causes the main post-harvest disease of the ornamental plant *Polyscia scuterallia* (Burm.f.). The common combat method is the use of synthetic fungicides, lacking the desired effects on severity levels, exceeding the economic threshold. *Trichoderma* spp. They are microorganisms with potential antagonists in fungi of economic importance such as *F. solani*, which would be a combat alternative for this disease. Native isolates of *Trichoderma* spp. from forest, cultivation, and rest areas in La Tigra, San Carlos, were used to evaluate the antagonistic capacity against *Fusarium solani*, causing vascular rot of the plant *P. scuterallia*. Fifteen isolates of *Trichoderma* spp. were studied using the dual competition technique, measuring the antagonistic capacity due to substrate competition, based on the postulates of Bell et al. (1987) and radial growth (RG), as well as by the percentage of growth inhibition (PIC) on *F. solani*. The highest antagonism values of *Trichoderma* spp. in *F. solani* they were given by isolates B7 and T3 with inhibition of the growth of *F. solani* of 55.6% and 67.1% of exposure, with a radial growth of 8.5 and 9 cm. These isolates colonized and reduced the growth of *F. solani* and were considered category I antagonists (according to Bell), after 96 h of exposure. Isolates of *Trichoderma* spp. they presented a potential for the biological control of *F. solani*, highlighting B8 and T3 that compete for substrate inhibition and growth with this pathogen.

Keywords: antibiosis, biological control, competition, dual confrontation, radial growth.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MARCO TEORICO.....	4
2.1	Cultivo De Ornamentales En Costa Rica	4
2.2	Plantas de Aralias y <i>Polyscias scuterallia</i>	6
2.3	Manejo Agronómico De <i>Polyscias scutellaria</i>.....	7
2.4	<i>Fusarium solani</i>	11
2.5	<i>Trichoderma spp.</i>	16
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1	Localización de las áreas de estudio.....	22
6.2	Recolección de suelo para el aislamiento de <i>Trichoderma spp.</i>	23
6.3	Recolección de las plantas enfermas	24
6.4	Etapas de laboratorio	25
6.5	Aislamiento de Cepas Nativas de <i>Trichoderma spp.</i> a Través de la Técnica de Diluciones Seriadas	25
6.6	Aislamiento de <i>Fusarium solani</i>	26
6.7	Cultivos monospóricos de <i>Trichoderma spp.</i> y <i>F. solani</i>	26
6.8	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	27
6.9	Competencia por sustrato	27
6.10	Antibiosis.....	28
6.11	Diseño experimental.....	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1	Aislamiento de <i>Fusarium solani</i>	29

7.2	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	31
7.3	Identificación de <i>Trichoderma</i> spp.	33
7.4	Principales características microscópicas de <i>Trichoderma</i> spp.	34
7.5	Pruebas de antagonismo	34
8	CONCLUSIONES	44
9	RECOMENDACIONES	46
10	REFERENCIAS	47
11	ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1.</i> DISMINUCIÓN DE LAS EXPORTACIONES DE FOLLAJES EN COSTA RICA, REPRESENTADAS EN MILLONES DE DÓLARES.	4
<i>FIGURA 2.</i> DIVERSIFICACIÓN DEL MERCADO NACIONAL DE PLANTAS Y FOLLAJES A DIFERENTES DESTINOS DEL MUNDO.	5
<i>FIGURA 3.</i> ZONA DE ESTUDIO, LA TIGRA DE SAN CARLOS. EN LA IMAGEN SE OBSERVA LA PLANTA DE EMPAQUE DE LA FINCA (AZ), ASÍ COMO EL ÁREA DE CULTIVO.	22
<i>FIGURA 4.</i> EN LA IMAGEN SE PUEDE OBSERVAR EL ÁREA DE CULTIVO (L), BOSQUE (B) Y TACOTAL (T), DONDE SE COLECTARON LAS MUESTRAS PARA LOS AISLAMIENTOS DEL HONGO <i>TRICHODERMA SPP.</i> , L1 REPRESENTA LA TÉCNICA DE MUESTREO EN ZIG-ZAG.	23
<i>FIGURA 5.</i> DIFERENTES ZONAS DONDE SE RECOLECTARON MUESTRAS DE SUELO PARA AISLAR <i>TRICHODERMA SPP.</i> A) CULTIVO, B) BOSQUE, C) TACOTAL Y HOMOGENIZACIÓN DE LAS SUBMUESTRAS DE SUELO.	24
<i>FIGURA 6.</i> PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS.	25
<i>FIGURA 7.</i> CAJA PETRI MOSTRANDO COMO SE COLOCARON LOS DISCOS (5.0 MM) CON <i>F. SOLANI</i> ; Y CON <i>TRICHODERMA SPP.</i>	27
<i>FIGURA 8.</i> PLANTAS INFECTADAS POR <i>F. SOLANI</i> Y OTROS AGENTES OPORTUNISTAS.	29
<i>FIGURA 9.</i> AISLAMIENTO DE <i>F. SOLANI</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.	30
<i>FIGURA 10.</i> PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>F. SOLANI</i> . EN LA IMAGEN SE OBSERVAN, MACROCONIDIOS, FIÁLIDES Y MICELIO SEPTADO (FOTO, UTILIZANDO UN MICROSCOPIO NIKON ECLIPSE 80I, 40X).	30
<i>FIGURA 11.</i> CRECIMIENTO DE <i>F. SOLANI</i> MOSTRANDO COLORACIÓN BLANCO-ROSÁCEO.	31
<i>FIGURA 12.</i> DIFERENTES AISLAMIENTOS DE <i>TRICHODERMA SPP</i> UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS <i>IN VITRO</i> .	33
<i>FIGURA 13.</i> DIFERENTES COLORACIONES PRESENTES EN LAS COLONIAS DE <i>TRICHODERMA SPP</i> AISLADAS.	33

<i>FIGURA 14.</i> ESTRUCTURAS MICROSCÓPICAS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP., CONIDIOS, FIÁLIDES Y CONIDIÓFOROS (FOTO, UTILIZANDO UN MICROSCOPIO NIKON ECLIPSE 80I, 40X).	34
<i>FIGURA 15.</i> CRECIMIENTO RADIAL (CR) DE AISLAMIENTOS DE <i>TRICHORDEMA</i> SPP. EN PRUEBAS DE ANTAGONISMO IN VITRO CONTRA <i>FUSARIUM SOLANI</i> .	38
<i>FIGURA 16.</i> PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO (PIC) DE AISLADOS DE <i>TRICHORDEMA</i> SPP. EN LAS PRUEBAS DE COMPETENCIA DUAL IN VITRO CONTRA AISLADOS DE <i>FUSARIUM SOLANI</i> .	41

LISTA DE TABLAS

<i>TABLA 1.</i> TOTAL DE AISLAMIENTOS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. POR SITIO DE MUESTREO EN CULTIVO, BOSQUE Y TACOTAL.....	31
<i>TABLA 2.</i> CATEGORÍA ANTAGÓNICA DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. SOBRE <i>F. SOLANI</i> , SEGÚN LOS CINCO CRITERIOS PROPUESTOS SOBRE BELL.	35

LISTA DE ANEXOS

<i>ANEXO 1. ANÁLISIS DE VARIANCIA (TUKEY) EN INFOSTAT (VERSIÓN ESTUDIANTIL) PARA PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO EN PRUEBAS IN VITRO DE TRICHODERMA SPP. VS FUSARIUM SOLANI.</i>	67
<i>ANEXO 2. ANÁLISIS DE VARIANCIA (TUKEY) EN INFOSTAT (VERSIÓN ESTUDIANTIL) PARA PRUEBAS CRECIMIENTO RADIAL EN PRUEBAS IN VITRO DE TRICHODERMA SPP. VS FUSARIUM SOLANI.</i>	68

1 INTRODUCCIÓN

A partir del siglo XX Costa Rica incursionó en el comercio internacional con una serie de productos tradicionales como: banano, café, caña de azúcar, y otros de origen tropical. A inicios de 1986 se sumaron los llamados, productos no tradicionales, como las plantas ornamentales (Aguilar, 2013), posicionándose como un sector importante de la economía, por su aporte de divisas al país (Leon, 2008; Murillo y Arias, 2005; Murray, 2009; Rica, 2006) . Durante el período 1999-2003 se registró un aumento en las exportaciones de plantas ornamentales al mercado estadounidense; asimismo, a partir del período 2002-2006 este sector mostró un crecimiento tal que le permitió competir en el mercado europeo (Mora et al., 2007). Para el 2010 esta actividad representaba el 8% del valor de las exportaciones (Barahona et al., 2011). En la década de los ochenta generó más de US\$ 16 millones y para el año 2010 superaba los US\$ 150 millones (von Marschall, 2007).

De las plantas ornamentales con mayor demanda en los mercados internacionales, sobre todo europeo y asiático, son las aralias (*Polyscias* spp.), principalmente la especie *P. scutellaria*, producida mayormente en la zona de la Tigra de San Carlos. El cultivo de estas plantas ocupa el segundo lugar en cuanto a la distribución de hectáreas cultivadas (49,6 ha), un 11.9% del total destinadas a la producción de ornamentales, superada únicamente por la producción de *Dracaena marginata*, representa el 57.1% (aproximadamente 448,3 ha cultivadas) (Mora et al. 2007).

Las aralias, como muchos otros cultivos agrícolas son afectados por “plagas agrícolas”, tal es el caso del hongo *Fusarium solani*, que constituye la principal plaga en este cultivo (pérdidas económicas). Afecta principalmente el tronco y parte de las raíces, ocasionando la muerte de las plantas. *F. solani* se desarrolla principalmente en los invernaderos, donde las plantas, una vez cosechadas, se colocan para que regeneren su sistema radical, estapa en la

cual se registra la mayor incidencia del organismo, responsable del 20% de las pérdidas de este cultivo, y cuyo efecto más severo en época lluviosa (Mora et al., 2007).

Fusarium es un género de interés económico en el ámbito mundial, por su amplia distribución en casi todo el globo terrestre y por su capacidad patogénica (Arbeláez 2000). Algunas especies son de importancia agrícola, debido a las pérdidas económicas ocasionadas en cultivos. Es un organismo que puede dañar de forma solitaria o formando complejos de patógenos (Arbeláez, 2000; Garcés et al., 2001); afecta diversas partes de las plantas, donde causa varios procesos patológicos como: marchitamiento vascular y pudrición basal en las plantas. Una vez establecido en los órganos, es sumamente agresivo e invasivo, al grado de ocasionar la muerte a una considerable parte de las plantas infectadas (Camacho y Gil, 2008).

Por sus efectos sobre la agricultura, el combate *F. solani* es una prioridad para los productores, en su mayoría han optado por utilizar fungicidas sintéticos; alternativa que a lo largo del tiempo ha generado externalidades negativas, tanto en la salud humana, como en el ambiente; pero además su efecto sobre el combate de este y otros organismos fitopatógenos no es eficaz (Mora et al. 2007).

Los productores de aralias comparten esta tendencia en cuanto al combate químico para tratar *F. solani*, y basados en observaciones empíricas, aumentan las dosis recomendadas, al no observar efectos positivos (Mora et al. 2007).

Como consecuencia del mal uso de las moléculas químicas existe la probabilidad de que el patógeno desarrolle tolerancia, debido a la sobredosis de ingredientes activos (Gonzalez y Izquierdo, 2000; Hernández et al., 2009; Montoro et al., 2009; Sandoval et al., 2011; Vargas et al., 2008). Además de elevados costos de producción, daños a los ecosistemas y trazas de fungicidas en las plantas, debido al uso indiscriminado de estos productos (Hernández et al., 2009; Obreque, 2004; Sandoval et al., 2011).

A raíz de la problemática planteada, muchos investigadores se han dado a la tarea de implementar manejo alternativo, para limitar el uso de plaguicidas. Su objetivo es identificar y

aplicar métodos de combate que reduzcan la incidencia de la plaga, pero que además permita una producción amigable con el ambiente, mediante el uso de productos de bajo impacto y no residuales (Cartea et al., 2008; Iriarte et al., 2011; Martínez, 2012).

Las especies de *Trichoderma* spp son organismos antagónicos de *Fusarium* sp. y un amplio espectro de hongos; razón por la cual, desde 1930 se vienen estudiando para utilizarlas contra organismos fitopatógenos (Martínez, 2012). *Trichoderma* spp. constituye un conglomerado con múltiples alternativas a evaluar, pues posee características antagónicas que pueden afectar diversos hongos fitopatógenos; pero existen aún, muchas especies sin estudiar y sin identificar (Ezziyani et al., 2004).

Como un aporte a la necesidad de investigar la capacidad antagonista de aislamientos nativos de *Trichoderma* spp. para el combate biológico de *F. solani* en plantas de *Polycia scuterallia*, en este trabajo se estudió la capacidad de competencia por sustrato y la inhibición de crecimientos por parte de *Trichoderma* spp. sobre *F. solani*.

2 MARCO TEORICO

2.1 Cultivo de ornamentales en Costa Rica

En el periodo del 2008-2012 el sector productivo de plantas ornamentales experimentó un descenso en el porcentaje de sus exportaciones (29,7%) (Figura 1), producto de la crisis económica en ese momento, pero también; se vio afectado por un cambio brusco en el mercado, debido a las exigencias de los consumidores, un ejemplo fue la significativa reducción en las exportaciones de helechos, causada por la disminución en la demanda de estas plantas, al compararse con otras ornamentales. (Arguedas et al., 2014; Barquero, 2010, 2013).

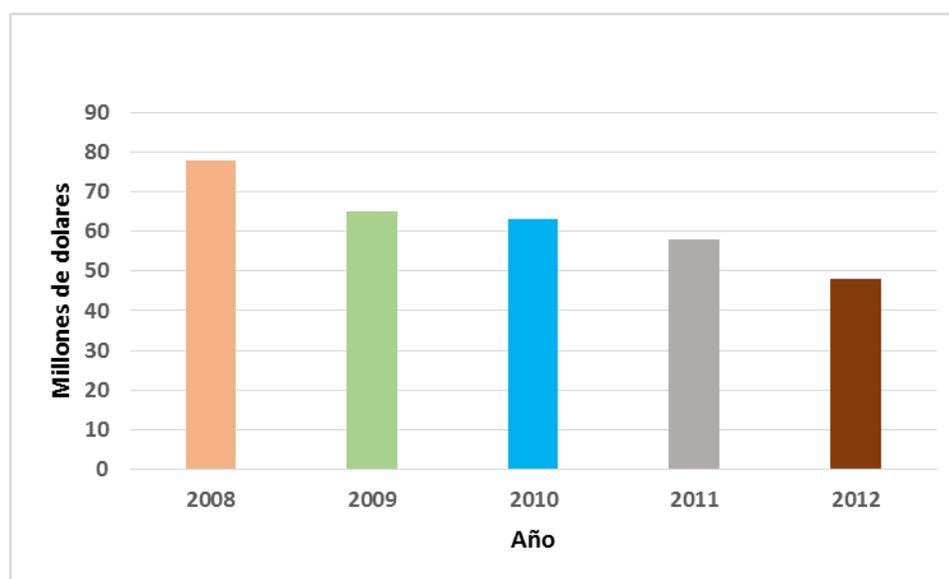


Figura 1. Disminución de las exportaciones de follajes en Costa Rica, representadas en millones de dólares.

Nota. Fuente. Arguedas et al. 2014.

Por su parte los productores que pudieron sobrellevar esta situación adversa, optaron por especializarse, y de esta manera, satisfacer la demanda con nuevos productos. Este es el caso de los cultivadores de la región de la Tigra (San Carlos), especializados en la producción de *D. marginata* y otras plantas como, cycas, ficus, palmas y aralias; consolidando la región como

productora de plantas ornamentales. Este escenario permitió la apertura de nuevos mercados en diferentes partes de mundo (Figura 2) (Arguedas et al., 2014; Vindas, 2013).

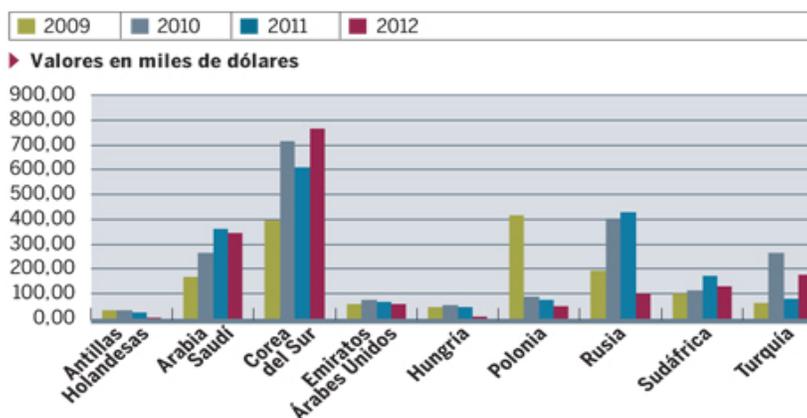


Figura 2. Diversificación del mercado nacional de plantas y follajes a diferentes destinos del mundo.

Nota: cifras incluyen exportaciones de plantas y follajes. Fuente. Vindas, 2013.

Las plantas producidas en Costa Rica se encuentran entre las más cotizadas, pues sus características fenotípicas, cumplen estándares de calidad exigidos por consumidores en el ámbito internacional. Países como China, pese a ser uno de los mayores productores del mundo, ofrecen plantas de menor calidad. En este contexto, se reconoce la necesidad e importancia de investigación en esta materia, que además de generar opciones para los productores, se implementen distintas prácticas que conlleve mejoras en su producción (Arias, 2013; Vindas, 2013).

La región Huetar Norte del país, es una de las zonas donde se desarrolla con más fuerza la producción de este tipo de plantas, pues presenta entre otras cosas, microclimas que la hacen apta para dicha actividad. Esta zona aporta una cuota importante a las exportaciones del país, y además ha contribuido al desarrollo socioeconómico de las comunidades (Mora et al. 2007).

En el país este tipo de cultivos se desarrolla principalmente en la Zona Huetar Norte (Sarapiquí, Guatuso y San Carlos). En la región de la Tigra de San Carlos es donde existe la

mayor producción. Para el 2007 contaba con 291.79 ha y 120 productores, esto evidencia la importancia en la zona (Mora et al. 2007).

2.2 Plantas de aralias y *Polyscias scuterallia*

Las aralias pertenecen a la familia Araliaceae, caracterizada por agrupar especies que son arbustos semileñosos, con hojas simples o compuestas y alternas, peciolo evidentemente desiguales en su longitud (González, 2011; Rout et al., 2007). El género *Polyscias*, comprende cerca de 150 especies distribuidas en todo el mundo (Walter y Lebot, 2003). En Costa Rica se conocen alrededor de siete géneros y unas 44 especies de araliáceas (González, 2011).

Polyscias scuterallia es un arbusto que alcanza naturalmente alturas desde los 6-7 m, posee hojas de 13-40 cm de largo, con ápice redondeado, ampliamente elípticas a achatadas o reniformes, por lo general ovadas, margen con dientes cortos. Pecíolo de 5-20 cm de largo, alado cubriendo el tallo en la base. Inflorescencia terminal, erecta, posee un gran número de umbelas, cada una de las inflorescencias presenta alrededor de 8-25 flores hermafroditas, estaminadas, con cáliz hialino de 5-8 dientes; su corola presenta 5-7 pétalos ovados-lanceolados de 1,6-2,25 mm de largo. Estambres con anteras de color blanco cremoso y ovarios con 3-5 carpelos; estilos tantos como carpelos, libres casi hasta la base. Los frutos son deprimido-globosos (Burch y Broschat, 1983; Kapupara et al., 2010; Rosa et al., 2019; Rout et al., 2007; Walter y Lebot, 2003).

Las principales especies de aralias cultivadas son: (Mora et al. 2007).

- *Polyscias scutellaria* (**aralia fabián**): presencia de hojas grandes redondeadas, anchas, color verde en el haz y azulado-grisáceo en el envés, se caracteriza por tener la hoja en forma de copa.
- *Polyscias fruticosa* (**aralia ming**): hojas compuestas, pequeñas y dentadas, de color verde tierno.
- *Polyscias guilfoylei* (**aralia black**): presenta hojas pequeñas en forma de copa corrugadas de color verde oscuro.

- *Polyscias balfouriana* (**aralia balforiana**): posee hojas pequeñas de color verde amarillo.

2.3 Manejo agronómico de *Polyscias scutellaria*

3.3.1 Preparación de terreno

Para la preparación de terreno es indispensable la utilización de maquinaria agrícola, es importante mantener un suelo drenado, las plantas no toleran encharcamiento; además esta condición favorece el desarrollo de organismos como *F. solani* (Mora et al. 2007).

3.3.2 Semilla

La propagación de *P. scutellaria* se da principalmente por semilla vegetativa (Mora et al. 2007). Uno de los principales problemas de este tipo de semillas es la susceptibilidad a enfermedades fungosas, estos organismos penetran e infectan fácilmente por los cortes mecánicos, ocasionados en la preparación de las estacas vegetativas (semilla). (Dissanayake y Kumari, 2012).

Se utilizan generalmente estacas de 15 a 10 cm con un diámetro que supere 4 cm. La base de cada semilla es impregnada con hormonas que estimula el brote de raíces y se aplica un fungicida químico de manera preventiva, para evitar el desarrollo de hongos en las semillas (Mora et al., 2007 y Villalobos, R., comunicación personal, 28 de setiembre de 2019).

3.3.3 Siembra

Las aralias se siembran en distancias que van desde los 0.4 x 0.6 m hasta 1 x 1 m (según el tamaño que se quiera producir), los surcos van desde los 0.6, 0.7 y 0.8 m de distancia. El número de plantas por hectárea alcanza densidades de siembra de entre las 10.000 hasta las 41.000 (Villalobos, R., comunicación personal, 28 de setiembre de 2019).

3.3.4 Fertilización

La fertilización de las aralias ha sido poco estudiada, generalmente los productores fertilizan este cultivo de manera similar al café. Sin embargo, Castillo (1990), señala que *P. scutellaria* necesita en un programa de fertilización con al menos 450 Kg/ha de Nitrógeno (N), 150 Kg/ha de fósforo (P₂O₅) y 300 Kg/ha de potasio (K₂O).

3.3.5 Poda

La poda es una labor importante para la formación de las plantas, se realiza entre los ocho a diez meses después de la siembra. Consiste en eliminar las ramas principales con el fin de generar un brote donde se obtengan varios hijos o guías (preferiblemente se buscan más de cuatro guías) (Villalobos, R., comunicación personal, 28 de setiembre de 2019).

La planta madre se forma a través de la poda con el fin de obtener tamaños y ramificaciones diferentes, dependiendo del gusto del consumidor. Se comercializan distintos tipos de plantas madres, los tamaños van desde 30 cm (un pie), hasta 150 cm (cinco pies) o más (planta muy grande no son comunes), estas plantas tienen que cumplir con un estándar de calidad, el mercado exige plantas con una estética adecuada. Las plantas tienen que presentar un mínimo de cuatro guías para el caso de plantas de 30 cm a 45 cm (de pie y pie y medio), y plantas que superen estos tamaños, el número de guías va desde cinco a ocho (Mora et al., 2007 y Villalobos, R., comunicación personal, 28 de setiembre de 2019).

3.3.5 Cosecha

Esta labor es realizada a través de los diferentes pedidos de los clientes, de modo que es importante realizar un programa de siembra para suplir adecuadamente los pedidos de aralias durante el año. La cosecha se hace de acuerdo al diámetro de la planta, la altura y la cantidad, lo más común es que se cosechen plantas de todos los tamaños. Las plantas que no tengan el suficiente número de guías (mayor a cuatro y que no cumplan con un adecuado diámetro se

quedan en el campo hasta que alcancen los estándares adecuados) (Villalobos, R., comunicación personal, 28 de setiembre de 2019).

3.3.6 Principales plagas y enfermedades

Se denomina “plaga agrícola” cuando un organismo a través de su desarrollo poblacional sobrepasa el umbral económico de daño en un determinado cultivo ocasionando pérdidas en la producción (Selfa y Anento, 1997).

El combate de enfermedades y plagas por lo general se desarrolla con el uso de plaguicidas sintéticos y para el combate de arvenses (malezas) es efectuada tanto química, manual o mecánicamente (Villalobos et al., 2009).

3.3.6.1 Artrópodos

Los insectos que perjudican con mayor frecuencia a las Polyscias son cochinillas (Pseudococcidae), cigarrillos (Cicadelidae), áfidos (Aphididae) y ácaros (*Tetranychus* spp.), ocasionando daños tanto en campo como en invernadero. Para el combate de estos artrópodos, generalmente se utilizan productos organofosforados y acaricidas.

3.3.6.2 Nematodos

Los nematodos ocasionan daños importantes al alimentarse principalmente del sistema radical de las plantas. Producen síntomas particulares en las raíces como: agallas, lecciones necróticas, proliferación de raíces secundarias y pobre crecimiento radicular (Talavera, 2004).

Estos organismos pueden actuar como una plaga directa, ocasionando daños en las raíces, se ha evidenciado la presencia de hongos oportunistas que aprovechan heridas ocasionados por nematodos al alimentarse, para entrar y colonizar las plantas. Estas interacciones son frecuentes y han ido tomando mayor relevancia en los programas de combate de plagas (Coyne et al., 2007; Talavera, 2004).

De acuerdo a Fernández y Quesada (2009), se han registrado los siguientes nematodos en *P. scutellaria*.

- *Criconemella spp.*
- *Helicotylenchus spp.*
- *Meloidogyne spp.*
- *Pratylenchus spp.*
- *Tylenchorhynchus spp*

3.3.6.3 Arvenses

Predominan principalmente arvenses de hoja ancha (dicotiledóneas) y gramíneas (poáceas), en menor amplitud se pueden encontrar ciperáceas (Villalobos, R., comunicación personal, 28 de setiembre de 2019).

3.3.6.4 Hongos y bacterias

De acuerdo al (Villalobos et al. (2009), se han registrado los siguientes organismos:

- *Alternaria panax* Whetzel, en hojas.
 - *Botryodiplodia* sp., en tallos.
 - *Cercospora* sp., en hojas.
 - *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., en hojas, e.t. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk.
 - *Cylindrocladium* sp., en raíz.
 - *Diplodia* sp., en hojas.
 - *Phomopsis* sp., en tallos.
 - *Rhizoctonia solani* Kühn., en tallos y raíces, e.t. *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk.
 - *Dickeya chrysanthemi*, en tallos.
 - *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp., en hojas.
 - *Xanthomonas campestris* pv. *hederae* (Arnaud) Dye., en hojas.
- Fusarium solani* (Mart.) Sacc., en raíces y tallos, e.t. *Haematonectria haematococca*.

2.4 *Fusarium solani*

3.4.1 Generalidades

Fusarium solani está distribuido en muchas partes del mundo, es una especie polífaga, infecta gran cantidad de plantas de diferentes géneros. Es un organismo cosmopolita frecuente en el suelo, tiene la capacidad de sobrevivir por mucho tiempo en este medio; así como en residuos de cosecha y otros sustratos (Alarcón et al, 2011; Arbeláez, 2000; Garcés et al., 2001).

Es de importancia económica porque en muchos casos los daños superan el umbral económico (Smith et al., 1992). Esta situación es evidente, pues de las 111 especies de plantas (87 géneros) donde se ha informado la presencia de este patógeno, una considerable cantidad de ellas son plantas de importancia agrícola, indispensables para la alimentación humana y animal, como: granos básicos, tubérculos, frutales, hortalizas entre otros, por esta situación, se realizan esfuerzos para estudiar a mayor cabalidad este patógeno, con el afán de combatirlo eficientemente (Bogale et al., 2009).

3.4.2 Taxonomía

Reino: Fungi

Phyllum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriacea

Género: *Fusarium*

Especie: *solani*

3.4.3 Teleomorfo

Haematonectria haematococca (antes *Nectria haematococca* (Melgarejo et al., 2010) (Melgarejo et al., 2010; Pitt y Hocking, 2009; Smith et al., 1992).

3.4.4 Sinónimos

F. eumartii y *F. javanicum* (Smith et al., 1992).

3.4.5 Sintomatología

Fusarium solani produce lesiones de color rojizo en las raíces, con el tiempo estas se tornan café y pueden aparecer fisuras o grietas en la parte exterior del sistema radical, avanzando de las raíces primarias hasta las secundarias (provocándoles la muerte). Posteriormente infecta otras partes como tallos y médula. Causa la pudrición de semillas, tallos y raíces de las plantas (Bogale et al., 2009).

Causa síntomas en distintos órganos de las plantas, asociado a: caída y muerte de plántulas, marchitamiento vascular, mal de talluelo, podredumbres de pie y los llamados chancros de tallo; así como lesiones radiculares (por lo general pardo rojizas), en los frutos causa podredumbres, tanto en el campo como en centros de acopio, causa la pudrición de semillas (Blancard, 2011; Camacho y Gil, 2008).

Los daños ocasionados en las raíces secundarias, impide que las plantas absorban nutrientes y agua disponible en suelo u otros sustratos (Blancard, 2011). A la enfermedad causada por este organismo se le asocia con la obstrucción de los haces vasculares, clorosis foliar leve, defoliación y pudrición radical, provoca marchitamiento, ocasionando una muerte ascendente de la planta (Alarcón et al., 2011; Cubillos et al., 2011). Sobre los tallos se pueden notar manchas color pardo de consistencia blanda, micelio de color blanquecino (Melgarejo et al., 2010).

3.4.6 Características morfológicas

Fusarium solani produce tanto macroesporas, como microesporas, forman macroconidios típicos (grosor menor de 4 μm), presentan un ligero curvamiento con una a ocho células; también posee microconidios con una a dos células. Los macroconidios y micelios viejos forman clamidosporas de pared gruesa con presencia de una a tres células (Clark y Moyer, 1991; Sherf y Macnab, 1986; Smith et al., 1992).

3.4.7 Ciclo de vida

Fusarium solani se reproduce tanto por vía sexual como asexual. La ruta asexual es una de las principales características para diferenciar esta especie de otros hongos del mismo género. Esta capacidad reproductiva genera variabilidad genética llamada heterocariosis, responsable de la existencia de muchos tipos de *F. solani*, con características diferentes a pesar de ser de una misma especie Agrios (2005).

Las clamidosporas pueden persistir por más de cinco años en el suelo u otros sustratos, manteniéndose latente hasta que ocurra cualquier actividad en el ambiente favorable para establecerse en un hospedante. Esta capacidad se da cuando las temperaturas oscilan entre los 18 y 28 °C; así como una humedad moderada en el sustrato (Sherf y Macnab, 1986).

Fusarium solani ingresa en la planta a través de heridas en la raíz, ocasionando, ya sea una pudrición superficial o radicular, no se desarrolla ni invade otras raíces a menos que se produzcan heridas; sin embargo, sí puede diseminarse dentro del tejido afectado, donde suele ocasionar canchales en los tallos (Alarcón et al., 2011; Clark y Moyer, 1991). Otra forma de infección es a través de heridas naturales en tallos o raíces al crecer. Los insectos y los nematodos también ocasionan heridas que propician la entrada de este patógeno (Alarcón et al., 2011).

Este hongo es diseminado por medio de herramientas contaminadas utilizadas durante las diferentes actividades de manejo de las plantas (Smith et al., 1992). De forma natural se disemina una vez que se manifiestan sus estructuras reproductivas dispersándose mediante la actividad del viento y agua (Alarcón et al., 2011).

3.4.8 Combate

Fusarium solani es difícil de combatir una vez que completa su ciclo biológico, debido a que produce numerosas esporas de resistencia (clamidosporas), capaces de persistir por largos períodos en los sustratos y residuos de cosecha. Las clamidosporas permanecen latentes, como inóculo residual que, por estímulos bióticos y abióticos, se activa en presencia del hospedante, e inicia la proliferación y establecimiento en el tejido susceptible.

Ante estas características, una alternativa de combate es la rotación de cultivos con diferentes familias de plantas no hospedantes; también la utilización de especies de maduración temprana, las cuales se cosechan antes de que el hongo perjudique órganos de valor comercial; así como el uso de cultivares resistentes (Alarcón et al., 2011).

Producir en zonas de altura es una opción de combate, ya que este organismo se desarrolla mejor en baja altitud, cercana al nivel de mar. Los rastrojos, residuos de cosecha, deben ser tratados; ya sea, en compostajes (las altas temperaturas degradan las hifas de los hongos) o aplicando fungicidas químicos o biológicos (Clark y Moyer, 1991).

En cuanto al manejo del suelo u otro sustrato, es favorable drenar el agua (evitar humedad); y usar técnicas de solarización, proceso hidrotermal que consiste en colocar sobre el sustrato un plástico transparente o negro (polietileno) durante varios meses recibiendo alta radiación solar ocasionando la muerte de los hongos, así como la destrucción de propágulos fungosos (González et al., 2004).

El combate químico ha sido una de las técnicas más utilizadas para tratar *F. solani*. Comúnmente se utilizan: captan, tiram, choroneb, dichone y oxido cuproso. Productos comunes en fumigaciones de suelo son: di-trapex, metam-sodio, pero no son económicamente rentables (Sherf y Macnab, 1986). El Benomil es uno de los productos antifúngicos más utilizados para tratar organismos de suelo, entre ellos *Fusarium* sp. Sin embargo, existen registros de resistencia de *F. oxysporum* ante este producto (Garcés et al., 2001; Rubio et al., 2008).

Varios autores argumentan que el uso de fungicidas para tratar patógenos de suelo, alteran la biota microbiológica en la rizosfera, desfavoreciendo consecuentemente la actividad de los microorganismos benéficos, entre ellos antagonistas de *F. solani* y otros patógenos importantes, incidiendo en altas infecciones en las plantas (Márquez et al., 2002; Mora, 1996; Nina et al., 2011).

3.4.9 Combate biológico

El combate biológico es un método de importancia para tratar enfermedades como las causadas por *F. solani*. A finales del siglo XIX esta alternativa surgió como un método eficaz y rentable. Pero ha sido perjudicado por el uso excesivo de plaguicidas que afectan indirectamente los enemigos naturales de las "plagas", debido a la persistencia de estos en el suelo, aire y agua. El efecto adverso lo ejercen estos productos tanto en los antagónicos como en organismos que ayudan a mantener dinámicas poblacionales en los ecosistemas (Guédez et al., 2008; Mora, 1996; Nicholls, 2008).

Según Pal y Gardener (2006); Hanson y Gauld (2006); Saba et al. (2012), se entiende por "combate biológico" la utilización de organismos naturales o genéticamente modificados, para reducir efectos de agentes perjudiciales en cultivos agrícolas. Esta alternativa pretende mitigar las poblaciones de organismos plaga, reduciéndolas a niveles inferiores al umbral económico, para evitar pérdidas económicas. Por su parte, Rogg (2000) y Pal y Gardener (2006), describen

el "Combate Biológico" en fitopatología como la utilización de antagonistas microbianos para suprimir enfermedades en las plantas.

En *F. solani* se han realizado algunas investigaciones bajo la premisa de "combate biológico", utilizando organismos como: *Paenibacillus lentimorbus*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus amyloliquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* y *Trichoderma* spp. (Bettiol et al., 2014; González et al., 2004).

2.5 *Trichoderma* spp.

3.5.1 Generalidades

Trichoderma spp. es un hongo anaeróbico facultativo oportunista, se desenvuelve naturalmente en muchos tipos de suelos agrícolas y forestales, (Chaverri y Samuels, 2003; Cholango, 2009). Existen más de 50 especies descritas, sin embargo; existe gran número de especies por describir. Muchas de estas especies con potencial importante en la agricultura, pues podrían presentar características idóneas para ser utilizadas en el combate biológico de hongos de importancia agrícola (Chaverri et al., 2003; Chaverri, P. y Samuels, 2003., Ezziyyani et al., 2004; Romero et al., 2009).

Trichoderma spp. es uno de los organismos antagonistas de hongos fitopatógenos más estudiado; aspectos importantes facilitan su estudio e investigación, como la facilidad y rápido desarrollo en condiciones de laboratorio, rápido colonización en distintos tipos de sustratos (Quiroz et al., 2008; Sivila y Alvarez, 2013). Su propagación es posible por intermedio de hifas, esporas o conidios y clamidosporas. Esta última tiene importancia debido a su capacidad de prevalecer en condiciones adversas de clima como, altas temperaturas, sequia, exceso de agua, luz y otros. Estas esporas presentan una pared gruesa constituida por la endospora, epiospora y perispora, protegen el interior del conidio (protoplasto) (Sivila y Alvarez, 2013). Las especies de *Trichoderma* tienen una alta capacidad reproductiva, plasticidad ecológica y un efecto

estimulante sobre los cultivos, además de protegerlos ante hongos fitopatógenos; también mejoran la absorción de micronutrientes y activa las defensas en las plantas (Cholango, 2009).

El amplio efecto antagonista de este hongo obedece a los mecanismos tan variados que posee para ejercer su efecto sobre los patógenos. Tiene la capacidad de degradar enzimáticamente (proteínáceas y quitinasas) la pared celular de los hongos que ataca, produce antibióticos (metabolitos secundarios), inhibe el crecimiento micelial (Aceve et al., 2004), degrada la membrana celular, hiperparasita las hifas de su hospedante y compite por nutrientes y espacio (Cobos, 2010; Guigón y González , 2004; Hernández y Rangel, 2012). También Infante *et al.* (2009) sostienen que *Trichoderma* sp, desactiva enzimas del patógeno producidas para atacar las plantas, produce resistencia inducida; compite por alimento, agua y/o espacio (Pavone, 2012).

3.5.2 Taxonomía

Trichoderma spp. se reportó por primera vez en el año 1964. Person describió cuatro especies; en 1969 Rifai informó sobre nueve especies más y a partir de ese momento las especies registradas aumentaron. Actualmente se han descrito más de 50 especies (Kuhls et al., 1997; Samuels, 1996). Es importante recalcar que se han identificado más de 200 especies de *Hypocrea*; pero no es posible describirlos hasta que el anamorfo (*Trichoderma* spp.) sea identificado, esta situación deja entrever que faltan especies por identificar (Chaverri *et al.* 2003).

Según Agrios (1997), Chaverri y Samuels (2003), Priscila Chaverri et al. (2004) y Romero et al. (2009), la clasificación taxonómica para *Trichoderma* es la siguiente:

Reino:	Fungi
Phyllum:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i> spp.

3.5.3 Descripción morfológica

Trichoderma spp. presenta conidios con pigmentos de color verde brillante o blancos, esporulación densa; conidióforos pobremente definidos y ramificados (similar a un pequeño árbol). Las fiálides forman esporas asexuales o conidios, con capacidad de emerger directamente del micelio. La mayoría de especies de *Trichoderma* spp. producen clamidosporas que permanecen latentes en el medio durante mucho tiempo (Infante et al., 2009; Pavone, 2012).

3.5.4 Importancia de *Trichoderma* spp. para el combate biológico

Trichoderma spp. tiene importancia en el combate biológico por su capacidad suprimir organismos que afectan plantas agrícolas; también es motivo de investigación por su gran diversidad, combate eficaz, capacidad reproductiva y rápido crecimiento, plasticidad ecológica e inductor de resistencia en plantas contra organismos que la afectan negativamente.

En el mercado existen diferentes formulaciones de *Trichoderma* spp., pero su efecto es desfavorecido por los distintos microclimas donde se encuentran los campos agrícolas, alterando la eficiencia antagonista; así mismo algunas especies son específicas de ciertos agentes que

causan enfermedades en las plantas, por esta razón es necesaria la búsqueda de cepas nativas de *Trichoderma* spp., con capacidad de adaptarse al clima y al patógeno.

Según Guigón y González (2004) las formulaciones comerciales de *Trichoderma* spp. presentan ciertos inconvenientes: muestran dificultad para persistir en el suelo, por factores como la genética de los aislamientos; poca capacidad de adaptación a condiciones ambientales y baja especificidad antagonista-fitopatógenos.

Cepas nativas de *Trichoderma* spp. tienen ventaja para combate biológico, se establecen fácilmente en los ecosistemas por su adaptación a las condiciones ambientales, por encontrarse en su ambiente, con alta capacidad de colonización en sustratos, facilitando antagonismo sobre organismos fitopatógenos (Moya et al., 2014).

3.5.5 Principales mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

➤ Competencia

Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato o nutriente), esta condición se da siempre y cuando la utilización de dicho requerimiento por uno de los organismos reduce la disponibilidad (cantidad o espacio) para los demás (Ahmad y Baker, 1987; Infante et al., 2009; Sivila y Álvares 2013). Una situación ideal para que se de competencia es la escasez de un elemento, la competencia más común se da por nutrientes, oxígeno o espacio, en el caso de *Trichoderma* spp. su importancia radica en la competencia por nutrientes, sustrato y carbono (Cano et al., 2004; Guigón y González, 2004; Sivila y Alvarez, 2013).

➤ Antibiosis

Acción de organismos utilizando compuestos metabolitos secundarios o enzimas hidrolíticas, tóxicos para otros organismos, inhiben las actividades celulares de los organismos que perjudica; impidiendo crecimiento micelial de otros hongos. Estas sustancias tienen la

particularidad de actuar en concentraciones bajas (menores a 10 ppm) (Infante et al., 2009; Sivila y Alvarez, 2013).

Trichoderma spp produce este tipo de compuestos, volátiles y no volátiles, perjudicando el desarrollo de organismos. Estos compuestos son de tipo antibiótico como, viridina β -1,6-glucanasas, trichodermina, furanona, quitinasas, glioviridin, 6-(pent-1-enil)- α -pirona, 6pentil- α -pirona (6PAP), glucanasas, trichorziaminas, proteasas, β -1,3-glucanasas, gliovirinagliotoxina y harzaniolide. Las concentraciones, los antibióticos y la capacidad de inhibir varían según la especie de *Trichoderma* spp. (Bruce et al., 1995; Cano et al., 2004; Colina et al., 2009; Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; González, 2011; Sivila y Alvarez, 2013).

➤ **Micoparasitismo**

Micoparasitismo es la interacción directa entre un antagonista (en este caso *Trichoderma* spp.) con un patógeno (*F. solani* por ejemplo), lo cual implica contacto físico, con síntesis e hidrólisis de enzimas, liberación de compuestos antibióticos tóxicos (Benítez et al, 2004).

Este mecanismo involucra eventos de forma secuencial como, reconocimiento, ataque, penetración y la muerte del huésped o patógeno. *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de ejercer este tipo de combate directo en el ambiente, en una diversidad importante de hongos, entre ellos *F. solani*. (Benítez et al., 2004; Carsolio et al., 1999).

➤ **Inducción de resistencia y promoción de crecimiento**

La mayoría de las plantas posee la capacidad de responder ante ataque de una plaga, lo cual se le conoce como inducción de resistencia. *Trichoderma* spp. beneficia a las plantas aumentando esta condición, capaz de activar un mecanismo nativo de defensa, conocido como Inducción de Resistencia Sistémica (IRS), genera en las plantas una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. Esta situación limita el crecimiento y ataque del patógeno durante su fase parasítica (Cano et al., 2004; García et al., 2006; Martínez et al., 2013; Yedidia et al., 1999).

Existen distintos reportes sobre la capacidad de *Trichoderma* spp. para inducir el crecimiento vegetal al degradar el epispermo de las semillas e interviene en los procesos respiratorios cuando se lleva a cabo la germinación, acelera el desarrollo de tejidos meristemáticos primarios y por ende las plantas aumentan volumen y altura (Abd-El Moity, 1982; Gravel et al., 2007; Hernández et al., 2011; Shores y Harman, 2008).

Trichoderma spp. secreta fitohormonas como el ácido Indol Acético que estimula la germinación, crecimiento y desarrollo radicular, mejora la asimilación de nutrientes e influye sobre el crecimiento vegetativo de algunas plantas (Cupull et al., 2003; Gravel et al., 2007; Harman, 2006; Harman et al., 2004; Hernández et al., 2011; Vinale et al., 2012; Windham et al., 1986).

Posee un tipo de simbiosis avirulenta con distintas plantas, actuando en la mayoría de los casos como antagonista de hongos y bacterias fitopatógenas, restringiendo el crecimiento y desarrollo de invertebrados como insectos y nematodos e incluso arvenses (malezas) (Hernández y Rangel, 2012).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Localización de las áreas de estudio

Las plantas de *P. scuterallia* infectadas por *F. solani* y las muestras de suelo donde se aislaron las cepas de *Trichoderma* spp. fueron colectados en el distrito de La Tigra, San Carlos, provincia de Alajuela (caserío: San Gerardo); específicamente en la finca Agrícola Ganadera Azaria María S.A. empresa productora de aralias, coordenadas geográficas N10.33190 // O 84.59672.

Esta zona presenta una altura de 522 m.s.n.m, con promedios de precipitación de 3000 mm/año, las temperaturas oscilan entre los 26 y 30 grados centígrados, la humedad relativa varía entre 80-90 % (Mora et al., 2007).

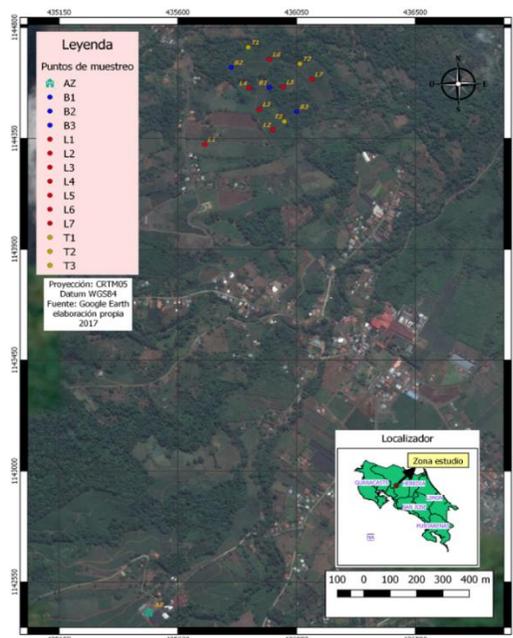


Figura 3. Zona de estudio, La Tigra de San Carlos. En la imagen se observa la planta de empaque de la finca (AZ), así como el área de cultivo.

6.2 Recolección de suelo para el aislamiento de *Trichoderma* spp.

Las respectivas muestras de suelo fueron tomadas en parcelas cultivadas de aralia fabian (*P. scuterallia*), tacotales y bosques aledaños al cultivo (Figura 4). La recolección de las muestras en parcelas, tacotales y bosques se realizó utilizando la técnica en zig-zag. Este tipo de muestreo que pretende homogenización del área de estudio, de manera que sea significativamente representativo.

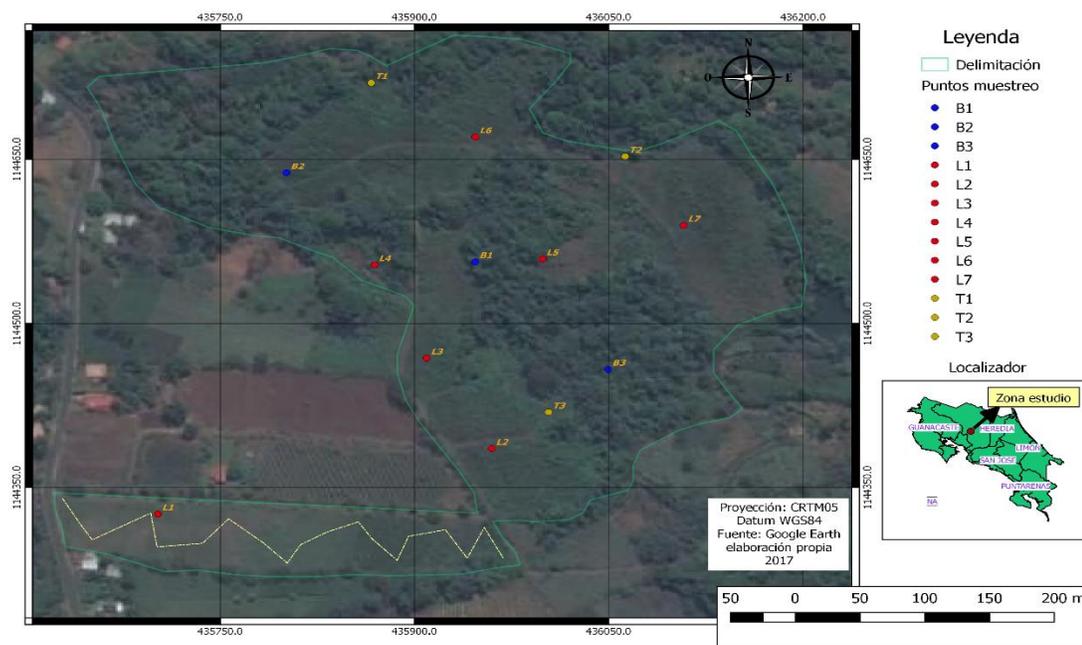


Figura 4. En la imagen se puede observar el área de cultivo (L), bosque (B) y tacotal (T), donde se colectaron las muestras para los aislamientos del hongo *Trichoderma* spp., L1 representa la técnica de muestreo en zig-zag.

El suelo fue extraído con un palín (20-30 cm) y el material fue colocado en una cubeta. En cada punto de muestreo, se tomaron submuestras (15 por punto de muestreo). Cada muestra final se colocó sobre un plástico, se realizó la técnica de cuarteo para homogenizar y obtener una muestra final de un kilogramo por lugar de muestreo de un lote, boque o tacotal.

Cada muestra final se colocó en bolsas plásticas, rotuladas y guardadas en una hielera, con el propósito de conservarlas frescas; se llevaron al laboratorio de fitopatología de la UNA.



Figura 5. Diferentes zonas donde se recolectaron muestras de suelo para aislar *Trichoderma* spp. a) Cultivo, b) bosque, c) tacotal y homogenización de las submuestras de suelo.

6.3 Recolección de las plantas enfermas

Las plantas enfermas se recolectaron en invernaderos. El procedimiento consistió en identificar y coleccionar las plantas enfermas con síntomas y signos de *F. solani*, se empacaron individualmente en bolsas rotuladas; se almacenaron en hieleras y se trasladaron al laboratorio de la UNA.

6.4 Etapa de laboratorio

Los aislamientos de los hongos antagonistas y el patógeno; así como las pruebas de antagonismo *in vitro*, se realizaron en condiciones asépticas en el laboratorio de fitopatología de la Escuela de Ciencia Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), ciudad de Heredia.

6.5 Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a través de la técnica de diluciones seriadas

Cepas nativas de *Trichoderma* spp. fueron aisladas de muestras de suelo cribadas e homogenizadas para obtener submuestras de 10 g. Luego se añadieron 90 ml de agua destilada a cada submuestra de suelo (solución madre) y se agitaron durante 20 min en vortex (150 rpm). Una alícuota de 1 ml de solución madre se diluyó en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril. Este procedimiento se realizó cinco veces consecutivas (de 10^{-1} a 10^{-6}) (Figura 6).

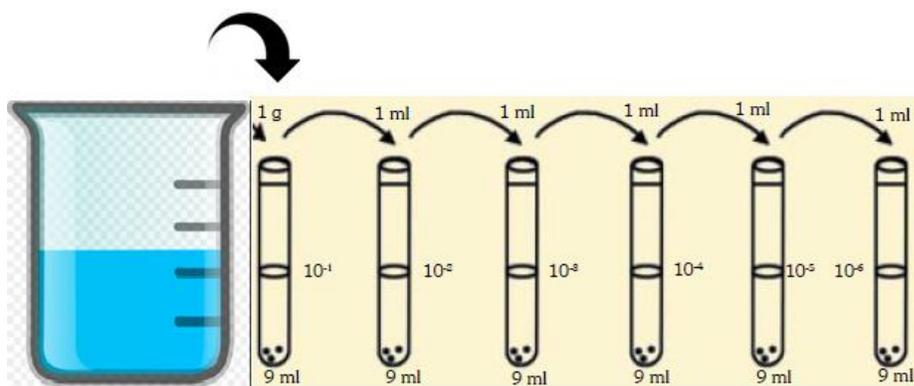


Figura 6. Procedimiento para preparación de diluciones seriadas.

Nota. Fuente: Monzón 2001.

Se utilizó el contenido de los últimos tres tubos, 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . A cada dilución se extrajo tres alícuotas de 0,25 ml, colocadas en tres platos Petri (con Papa Dextrosa Agar (PDA) + ácido láctico al 25 %). Cada alícuota colocada en un plato Petri, fue dispersada en la circunferencia del plato con la ayuda de un asa de Drigalski.

Cada plato Petri se rotuló y selló con papel "parafilm", se incubaron a temperatura ambiente hasta observar colonias con características asociadas al crecimiento de *Trichoderma* spp. (Cañedo y Ames, 2004; Mózon, 2001; Santana y Poncio, 2011). Las colonias obtenidas se purificaron con el fin de tener la certeza de su estado puro de cada colonia.

6.6 Aislamiento de *Fusarium solani*

Para el aislamiento de *F. solani* se procedió a extraer tejido de plantas de *P. scutellaria* con síntomas manifiestos del patógeno. A este material se le realizó un lavado superficial con agua, eliminando residuos de sustrato adheridos a la parte afectada de las plantas. Se realizaron cortes pequeños de tejido enfermo, desinfectados superficialmente con alcohol al 75% por 30 segundos, hipoclorito de sodio al 0.5% durante un minuto y se efectuaron dos lavados con agua destilada estéril eliminando el exceso de sustancias utilizadas anteriormente, los cortes fueron colocados en cajas Petri con PDA acidificado con ácido láctico al 25%. Cada plato Petri con tejido enfermo se incubaron por ocho días a temperatura ambiente (24 °C), hasta observar el crecimiento micelial del patógeno.

Colonias identificadas como *F. solani*, por medio de características morfológicas fueron purificadas en medio PDA acidificado (Márquez et al. 2002; Nina et al, 2011).

6.7 Cultivos monospóricos de *Trichoderma* spp. y *F. solani*

Se prepararon 10 ml de agua destilada estéril, agregándole una pequeña cantidad de micelio de las colonias, para liberar esporas utilizando un asa esterilizada, obteniéndose una suspensión diluida de cada aislamiento. Para facilitar la separación de las esporas se utilizó "Tween 80".

Con una micropipeta se extrajo una gota de la suspensión y se colocó en un plato Petri con agar agua al 3%, esta práctica se realizó por duplicado a cada aislamiento, las placas se incubaron por 18 horas hasta observar la producción de tubos germinativos por parte de las esporas. Se utilizó un estereoscopio para seleccionar y extraer las esporas germinadas, colocadas nuevos platos Petri con PDA y se incubaron originando un cultivo a partir de un solo conidio (Castellanos et al., 2011; French y Hebert, 1980). Con esta técnica fue posible asegurar la homogeneidad genética del cultivo de estos organismos en estudio.

6.8 Pruebas de antagonismo *in vitro*

Ensayos de antagonismo para *Trichoderma* spp. sobre *F. solani*, se efectuaron utilizando la técnica de cultivos duales (en medios estériles). Colocándose en los extremos de cada caja Petri, discos de 5.0 mm de diámetro. En un extremo se colocó un disco con un medio de cultivo del hongo antagonista y en el otro extremo el disco con el hongo patógeno (Figura 1).

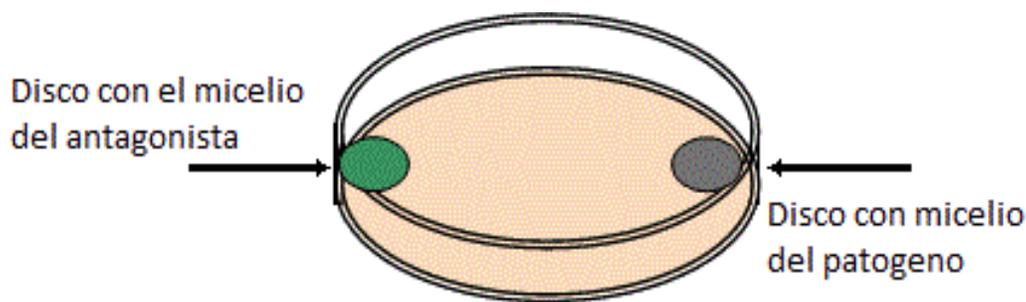


Figura 7. Caja Petri mostrando como se colocaron los discos (5.0 mm) con *F. solani*; y con *Trichoderma* spp.

Nota. Fuente: Castillo 2015.

6.9 Competencia por sustrato

Para medir la competencia por sustrato se tomaron en cuenta los siguientes tres criterios:

a) escala de (Bell et al., 1982): el antagonista sobrecrecerá completamente sobre el patógeno y cubrirá totalmente la superficie del medio (I); el antagonista sobrecrecerá las dos terceras partes de la superficie del medio (II); antagonista y patógeno colonizarán cada uno

aproximadamente la mitad de placa de Petri (III); el patógeno colonizará, dos terceras partes de la superficie del medio (IV); y el patógeno sobrecrecerá completamente sobre el antagonista y ocupará por completo el medio de crecimiento (V); (b) tiempo en que el antagonista y el fitopatógeno entran en contacto (velocidad de colonización del antagonista y, (c) crecimiento radial (CR) en centímetros de los aislamientos de *Trichoderma* spp.

6.10 Antibiosis

Se evaluó el efecto antibiótico de los antagonistas con respecto al patógeno, para medir este parámetro se utilizó la fórmula planteada por Skidmore y Dickinson (1976); Royse y Ries (1978). Mide el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), en este caso el porcentaje de inhibición por parte de *Trichoderma* spp. sobre *F. solani*.

La fórmula plantea lo siguiente:

$$\text{PIC} = [(C1 - C2) / C1] \times 100$$

Donde C1 es el crecimiento radial del *Trichoderma* spp. y C2 el crecimiento radial del patógeno en la técnica por cultivo dual.

6.11 Diseño experimental

Se utilizó un diseño totalmente al azar, un total de diez repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en utilizar cajas Petri de 9,0 cm de diámetro con PDA, a cada caja se le colocó un disco de 5,0 mm con el hongo antagonista (*Trichoderma* spp.) en un extremo y en el otro extremo un disco con *F. solani* (Figura 7).

Los resultados obtenidos en los experimentos del PIC y CR, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$), con el fin de determinar si en los tratamientos se generaron diferencias significativas, se compararon a través de pruebas de Tukey utilizando el paquete Infostat Estudiantil.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento de *Fusarium solani*

Los aislamientos realizados a partir de tejido enfermo, recolectado en la plantación de *P. scutellaria*, produjeron las típicas colonias de *F. solani*, identidad que se confirmó con el respectivo examen bajo el microscopio. El material obtenido en el campo, manifestaba los síntomas característicos de la enfermedad según lo describen (Mnif et al. (2015); Pastrana et al. (2016); Toghueo et al. (2016): manchas pardas, crecimiento micelial y tejido necrótico en tallo y médula.



Figura 8. Plantas infectadas por *F. solani* y otros agentes oportunistas.

Fusarium solani se caracterizó por mostrar un rápido crecimiento y por la coloración blanco rosáceo típica de este patógeno en el medio de cultivo utilizado (Figura 9).

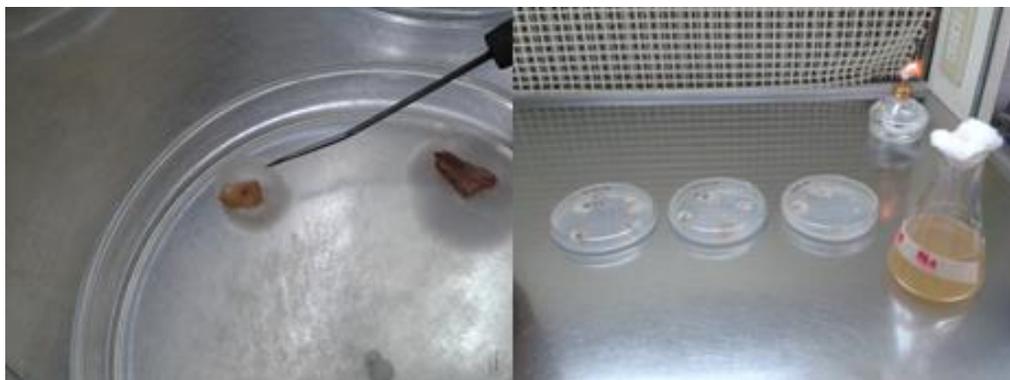


Figura 9. Aislamiento de *F. solani* en condiciones de laboratorio.

Microscópicamente se observó una densa concentración de microconidios hialinos septados y de forma ovalada, también pudo apreciar fiálides hialinas y micelio septado (Figura 10).

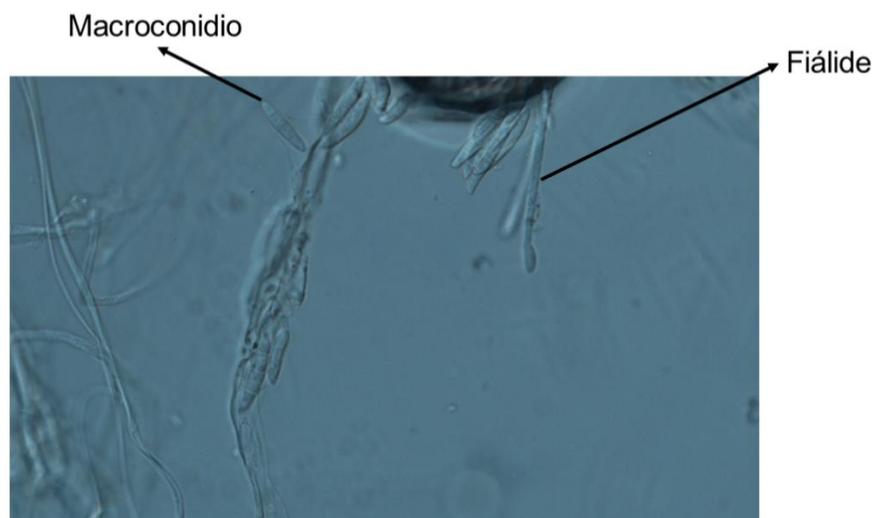


Figura 10. Principales características morfológicas de *F. solani*. En la imagen se observan, macroconidios, fiálides y micelio septado (foto, utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i, 40x).

De acuerdo a Dueñas et al. (2007) y Vargas (1992), en laboratorio a partir de los siete días *F. solani* desarrolla micelio. En el presente experimento se verificó presencia de micelio a los siete días, presentando coloraciones de blanco a púrpura, lo cual concuerda con el tiempo promedio para el desarrollo de micelio en condición de laboratorio; así como con las coloraciones

características, obtenidas por Cholango (2009), quien observó en *F. solani*, micelio blanquecino; y estructuras como macroconidios, fiálides alargadas y micelio septado.

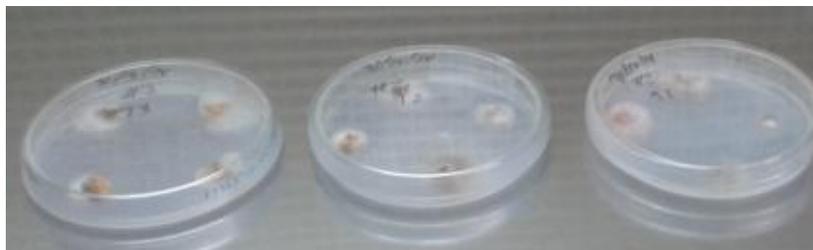


Figura 11. Crecimiento de *F. solani* mostrando coloración blanco-rosáceo.

7.2 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron obtenidos a partir de muestras de suelo, recolectadas en campo (cultivo, tacotal y bosque), proceso que produjo un total de 15 aislamientos para su evaluación (Tabla 1).

Tabla 1. Total de aislamientos de *Trichoderma* spp. por sitio de muestreo en cultivo, bosque y tacotal.

Sitio de muestreo	Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.
Cultivo	L1, L2
Tacotal	T1, T2, T3
Bosque	B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10

El mayor número de aislamientos de *Trichoderma* spp. fue en suelos de bosques (66, 6%) (Tabla 1), mostrando mas abundancia en estos ecosistemas (dinámica poblacional); factores como, temperatura, humedad, alto contenido de materia orgánica, densidad aparente, disponibilidad de nutrientes, pH, concentración de elementos minerales, adecuados para el

desenvolvimiento de microorganismos inciden en la presencia de estos organismos en el suelo (Lange et al., 2014; McDaniel et al., 2014; Philippo et al., 2013). La actividad agrícola causa impactos negativos sobre las poblaciones de microorganismos debido a condiciones desfavorables para el desarrollo de los mismos, afectando condiciones ideales para el crecimiento de los organismos (Ferrigo et al., 2014; Küçük, 2017; Wagg et al., 2014; Zhalnina et al., 2014), por lo tanto, su diversidad también es reducida.

Trichoderma spp. es tolerante a ciertos fungicidas químicos (Benítez et al., 2004; Cholango, 2009; Cruzat et al., 2008; Guerrero y Arias, 2015), a pesar de pocos organismos en muestras de suelo provenientes de áreas de cultivo y tacotal, se obtuvo cinco aislamientos (Cuadro 1), indicando que son hongos con capacidad de tolerar medios alterados por la actividad agrícola.

Cruzat y Ionannidis, (2008); Pfenning y de Abreu, (2000); Samaniego y Chew, (2007), informan sobre la presencia de colonias de *Trichoderma* spp. en suelos agrícolas intensivos, a pesar de que existen condiciones desfavorables para su desarrollo, indicando que algunos individuos tienen la capacidad de adaptarse y sobrevivir en estos, lo cual explicaría la presencia de *Trichoderma* spp en las muestras obtenidas a partir de suelos procedentes de cultivos y tacotales.

Evans et al. (2003), determinaron en sistemas agroforestales, la relación entre la presencia de colonias de *Trichoderma* spp. con hongos de los géneros: *Clonostachys*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon* y basidiomicetos no identificados, muchos de estos organismos son fuentes de alimento para hongos antagonistas, lo cual indicaría mayor presencia de especies de *Trichoderma* spp. en el bosque.

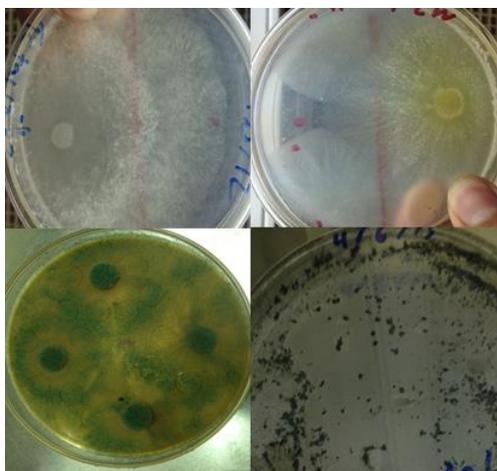


Figura 12. Diferentes aislamientos de *Trichoderma* spp utilizados en las pruebas *in vitro*.

7.3 Identificación de *Trichoderma* spp.

La identificación de *Trichoderma* spp. fue realizada con base a características morfológicas como: color, forma de crecimiento y estructuras macroscópicas. Los aislamientos presentaron esporulación de diferentes coloraciones, tonalidades blanquecinas, verde oliva, amarillo pastel, amarillo verdoso (Figura 13), todas las colonias mostraron rápido crecimiento, esporulación abundante, estas características concuerdan con las descripciones realizadas por (Howell, 2003; Moya et al., 2014; Samuels, 2006), donde describen las mismas coloraciones en estos microorganismos, además de su rápido crecimiento.



Figura 13. Diferentes coloraciones presentes en las colonias de *Trichoderma* spp aisladas.

7.4 Principales características microscópicas de *Trichoderma* spp.

Preparaciones microscópicas a partir de colonias de *Trichoderma* spp. permitieron observar estructuras como: conidióforos hialinos ramificados, micelio septado, presencia de fiálides simples y/o en grupos, conidios en su mayoría globosos hialinos o con color (unicelulares de 3 a 5 μm) (con coloraciones por lo general verdes), conidióforos no verticilados solitarios o en grupos. Todas estas estructuras concuerdan con reportes sobre *Trichoderma* spp. descritos por distintos autores (Martínez et al., 2013; Michel et al., 2009; Samuels, 2006).

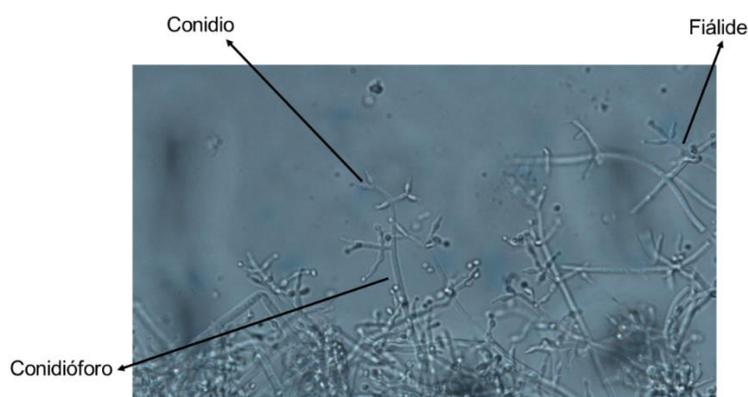


Figura 14. Estructuras microscópicas de *Trichoderma* spp., conidios, fiálides y conidióforos (foto, utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i, 40x).

7.5 Pruebas de antagonismo

Las evaluaciones de antagonismos entre *Trichoderma* spp. y *F. solani* fueron realizadas a las 96 h (cuarto día). De acuerdo a Michel et al. (2009); Abo et al. (2014) y Küçük (2017), el periodo de colonización en placas Petri de *Trichoderma* spp, ocurre entre los tres y cuatro días; debido a esto fueron evaluadas las pruebas de antagonismo a las 96 h de inoculación.

7.5.1 Evaluación de competencia por sustrato

7.5.1.1 Escala de los cinco principios para evaluar competencia por sustrato de Bell et al. (1982).

Quince aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron antagonismo sobre *F. solani* (Tabla 2), según la escala propuesta por Bell et al. (1982), organismos en categoría I, II, y III, se consideran antagonistas por presentar competición igual o superior al 50%, sobre hospederos. Un 86,6% de los aislamientos mostraron competición superior al 50%, la mayoría (66,6%), expresando competición tipo I, 100% de competición por sustrato sobre *F. solani*.

Tabla 2. Categoría antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *F. solani*, según los cinco criterios propuestos sobre Bell.

Categoría ^a	Aislamiento
I	B2, B4, B5, B6, B7, B8, L1, T1, T2, T3
II	B1, B3, B9
III	B10, L2
IV	^b NR
V	^b NR

Nota. Categoría: I) antagonista colonizó toda la superficie, redujo el patógeno, II) antagonista colonizó 2/3 partes del Plato Petri, III) el antagonista y patógeno colonizaron 50% del medio, IV) patógeno colonizó 2/3 de la superficie; V) patógeno colonizó el total del medio. ^bNo Registrado.

Diez aislamientos de *Trichoderma* spp. en categoría I (66,6%), son promisorios contra el patógeno en estudio. Reportes realizados por Aceves et al., (2001); Arzate et al., (2006); Michel et al. (2009) en suelos de Yucatán y Guerrero (México), donde aislaron distintas especies nativas de *Trichoderma* spp. para probarlos contra *Fusarium* sp., obtuvieron pocos aislamientos en

categoría I y II, indicando que existen porcentaje importantes de antagonistas promisorios en este trabajo, donde la mayoría se ubicaron en categoría I y II.

Cholango (2009) estudió especies de *Trichoderma* spp. contra cinco aislamientos de *Fusarium* sp., en 96 h registró que los antagonistas emplearon hiperparasitismo, penetrando y alimentándose de hospedero a través de las hifas, pero hasta el séptimo día los organismos alcanzaron las categorías I y II. Los organismos analizados en este trabajo mostraron mayor velocidad de colonización sobre *F. solani*; al cuarto día, todos organismos micoparasitaron y el 73% presentaban categorías I y II, indicando que los aislamientos; además de presentar competición por sustrato y alimento; podrían estar presentando mecanismos de acción como antibiosis e hiperparasitismo sobre *F. solani*, facilitando la colonización en este patógeno (Machado et al., 2012).

Uno de los mecanismos empleados por organismos como *Trichoderma* para ejercer su efecto antagonico ante diversos patógenos es el micoparasitismo. En diferentes investigaciones de Martínez et al. (2013); Michel et al. (2009); Suárez et al. (2008), determinaron que existe interacción entre el antagonista y el fitopatógeno, donde el primero produce un parasitismo hifal al tener contacto físico con el patógeno, y una vez reconocido el hospedero son accionados mecanismos para degradar y colonizar el patógeno, facilitando la alimentación del mismo. En el presente trabajo se observó que las cepas de *Trichoderma* spp. ubicadas en categoría I, II, y III (Tabla 2) tuvieron contacto con *F. solani*, indicando que posiblemente *Trichoderma* spp. afectó negativamente el crecimiento de *F. solani* por micoparasitismo, donde creció quimiotrópicamente hacia el hospedante, adhiriéndose a las hifas, enrollándose y penetrándolas para alimentarse del contenido celular *F. solani*.

Trichoderma spp. para micoparasitar requiere reconocer el hospedante, a través de procesos enzimáticos (metabolitos secundarios), dirigiendo el crecimiento hacia este degradando la pared celular al entrar en contacto, sin embargo; los antagonistas pueden enfrentar mecanismos de resistencia por parte del patógeno, utilizado para evitar ser atacados, degradados y consumidos,

ocasionando diferentes tasas de colonización por parte de los antagonistas. La capacidad que tiene *Trichoderma* spp. para romper las defensas del hospedero va depender para que ocurra micoparasitismo completo (Benítez et al., 2004; Fernández y Suárez, 2009; Martínez et al., 2013; Michel et al., 2009; Pal y Gardener, 2006; Suárez et al., 2008), por tanto, es posible que los aislamientos de *Trichoderma* spp. enfrentando *F. solani* en este experimento interactuaron con poca resistencia por parte de patógeno, o bien los mecanismos utilizados por el antagonista fueron suficientes para evadir dicha resistencia mostrando parasitismo en todos los tratamientos, donde el 60% de los aislamientos evidenció parasitismo completo al enfrentar a *F. solani* (Tabla 2).

Ante competencia por nutrientes *Trichoderma* spp. suele presentar ventajas en la degradación de sustancias del medio, para así disponerlos para su alimentación. Al movilizar y absorber nutrientes aumenta la tasa de obtención de ATP al metabolizar sacáridos (celulosa, glucano y quitina), esta digestión es permitida por enzimas de asimilación, permeasas; así como proteínas modificadas presentes en la membrana y pared celular (Benítez et al. 2004; Reyes et al. 2008). Es posible que los aislamientos de *Trichoderma* spp. utilizados en los ensayos, presenten tasas de asimilación de nutrientes mayores en competencia contra *F. solani*, lo cual respaldaría la alta colonización de estos organismos en el medio.

Castillo (2015), evaluó la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. contra *Phytophthora nicotianae*, obteniendo a las 96 h 64% en categoría I y el 28% en categoría II. Al utilizar los mismos antagonistas contra *F. oxysporum*, al cuarto día, 36% compartían categoría I y el 54% en categoría II, esta particularidad se le atribuye a que *Trichoderma* spp. responde a un antagonismo diferencial con distintos patógenos; presentando mecanismos de control, donde especies de *Trichoderma* presentan mayor o menor capacidad dependiendo del organismo que ataquen (Küçük, 2017; Sharma et al., 2017). Para efectos de este estudio, la alta colonización de *Trichoderma* spp. puede obedecer a un antagonismo diferencial ante *F. solani*, facilitando la competencia por sustrato al presentar mayor control, de acuerdo a Reithner et al., (2011), el

antagonismo diferencial puede obedecer a expresiones genéticas codificadas en cada especie de *Trichoderma* spp. (genes relacionados con micoparasitismo), dependiendo de huésped en las interacciones micoparasitarias, así será el efecto inhibitor, por tanto; es posible que las expresiones genéticas de *Trichoderma* spp. estudiadas contra *F. solani* afecten negativamente el desarrollo del patógeno

7.5.1.2 Crecimiento radical (CR)

El CR de los aislamientos T2 y T3 fue del 100%, cubrieron completamente la placa Petri (9 cm) a las 96 h de incubación. B1, B3 y B10 presentaron los valores más bajos de CR (~5,65 cm) (Figura 15).

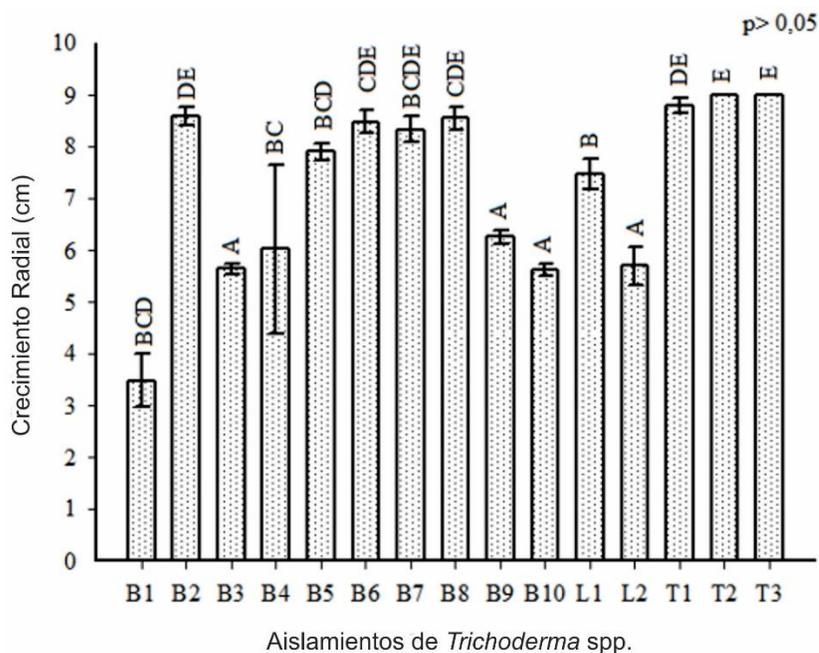


Figura 15. Crecimiento Radial (CR) de aislamientos de *Trichoderma* spp. en pruebas de antagonismo in vitro contra *Fusarium solani*.

Cholango (2009) en diferentes ensayos utilizó especies nativas de *Trichoderma* spp. contra cinco especies de *Fusarium* spp. (entre ellos *F. solani*). Los antagonistas al cuarto día alcanzaron valores de 3.27 cm y 3.41 cm de CR. Los aislamientos T2 y T3 a las 96 h superaron esos valores

(9 cm), colonizaron por completo el plato Petri (creciendo sobre el patógeno). B10, B3 y L2 alcanzaron los valores más bajos; pero al cuarto estos habían superado los 5 cm, mostrando capacidad antagonista, aunque con menor eficiencia. De acuerdo a Ahmed et al. (2003) se puede deber a un efecto de hiperparasitismo relacionado a un evento de inhibición de crecimiento de *F. solani*, producto de los antibióticos y enzimas producidas por *Trichoderma* spp. importantes para efectuar micoparasitismo.

Los organismos evaluados en este estudio, mostraron un efecto antagónico al competir contra *F. solani*. Los mayores valores de CR fueron obtenidos por los aislamientos T2 y T3, posiblemente por presentar mayor capacidad de ataque para romper las defensas de *F. solani*, colonizando por completo las placas Petri. Estudios respaldados por, Küçük (2017); Marzano et al. (2013) y Sharma et al. (2017), muestran que algunos patógenos presentan diferentes grados de resistencia ante *Trichoderma* spp. liberando enzimas, metabolitos secundarios y ácidos (ácido fusárico y ácido piridincarboxílico) para protegerse, lo cual sería una posible respuesta al hecho de que algunos aislamientos no consiguieron colonizar por completo la placa Petri sobre *F. solani* (Abo ., 2014; Dubey et al., 2007; Kim y Knudsen, 2013).

Aceves et al., (2001); Matarese et al., (2012), estudiaron *Trichodema* spp. con capacidad de colonizar el sustrato sobre colonias de *Fusarium* sp. La producción de micotoxinas impidió el desarrollo de *Fusarium* sp. Los 15 aislamientos evaluados mostraron comportamiento antagonista en diferentes grados a las 96 h sobre *F. solani*, lo cual podría indicar que estos organismos tienen actividad micoparasitaria, mediadas por la acción de micotoxinas sobre *F. solani*.

En un ensayo realizado por Kim y Knudsen (2013), donde evaluaron el efecto antagónico de *T. harzianum*, sobre *F. solani*, el antagonista inhibió el crecimiento del patógeno hasta el momento de contacto (cinco días); pero a partir de este periodo no mostró micoparasitismo. Estos autores clasificaron la interacción, como competencia de interferencia. Con respecto a esta información se destaca el comportamiento antagonista de los organismos estudiados, indicando

que los aislamientos de *Trichoderma* spp. posiblemente presentaron interferencia por competencia, así como micoparasitismo después de las 96 h, ya que fue en ese periodo donde ocurrió contacto con *F. solani*.

Castillo (2015), evaluó el crecimiento radial de once aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *F. oxysporum*, al quinto día las cepas con los valores más bajos, alcanzaron crecimientos entre los cuatro y cinco centímetros, los organismos con mayor CR, obtuvieron los nueve centímetros. En el presente estudio, los valores más bajos (Figura 15), superan los cinco centímetros y los más altos fueron de nueve centímetros. Comparando estos datos con los de Castillo (2015), ocurre un comportamiento similar, destacándose aquellos antagonistas con valores de nueve centímetros, tal es el caso de T2 y T3. De acuerdo a Ezziyyani et al. (2004) e Infante et al. (2009), esto se puede deber a la capacidad de reconocimiento y desarrollo quimiotrófico relacionada a la respuesta química por parte del antagonista en la exploración de *F. solani* a distancia, lo cual indicaría la posibilidad de que los aislamientos de *Trichoderma* spp. con valores mayores de CR, tienen una respuesta química de reconocimiento rápida, superando los demás organismos.

En los resultados obtenidos fue posible evaluar la capacidad antagonista de los aislamientos. A las 96 h todos habían logrado contacto físico con *F. solani* y a la vez inhibieron su desarrollo. (Reyes et al., (2008), realizaron ensayos para determinar el grado de micoparasitismo de *Trichoderma* spp. Todos los aislamientos evaluados mostraron al menos un tipo de interacción hifal y en algunos casos un mismo organismo presentó tres o más tipos de interacciones hifales, predominando al momento de penetrar el hospedante. Por lo que es posible deducir que los hongos antagonistas estudiados con mayor actividad antagónica ante *F. solani* utilizaron diversos tipos de interacciones al atacar al patógeno (Benítez et al., 2004).

7.5.2 Antibiosis

La inhibición de crecimiento de *F. solani* por aislamientos de *Trichoderma* spp. osciló de 6,1% al 67,1%. El 86% de los aislamientos de *Trichoderma* spp. no superaron el 50% de inhibición de

crecimiento (PIC) sobre *F. solani*, y los valores más altos, 55.6 y 67.1%, fueron observados en los aislamientos B7 y T3, respectivamente (Figura 16).

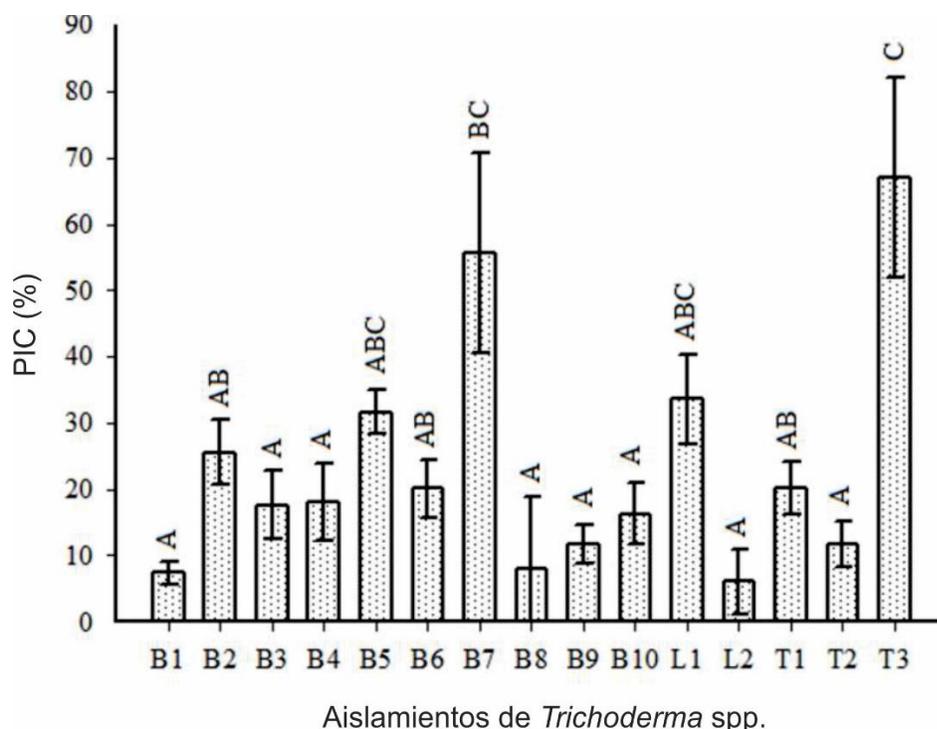


Figura 16. Porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) de aislados de *Trichoderma* spp. en las pruebas de competencia dual in vitro contra aislados de *Fusarium solani*.

Basak y Basak (2011); Marcello et al. (2010); Suárez et al. (2008), a los diez días midieron el PIC de distintas especies de *Trichoderma* spp. contra *F. solani*, todos los tratamientos presentaron un grado superior a 50% de inhibición; sin embargo, los dos mejores valores fueron 70,6% y 65,32%. B7 y T3 (Figura 16), al cuarto día, los valores de inhibición eran de 55,59% y 67,09% respectivamente, son hongos con comportamientos antagónicos importantes, mostrando capacidad inhibitoria en poco tiempo (96 horas). Estudios realizados por Matarese et al. (2012), con *Trichoderma* sp. ante la presencia de *Fusarium graminearum* comprueban que la mayoría de antagonistas que sintetizan quitinasas responden a condiciones micoparasitarias, las cuales se regularizan antes o en contacto con el huésped, su efecto inhibitorio está relacionado con la

concentración de esta enzima. Posiblemente varios aislamientos de *Trichoderma* spp. evaluados, produzcan quitinasas, pero probablemente T3 y B7 sintetizan mayores concentraciones al competir contra *F. solani*.

Basak y Basak (2011) y Castillo (2015), obtuvieron comportamientos similares al evaluar el PIC de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum*, valores entre 30% y 46% de inhibición. En el presente ensayo, los hongos mostraron un rango de inhibición más amplio (de 6% a 67,9%); destacando los que presentaron 55,59% (B7) y 67,09% (T3) de inhibición. De acuerdo con Howell, (2003); Howell (2006); Mukherjee et al. (2012), otras enzimas que influyen en la eficiencia inhibitoria en especies de *Trichoderma* sp. relacionadas con las quitinasas y/o glucanasas, son las enzimas quitinolíticas, importantes en la supresión de patógenos. Estas enzimas descomponen los polisacáridos, quitinas y glucanos, involucrados en la rigidez de las paredes celulares de los organismos que antagoniza, estas actividades enzimáticas podrían estar involucradas en los aislamientos B7 y T3, por mostrar mayor inhibición al enfrentarse con *F. solani*.

Los aislamientos T3 y B7 se destacaron entre los demás, al cuarto día de competencia mostraron cualidades importantes de inhibición. Estos resultados se respaldan, con los obtenidos por (Fernández y Suárez, 2009), quienes evaluaron el efecto antibiótico de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* desde los dos hasta los diez días, encontrado valores inferiores a 70% de inhibición a los diez días de contacto, indicando eficiencia biológica por parte de los antagonistas; probablemente estos dos aislamientos (T3 y B7), además de producir antibióticos, liberan enzimas hidrolíticas, ocurriendo un efecto sinérgico, potenciando el nivel de antagonismo, lo cual explicaría por qué algunos antagonistas mostraron mayor antibiosis que otros sobre *F. solani* (Benítez et al., 2004; Howell, 2003, 2006).

Hernández y Rangel (2012), estudiaron la antibiosis de *Trichoderma* sp sobre *F. oxysporum*, a los siete días los mayores valores de PIC fueron de 60% y 65%, los demás antagonistas mostraron porcentajes inferiores al 50%. Como se observa en la Figura 16, B7 al cuarto día

superó el 50% de inhibición; y T3 alcanzó 67.09%, resaltando la importancia de PIC de estos organismos. Un estudio realizado por Bokhari y Perveen (2012); Hernández et al. (2006), encontraron cierta especificidad en distintos antagonistas de *Trichoderma* spp., al comparar el PIC sobre *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *F. subglutinans*, mostraron diferentes porcentajes de inhibición, en *P. nicotianae* y *R. solani*, pocos organismos superaron el 50% de inhibición; pero contra *F. subglutinans* no sobrepasó el 46% de inhibición. Dos aislamientos fueron las que se destacaron al momento de competir contra *F. solani*, por lo que es posible que exista algún tipo de especificidad por parte de los aislamientos B7 y T3 sobre el *F. solani*.

Muchos autores concuerdan en que la actividad antagónica de *Trichoderma* sp., es efectiva en cuanto involucra diferentes mecanismos, las proteasas actúan sinérgicamente con otras enzimas (como quitinasas, glucanasas), y compuestos como las gliotoxinas, trichodermina. La biosíntesis de estas enzimas en combinación con compuestos inhibitorios es más positivo contra patógeno, al degradar las pared celular del hospedante, los metabolitos secundarios actúan fácilmente sobre la integridad de este y por tanto su efecto de inhibición es potente y rápido, la presencia de estos mecanismos, diferencia la capacidad antagonista de algunos aislamientos de *Trichoderma* ante sus hospederos (Anitha et al., 2014; Marzano et al., 2013; Ramada, et al., 2010; Vargas et al., 2014; Vinale et al., 2012). Por tanto, es posible deducir que la capacidad supresora de B7 y T3 se deba a la interacción de estos mecanismos ante la presencia de *F. solani*.

El antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *F. solani* puede ser explicado por diferentes mecanismos; producción de metabolitos secundarios (6 pentil- α -pirona), enzimas degradadoras (quitinasa, xylasas, celulasas, glucanasa, proteinasas, proteasas, laminarinasas), compuestos antibióticos (fenilethanol, gliotoxina, tirosol, viridina, gliovirina), micoparasitismo (Matarese et al., 2012; Sharma et al, 2017; Zhang et al., 2014). La capacidad de competir por sustrato y presentar actividad antagónica superior al 50% para *F. solani* (Küçük, 2017; Li et al., 2018; Reyes et al., 2008), considerando los hallazgos de los autores citados y los resultados del presente trabajo,

es muy probable que los aislamientos B7 y T3 combinen varias de esas propiedades, destacando en las pruebas realizadas contra *F. solani*.

8 CONCLUSIONES

Quince aislamientos de *Trichoderma* spp. extraídos a partir de suelos de La Tigra de San Carlos, presentaron efecto antagónico sobre *F. solani*, causante de pudrición del tronco en el cultivo de aralia de la misma zona. Los aislamientos B7 y T3 presentaron el mayor PIC y competencia por sustrato contra *F. solani*.

La acción de enzimas utilizadas por *Trichoderma* spp. contra otros organismos, destaca la importancia de quitinasas, proteasas, glucanasas y demás enzimas, por su efecto directo en la supresión de patógenos agrícolas, estas enzimas rompen los polisacáridos responsables de la rigidez de las paredes celulares de los hongos. Por lo que se concluye que tanto los organismos B7 y T3 presentaron mayor potencial antagónico posiblemente por la expresión de estas enzimas, además de metabolitos secundarios y compuestos antibióticos, mostrándose más efectivos que otros organismos evaluados.

Los aislamientos de *Trichoderma* spp. mostraron antibiosis a partir del cuarto día; registrando además parasitismo, ya que hicieron contacto directo con el patógeno, lo cual indica que todas las colonias evaluadas emplearon mecanismos antagónicos al momento de atacar a *F. solani*, sin embargo; B7 y T3 resultaron con características promisorias, lo cual se debe a que emplearon más de un mecanismo, justificándose su estudio para utilizarlos en el combate biológico *F. solani*.

Es importante destacar que la mayoría de los aislamientos evaluados sobre los criterios postulados por Bell et al. (1982), se ubicaron en la categoría I y II, mostrando capacidad como antagonistas de *F. solani*, sin embargo; al ser evaluados en la pruebas de CR, los que obtuvieron mayores valores fueron: B2, B8, B6, B7 y T3; y los que presentaron mejores porcentajes de inhibición fueron: B7 y T3 (ambos ubicados en la categoría I); considerados como organismos promisorio para utilizarlo contra *F. solani*.

El género *Trichoderma* es de mucho interés; existen especies de importancia agrícola, como alternativa para el combate de hongos fitopatógenos, por su capacidad antagónica al utilizar distintos mecanismos para inhibir el desarrollo de estos organismos patógenos. *Trichoderma* puede competir por espacio y nutrientes; además es capaz de micoparasitar, producir enzimas, antibióticos, metabolitos y otros compuestos bioquímicos. A su vez pueden provocar una serie de factores favorables en las plantas, modificando condiciones microambientales, estimulando el crecimiento de las mismas; activando mecanismos de defensa ante ataques de patógenos; modifica el pH de la rizosfera, mejora la disponibilidad de nutrientes y cambia el estado de los elementos tóxicos (no asimilables) (Benítez et al., 2004; Djonović et al., 2006; Hanson y Howell, 2004).

Por tanto, el uso de *Trichoderma* spp. para el combate de *F. solani* es una alternativa a tomar en cuenta, no solo por la capacidad antagonista ante este y otros fitopatógenos; sino por generar una serie de beneficios que mejorarían las condiciones de las plantas de *P. scutellaria* al momento de generar raíz en los invernaderos.

9 RECOMENDACIONES

Es preciso realizar ensayos a nivel de invernadero para determinar el comportamiento de los aislamientos de *Trichoderma* spp. en condiciones donde se desarrolla *F. solani* en plantas de *P. scutellaria*, y así comprobar si la capacidad antagonica tiene un comportamiento similar *in vitro* e *in situ*.

Considerando los trabajos previos de otros autores, sería interesante estudiar el efecto de los antagonistas promisorios (B7, T2 y T3) solos y en combinación, de tal manera que se pueda desarrollar un complejo de microorganismos eficaces como estrategia contra *F. solani*.

Realizar estudios para el uso de estos organismos antagonistas en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), y así poder generar datos sobre la eficiencia y rentabilidad de este tipo de alternativas para el combate de *F. solani* y otros hongos patógenos, y a su vez, comprobar la tolerancia de los hongos antagonistas ante fungicidas químicos o naturales para asegurar que, al momento de utilizarlos con mezclas químicas, el antagonista no se afecte.

Es necesario efectuar estudios en ornamentales de importancia agrícola, ya que es un sector donde hay poca investigación; pero que constituye una importante fuente de divisas para el país.

10 REFERENCIAS

- Abd-El Moity, T. H. (1982). Induction of New Isolates of *Trichoderma harzianum* Tolerant to Fungicides and Their Experimental Use for Control of White Rot of Onion. *Phytopathology*, 72(4), 396. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-396>
- Abo-Elyousr, K. A. M., Abdel-Hafez, S. I. I., y Abdel-Rahim, I. R. (2014). Isolation of *Trichoderma* and Evaluation of their Antagonistic Potential against *Alternaria porri*. *Journal of Phytopathology*, 162(9), 567–574. <https://doi.org/10.1111/jph.12228>
- Aceve, A. C. M., Sánchez, M. A. O., Domínguez, O. R. y Gutiérrez, R. L. (2004). Producción y Actividad Antibiótica del 6 pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp., Sobre Especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1), 14–21.
- Aceves, A. C. M., Domínguez, O. R., Gutiérrez, R. L., Moreno, M. E. O., Escamilla, J. C. M. y Samuels, G. J. (2001). Revista Mexicana de Fitopatología. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2), 154–160. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219204>
- Agrios, G. (1997). Plant Pathology. (3^a ed). In *Elsevier Academic Press* (p. 635). Cambridge University Press (CUP). <https://doi.org/10.1017/s0014479798261096>
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. (5^a ed). In *University of Florida* (p. 922).
- Aguilar, J. (2013). Historia económica de Costa Rica en el siglo XX: La economía rural. Tomo II Evolución económica de la economía global en el siglo XX. Diálogos. *Revista Electrónica de Historia*, 14(1), 127–130.
- Ahmad, Jaleed S., y Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. In *Phytopathology* (Vol. 77, Issue 2, p. 182). <https://doi.org/10.1094/phyto-77-182>
- Ahmed, A. S., Ezziyyani, M., Sánchez, C. P y Candela, M. E. (2003). Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, 109(6), 633–637. <https://doi.org/10.1023/A:1024734216814>

- Alarcón , J. J., Arévalo, E., Díaz , A. L., Galindo, J. R., Rodríguez , M. E. y Rivero, M. R. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de la granadilla (Passiflora ligularis): medidas para la temporada invernal*. Instituto Colombiano Agropecuario.
<http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>
- Anitha, R. y Murugesan, K. (2005). Production of gliotoxin on natural substrates by *Trichoderma virens*. *Journal of Basic Microbiology*, 45(1), 12–19.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200410451>
- Arbeláez Torres, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17(1–3), 11–16.
- Arguedas, A. I., Calderón, JC., Céspedes, E., Chacón, M., López, K., Medaglia, C., Mora, E. y Vargas, F. (2014). *Estadísticas de Comercio Exterior* [Archivo PDF].
http://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/09/Estadisticas_Comercio_exterior_JUI2013.pdf
- Arias, J. P. (2013). *Autoridades agropecuarias de China y Costa Rica se reúnen para definir protocolos de apertura a productos costarricenses*. [La Nación].
<https://www.nacion.com/economia/autoridades-agropecuarias-de-china-y-costa-rica-se-reunen-para-definir-protocolos-de-apertura-a-productos-costarricenses/65TP4IRNUVE4JGAWOTUNUKNJAA/story/>
- Arias M, O. (2005). Retos para la agricultura en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 29(2), 157–166.
- Arzate-Vega, J., Michel-Aceves, A. C., Domínguez-Márquez, V. M. y Santos-Eméstica, O. A. E. (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 98–104.
- Barahona, L., Calderón, JC., López, K., Tristán, A. y Vargas, J. M. (2011). *Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica 2010: PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de*

Costa Rica). 240.

- Barquero, M. (2010). *Empresa cambió tipo de plantas para seguir en mercado europeo*. *La Nación*. <https://www.nacion.com/economia/empresa-cambio-tipo-de-plantas-para-seguir-en-mercado-europeo/A73PGJICHRCPJPZQJCYNDE7HQ/story/>
- Barquero, M. (2013). *Cinco sectores pierden mucho terreno en las exportaciones*. *La Nación*. <https://www.nacion.com/archivo/cinco-sectores-pierden-mucho-terreno-en-las-exportaciones/MJM57Y6XVRA4TMNINGCB44A44E/story/>
- Basak, A. C., y Basak, S. R. (2011). Biological control of *Fusarium solani* sp. *dalbergiae*, the wilt pathogen of *dalbergia sissoo*, by *Trichoderma viride* and *T. harzianum*. *Journal of Tropical Forest Science*, 23(4), 460–466.
- Bell, D. K., Wells, H. D. y Markham, C. R. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379–382.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19821384099>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., y Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260.
<https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480>
- Bettiol, W., Rivera, M. C., Mondino, P., Montealegre, J. R. y Colmenarez, Y. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe: control biológico de enfermedades de plantas en Argentina. In *Facultad de Agricultura, Universidad de la República*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=DIGITA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000345>
- Blancard, D. (2011). *Enfermedades del tomate*. Mundi-Prensa (Trad).
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=3tSzHjXHHJ4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Enfermedades+del+tomate&ots=VhBPHQjZnp&sig=Uw8pfosg1N3aj-JTdvhvclOWqHsA#v=onepage&q=Enfermedades del tomate&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=3tSzHjXHHJ4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Enfermedades+del+tomate&ots=VhBPHQjZnp&sig=Uw8pfosg1N3aj-JTdvhvclOWqHsA#v=onepage&q=Enfermedades+del+tomate&f=false)

- Bogale, M., Steenkamp, E. T., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2009). Diverse *Fusarium solani* isolates colonise agricultural environments in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology*, 124(3), 369–378. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9422-y>
- Bokhari, N. A. y Perveen, K. (2012). Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. *African Journal of Microbiology Research*, 6(44), 7193–7197. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.956>
- Bruce, A., Srinivasan, U., & Staines, H. J., y Highley, T. L. (1995). Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35(4), 337–353. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00047-3](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00047-3)
- Burch, D. G. y Broschat, T. K. (1983). Aralias in Florida horticulture. *In Proc, Fla. State Hort. Soc*, 96, 161–164.
- Camacho Ramírez, N. y Gil Gómez, J. A. (2008). Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por *Fusarium* sp., aislados de procesos patológicos en plantas, animales y humanos. *Pontificia Universidad Javeriana*, 158.
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. In *Centro Internacional de la Papa (CIP)* (pp. 1–62). <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Cano, E., López, J. A., Cano, E., Carballo, C. V. y Guharay, F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas (No. 53). In *Bib. Orton IICA/CATIE*. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WyEOAQAIAAJ&oi=fnd&pg=PA12&dq=Control+biológico+de+plagas+agrícolas.+CV+Carballo,G+Falguni&ots=4pJucqfY0z&sig=DRW2FEzxspRnOZgdqxwHpEyN-WI>
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., & Chet, Il., y Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 929–935.

<https://doi.org/10.1128/aem.65.3.929-935.1999>

Cartea, M. E., Francisco, M. A. y Rosaura V., P. (2008). *Los glucosinolatos como factor de calidad en las brásicas [Archivo PDF]*.

http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh209/54_61.pdf

Carvalho, D. D. C., Lobo J., M., Martins, I., & Inglis, P. W., y Mello, S. C. M. (2014). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39(5), 384–391.

<https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500005>

Castellanos, G., Jara, C., y Mosquera, G. (2011). Guía Práctica 4. “Manejo del hongo en el laboratorio.” *Manejo Del Hongo En El Laboratorio*, 31.

Castillo, E. (1990). *Plantas ornamentales de follaje. FERTICA*.

Castillo, P. (2015). *Evaluación in vitro del efecto antagónico de Trichoderma spp. sobre Fusarium oxysporum y Phytophthora nicotianae obtenidos en plantaciones de piña (Ananas comosus (L) Merr.) [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica]*.

[http://www.sidalc.net/cgi-](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=100321)

[bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=100321](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=100321)

Chaverri, P. y Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology*, 48, 1–113.

Chaverri, P., & Castlebury, L. A. , Samuels, G. J. y Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(2), 302–313. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00400-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00400-1)

Chaverri, Priscila, Candoussau, F., & Samuels, G. J. (2004). *Hypocrea phyllostachydis* and its *Trichoderma* anamorph, a new bambusicolous species from France. *Mycological Progress*, 3(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0073-0>

- Cholango, L. (2009). *Selección de cepas de Trichoderma sp. in vitro, para el control de problemas radiculares en flores de verano* [Disertación, Escuela Politécnica del Ejército].
- Clark, C. A. y Moyer, J. W. (1991). *Compendio de enfermedades de la batata. Centro Internacional de la Papa*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBLIOPE.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=030340>
- Cobos, G. M. (2010). *Evaluación de cepas nativas de trichoderma spp. para el control de sigatoka negra (aracercospora fijiensis M.) en el cultivo de banano (Musa paradisiaca) en fase de laboratorio* [Informe técnico del proyecto de investigación, Escuela Politécnica del Ejerci].
https://www.researchgate.net/publication/277173827_Evaluacion_de_cepas_nativas_de_trichoderma_spp_para_el_control_de_sigatoka_negra_aracercospora_fijiensis_M_en_el_cultivo_de_banano_Musa_paradisiaca_en_fase_de_laboratorio
- Colina, A., Ferrer, A., y Urribarrí, L. (2009). Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 32(2), 152–159.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M. y Claudius-Cole, B. (2007). *Nematología práctica : Una guía de campo y laboratorio*.
- Cruzat, R., y Ionannidis, D. (2008). Biocontrol de Enfermedades Fungosas con *Trichoderma*. *Experiencias de Innovación Para El Emprendimiento Agrario FIA*, 62, 28.
- Cubillos, J. G., Páez, A., & Mejía, L. (2011). Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart .) Sacc . Asociado al Complejo “ Secadera ” en Maracuyá ,. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 64(1), 5821–5830.
- Cupull, R., de Cafú, E. D. I., Andreu, C., Abreu, M., Púrez, C., Abreu, M. y Cupull, M. (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Revista Centro Agrícola*, 30(1), 21–25. <https://www.semanticscholar.org/paper/Efecto-de-Trichoderma-viride-como->

estimulante-de-la-Cupull-Delgado/cd336f64d98057c50cf4fd208197d15700abcd58

- Dissanayake, M. L. M. C. y Kumari, W. K. M. T. (2012). Efficacy of Various Plant Extracts to Control *Fusarium* Wilt of *Polyscias Balfouriana* Variety Marginata. *Asian Journal of Experimental, Science*, 3(1), 129–135.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R. y Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 838–853. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0838>
- Dubey, S. C., Suresh, M. y Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.006>
- Dueñas, J. M., Shagarodsky, T., Fresneda, J., Hernández, Y. H. y González, J. (2007). Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y la Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 32(11), 63–66. http://www.actaf.co.cu/revistas/agrotecnia_05_2008/agrot2005-1/DSEM54.pdf
- Evans, H. C., Holmes, K. A. y Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0053-4>
- Ezziyyani, M., Pérez S, C., Sid A, A., Requena, M., y Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35–45.
- Fernández, R. J. y Suárez, C. L. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio Zona Bananera Colombiana. *Revista Facultad Nacional de*

Agronomía Medellín, 62(1), 4743–4748.

- Fernández S, O. M y Quesada S, A. S. (2009). *Nemátodos asociados a los cultivos de Costa Rica*. MAG.
- Ferrigo, D., Raiola, A., Rases, R. y Causin, R. (2014). *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*, 65, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.018>
- French, R., y Hebert, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. In *Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas*. (Issue Costa Rica., p. 288.).
<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A8740e/A8740e.pdf>
- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G. R. y Valencia, H. (2001). Fusarium Oxysporum el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7–25.
- García, R., Riera, R., Zambrano, C. y Gutiérrez, L. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo Trichoderma harzianum proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 10(2), 115–121.
<https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116102005.pdf>
- Ghisalberti, E. L. y Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by Trichoderma spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(11), 1011–1020. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90036-J](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90036-J)
- Gonzalez, B. y Izquierdo, A. B. (2000). Impacto Social Del Uso De Los Plaguicidas Químicos En El Mundo. *Universidad de Matanzas*, 24.
<http://monografias.umcc.cu/monos/2001/mono4.pdf>
- González A, L. A. (2011). Flora de Costa Rica I. Guía Práctica. *Universidad Estatal a Distancia*.
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YGUTILTykbwC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Flora+de+Costa+Rica+I.+Guía+Práctica.+San+José&ots=oL7AP1BOst&sig=8Wsmm13DG59ignJvtQyK6uC6q7Y#v=onepage&q=Flora de Costa Rica I. Guía Práctica. San José&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YGUTILTykbwC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Flora+de+Costa+Rica+I.+Guía+Práctica.+San+José&ots=oL7AP1BOst&sig=8Wsmm13DG59ignJvtQyK6uC6q7Y#v=onepage&q=Flora+de+Costa+Rica+I.+Guía+Práctica.+San+José&f=false)
- González, R., Herrera, J., & Montealegre, R. (2004). Control Biológico de *Fusarium solani* en

- Tomate Mediante el Empleo de los Bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria*, 31(1), 21–28.
- Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071707000909>
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L. y Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Revista Academia*, 7(13), 50–74. <https://www.researchgate.net/publication/242534403>
- Guerrero, R., y Arias, D. (2015). Evaluación del efecto de fungicidas sobre el desarrollo de dos especies de *Trichoderma* (Fungi: Ascomycota: Hypocreaceae) utilizadas en el biocontrol de hongos patógenos de cacao. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 1(1), 11–17. <https://revistas.proeditio.com/REVISTAMAZONICA/article/view/156/134>
- Guigón L, C., y González G, P. A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1), 117–124.
- Hanson, L. E. y Howell, C. R. (2004). Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 94(2), 171–176. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.171>
- Hanson, Paul E. y Gauld, I. D. (2006). *Hymenoptera de la región neotropical*. American Entomological Institute.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, Ilan., Y., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro797>

- Hernández, M. R. y Rangel, E. A. (2012). Búsqueda de cepas de Antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate. *Sabes.Edu.Mx*, 2, 1–9.
http://www.sabes.edu.mx/redi/2/pdf/SABES_2_4_RUFINAPDF_V1.pdf
- Hernández, O., Rodríguez, H. y Hernández, C. (2009). *Trichoderma* spp, una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. *Revista Ciencia Acierta*, 17.
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC17/cc17trichoderma.html>
- Hernández M, A. A., Sierra P, A. y Carr P, A. (2006). Evaluación in *vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. *Fitosanidad*, 10(2), 105–108. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=pubs.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=002159>
- Hernández M, J. L., Sánchez P, M. I., García O, J. G., Mayek P, N., & González P, J. M., y Quiroz V, J. di C. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 176–185.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4–10.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Howell, C. R. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, 96(2), 178–180.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0178>
- Infante, D., Martínez, B., & González, N., y Reyes, Y. (2009). *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14–21.
- Iriarte, L. E., Sosa, M. C. y Reybet, G. E. (2011). Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de *Fusarium oxysporum* en suelo. *RIA: Revista Investigaciones Agropecuarias*,

37(3), 231–237.

- Kaakeh, W., Abou-Nour, M. M., & Khamis, A. A. (2001). *MASS REARING OF THE RED PALM WEEVIL, RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS OLIV., ON SUGARCANE AND ARTIFICIAL DIETS FOR LABORATORY STUDIES: ILLUSTRATION OF METHODOLOGY.*
- Kapupara, P. P., Dholakia, S. P., Patel, V. P. y Suhagia, B. N. (2010). Evaluation of antiulcer activity of root and leaf extract of *Polyscias balfouriana var. marginata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 192–195.
- Kim, T. G., y Knudsen, G. R. (2013). Relationship between the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *lisi*. *Applied Soil Ecology*, 68, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.009>
- Küçük, Ç. (2017). In vitro Antagonistic Activity against Fusarium Species of Local Trichoderma spp. Isolates. *J. Biol. Environ. Sci*, 11(32), 67–74.
<http://jbes.uludag.edu.tr/PDFDOSYALAR/32/mak02.pdf>
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Meyer, W., Kubicek, C. P. y Börner, T. (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89(3), 442–460.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026803>
- Lange, M., Habekost, M., Eisenhauer, N., Roscher, C., Bessler, H., Engels, C., Oelmann, Y., Scheu, S., Wilcke, W., Schulze, E. D. y Gleixner, G. (2014). Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS ONE*, 9(5), e96182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096182>
- Leon, J. (2008). *Historia Económica de Costa Rica en el siglo XX: el comercio exterior de Costa Rica en el siglo XX: 1880 A 2000.*
- Li, Y. T., Hwang, S. G., & Huang, Y. Mi., y Huang, C. H. (2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Protection*, 110, 275–282.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>

Machado, D. F. M., Parzianello, F. R., Silva, A. C. F. D. y Antonioli, Z. I. (2012). *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35(1), 274–288.

http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2012000100026

Marcello, C. M., Steindorff, A. S., da Silva, S. P., do Nascimento Silva, R., Bataus, L. A. M. y Ulhoa, C. J. (2010). Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, 165(1), 75–81.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.002>

Márquez, M., Martínez, M., y Franco, M. (2002). Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomycetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagonica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Agronomía Colombiana*, 19(1–2), 81–87.

Martínez, J. O., Ramírez, G. H., y Tobón, M. C. (2013). Inhibición *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 126–136.

Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. and their role in the control of crop pests. *Rev. Protección Veg*, 28(1), 1–11.

Martínez B, A. M. (2012). Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*), en condiciones *in vitro* [Tesis de bachiller, Universidad Técnica de Ambato]<.

<http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>

Marzano, M., Gallo, A., y Altomare, C. (2013). Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control*, 67(3), 397–408.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.008>

- Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V., y Vannacci, G. (2012). Biocontrol of *Fusarium* head blight: Interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, 158(1), 98–106. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052639-0>
- McDaniel, M. D., Tiemann, L. K. y Grandy, A. S. (2014). Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. *Ecological Applications*, 24(3), 560–570. <https://doi.org/10.1890/13-0616.1>
- Melgarejo N, P., García-Jimenez, J., Jordá G, M. C., López G, M. M., & Andrés Y, María Fe. y Duran-V, N. (2010). *Patógenos De Plantas Descritos En España*. Madrid, Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino.
- Michel-Aceves, A., Otero-Sánchez, M., Solano-Pascacio, L., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., y Rebolledo-Martínez, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* spp. de *Fusarium* subglutinans (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 18–26.
- Mnif, I., Hammami, I., Triki, M. A., Azabou, M. C., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2015). Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 18137–18147. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5005-6>
- Montoro, Y., Moreno, R., & Gomero, Luis. y Reyes, M. (2009). Characteristics of the use of chemical pesticides and health risks in farmers in the central highlands of Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 26(4), 466–472. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2009.264.1409>
- Mora, F., Redonet, J. y Blanco, L. (2007). Caracterización cadena local plantas ornamentales. *Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección Regional Huetar Norte Agencia de Servicios Agropecuarios La Tigra*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00007.PDF>
- Mora, F. (1996). Combate biológico de *Rhizoctonia solani* mediante el empleo de *Rhizobium*

leguminosarum biovar *phaseoli* en el campo. *Agronomía Mesoamericana*, 7(2), 23–30.

<https://doi.org/10.15517/am.v7i2.24753>

Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., y Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista APF*, 3(2), 11–16.

Mózon, B. S. (2001). Producción y uso de hongos entomopatógenos en Nicaragua. In *FUNICA*.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., y Charles M, K. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma* a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35–45. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>

Murillo, C., & Arias, R. (2005). *Estudio De La Oferta Y Demanda De Bienes Y Servicios Basados En Recursos Biológicos Nacionales*. 157.

Murray, K. (2009). *Estudio de factores relevantes para impulsar la comercialización de plantas ornamentales y follajes costarricenses en el mercado chino. [Tesis Bach., Universidad Internacional de las Américas]*.

Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. In *Universidad de Antioquia*.

[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LPwcidQx3TkC&oi=fnd&pg=PR13&dq=Control+biológico+de+insectos:+un+enfoque+agroecológico+Clara+Inés+Nicholls+Estrada&ots=n_j8kSU185&sig=X8wviKH0VCgSJEXU8CMSSMaqyeE#v=onepage&q=Control biológico de insectos%3A un en](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=LPwcidQx3TkC&oi=fnd&pg=PR13&dq=Control+biológico+de+insectos:+un+enfoque+agroecológico+Clara+Inés+Nicholls+Estrada&ots=n_j8kSU185&sig=X8wviKH0VCgSJEXU8CMSSMaqyeE#v=onepage&q=Control%20biol%C3%B3gico%20de%20insectos%3A%20un%20enfoque%20agroecol%C3%B3gico)

Nina, R., Smeltekop, H., Almanza, J., Loza-Murguía, M. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café (*Coffea arabica*) en condiciones experimentales. *Journal of the Selva Andina*, September.

Nina, R., Smeltekop, H., Almanza, J., y Loza M, M. (2011). Evaluación de la capacidad

- biocontroladora de cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia* sp y *Fusarium* sp en café *Coffea arabica* en condiciones experimentales. *Journal of the Selva Andina*, 1(1), 43–52.
- Obreque D, M. X. (2004). Evaluacion de aplicaciones reinfecion del fungicida benomilo y del biocontrolador *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp. en proteaceas. [Doctoral dissertation, Universidad de Talca]. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mn=033022>
- Pal, K. K., y Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>. Biological
- Pastrana, A. M., Basallote-Ureba, M. J., Aguado, A., Akdi, K. y Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 109–1202. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Pavone, D. F. (2012). *Biocontrol de Rhizoctonia solani Kühn por Trichoderma spp.* [Tesis de Doutorado, Universidad Central de Venezuela].
- Pfenning, L. H., y de Abreu, L. M. (2000). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. In *Manual de biología de suelos tropicales*.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P. y Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. In *Fungi and Food Spoilage*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Quiroz Sarmiento, V. F., Ferrera Cerrato, R., Alarcón, A., Encarnación, M., & Hernández, L. (2008). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo de ajo. *Revista Mexicana de Micología*, 26(June 2008),

27–34.

Ramada, M. H. S., Lopes, F. Á. C., Ulhoa, C. J. y do Nascimento Silva, R. (2010). Optimized microplate β -1, 3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, 81(1), 6–10.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701210000126>

Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L. y Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of mycoparasitism related genes in *Trichoderma atroviride*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77(13), 4361–4370.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00129-11>

Reyes, Y., Martínez, B., y Infante, D. (2008). Evaluación de la actividad antagonista de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Protección Vegetal*, 23(2), 112–117.

Rica, D. C. (2006). *Costa Rica : Estadísticas de exportación 2005*.

Rogg, H. (2000). Manejo integrado y control biológico de plagas y enfermedades. In *Abya Yala*.

Romero A., O., Lara, H. M., Damián, H. M., Dominínguez, H. F., & Arellano, V. A. (2009).

Características de *Trichoderma harzianum* , como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Revista Colombiana de Biotecno*, 11(2), 143–151.

Rosa, D., Halim, Y., Kam, N., Sugata, M., & Samantha, A. (2019). Antibacterial activity of *Polyscias scutellaria* fosberg against *Acinetobacter* sp. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(1), 516–519. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i1.30270>

Rout, G. R., Kullu, J., Senapati, S. K., Aparajita, S., & Mohapatra, A. (2007). Identification and genetic relationship among *Polyscias* and *Schefflera* (Araliaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Biotechnology*, 24(5), 519–525.

<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.519>

Royse, D. J. y Ries, S. M. (1978). The influence of fungi isolated from peach twigs on the

pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathology*, 68(4), 603–607.

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/P_hyto68n04_603.pdf

Rubio R, Giulliana L., Baltodano S, F. D. M., Abanto C, I. I., & Wilson K, Juan H. Y Muñoz R, M. A. (2008). Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500 , Rhizolex-T y Homai-WP. *Revista Biológica de La Universidad de Trujillo*, 28(2).

Saba, H., Vibhash, D., Manisha, M., Prashant, K. S., Farhan, H. y Tauseef, A. (2012).

Trichoderma a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere*, 3(4), 524–531. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/3/4/14>

Samaniego-Gaxiola, J. A. y Chew-Madinaveitia, Y. (2007). Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78(2), 383–390.

Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus.

Mycological Research, 100(8), 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)

Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology.

Phytopathology, 96(2), 195–206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>

Sandoval C, R. A., Martínez-Peniche, R. Á., Hernández-Iturriaga, M., Fernández-Escartín, E., Arvizu-Medrano, S., & Soto-Muñoz, L. (2011). Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 17(2), 161–172.

Santana, L. y Poncio, Z. (2011). Manual de prácticas microbiología industrial. In *Universidad Autónoma de Ciudad Juárez*.

Selfa, J., & Anento, J. (1997). Plagas agrícolas y forestales. In *Los artrópodos y el hombre*. Bol.

S.E.A. (Vol. 20, Issues 75–91, pp. 1–17). http://www.sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_20/B20-006-075.pdf

- Sharma, V., Salwan, R., Sharma, P. N., y Kanwar, S. S. (2017). Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.042>
- Sherf, A. F. y Macnab, A. A. (1986). *Vegetable diseases and their control*. John Wiley & Sons. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=kbYNgTGxz4wC&oi=fnd&pg=PA23&dq=Vegetable+diseases+and+their+control&ots=F3CwsKobm5&sig=AQ59ZmCosNxEihQs9lckFDazAVg#v=onepage&q=Vegetable+diseases+and+their+control&f=false>
- Shoresh, M. y Harman, G. E. (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. *Plant Physiology*, 147(4), 2147–2163. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123810>
- Sivila, N. y Alvarez, S. (2013). Producción Artesanal de *Trichoderma*. In *Universidad Jujuy Argentina*. <http://www.library.umaine.edu/auth/EZProxy/test/authej.asp?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lfh&AN=9008131796&site=ehost-live>
- Skidmore, A. M. y Dickinson, C. H. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 57–64. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153676800927>
- Smith, I., Dunez, J., & Phillips, D. (1992). *Manual de enfermedades de las plantas*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Suárez, C. L., Fernández, R. J., Osvaldo, N., Gámez, R. M. y Páez, A. R. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium solani* (mart.) sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 35–43. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/23756>
- Talavera, M. (2004). *Manual de Nematología* (pp. 1–28).
- Toghueo, R. M. K., Eke, P., Zabalgoeazcoa, Í., de Aldana, B. R. V., Nana, L. W. y Boyom, F.

- F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96, 8–20.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.008>
- Vargas, R. Olivares, N. Ubilo, A. (2008). Manejo Integrado de Resistencia (MIR) y selectividad de plaguicidas. *Manejo de Plagas En Paltos y Cítricos*, 80–91.
- Vargas, W. A., Mukherjee, P. K., Laughlin, D., Wiest, A., Moran-Diez, M. E. y Kenerley, C. M. (2014). Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology*, 160, 2319–2330. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079210-0>
- Vargas, M. (1992). *Fusarium solani*: Agente Causal del Complejo Pudrición de Cogollo? *Palmas*, 13(1), 59–67.
- Villalobos, L. Cárdenas, A. y Cordero, M. (2009). *Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica, 2009 [Archivo PDF]*.
https://www.sfe.go.cr/LabDiagnostico/Lista_de_enfermedades_de_los_cultivos_de_CR.pdf
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, Mi., Woo, S., y Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications*, 7(11), 1545–1550. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701133>
- Vindas, L. (2013). *Pequeños productores de plantas y follajes ampliaron exportaciones a mercados no tradicionales. El Financiero*.
<https://www.elfinancierocr.com/negocios/pequenos-productores-de-plantas-y-follajes-ampliaron-exportaciones-a-mercados-no-tradicionales/7AIJKYPWDFE7HKJZJCZANMTAU/story/>
- von Marschall M, C. A. (2007). *Protocolo de muestreo secuencial para la evaluación de la población de plagas en la Producción de Dracaena marginata [Tesis de maestría, CATIE]*.
<http://www.sidalc.net/cgi->

bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=0
83302

- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F. y van der Heijden, M. G. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5266–5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111>
- Walter, A., & Lebot, V. (2003). Gardens of Oceania I. In *Gardens of Oceania*. <https://doi.org/10.1038/047514a0>
- Windham, M. T., Elad, Y. y Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76(5), 518–521. <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=8749357>
- Yedidia, I., Benhamou, N., y Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1061–1070. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1061-1070.1999>
- Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P. D., & Richardson, A. D., Camargo, F. A., Clark, I. M., McGrath, S. P., Hirsch, P. R. y Triplett, E. W. (2014). Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology*, 69(2), 395–406. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0530-2>
- Zhang, F., Yang, X., Ran, W. y Shen, Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS Microbiology Letters*, 359(1), 116–123. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12582>

11 ANEXOS

Anexo 1. Análisis de variancia (Tukey) en infostat (versión estudiantil) para pruebas de inhibición de crecimiento en pruebas in vitro de *Trichoderma* spp. vs *Fusarium solani*.

Error: 556,2788 gl: 135

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Medias	n	E.E.			
AZM-L2	6,07	10	7,46	A		
AZM-B1	6,39	10	7,46	A		
AZM-B8	7,99	10	7,46	A		
AZM-B9	11,82	10	7,46	A		
AZM-T2	11,82	10	7,46	A		
AZM-B10	16,29	10	7,46	A		
AZM-B4	17,16	10	7,46	A		
AZM-B3	17,57	10	7,46	A		
AZM-T1	20,13	10	7,46	A	B	
AZM-B6	20,13	10	7,46	A	B	
AZM-B2	25,56	10	7,46	A	B	
AZM-B5	31,63	10	7,46	A	B	C
AZM-L1	33,55	10	7,46	A	B	C
AZM-B7	55,59	10	7,46	B	C	
AZM-T4	67,09	10	7,46			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 2. Análisis de variancia (Tukey) en infostat (versión estudiantil) para pruebas crecimiento radial en pruebas in vitro de *Trichoderma* spp. vs *Fusarium solani*.

Error: 0,3685 gl: 134

Cepas de <i>Trichoderma</i>	Medias	n	E.E.				
AZM-B10	5,62	10	0,19	A			
AZM-B3	5,64	10	0,19	A			
AZM-L2	5,70	10	0,19	A			
AZM-B9	6,26	10	0,19	A			
AZM-L1	7,48	10	0,19		B		
AZM-B4	7,66	9	0,20		B	C	
AZM-B5	7,91	10	0,19		B	C	D
AZM-B1	7,97	10	0,19		B	C	D
AZM-B7	8,34	10	0,19		B	C	D E
AZM-B6	8,49	10	0,19			C	D E
AZM-B8	8,55	10	0,19			C	D E
AZM-B2	8,60	10	0,19				D E
AZM-T1	8,79	10	0,19				D E
AZM-T4	9,00	10	0,19				E
AZM-T2	9,00	10	0,19				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)