

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Evaluación *in vitro* de los mecanismos de acción de 16 cepas de *Trichoderma* para la inhibición del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

Roberto Cevallos Castells

Ingeniería en Agro-Empresas

Trabajo de integración curricular presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Agro-empresas

Quito, 18 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERIAS

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Evaluación *in vitro* de los mecanismos de acción de 16 cepas de
Trichoderma para la inhibición del fitopatógeno *Fusarium oxysporum***

Roberto Cevallos Castells

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 18 de diciembre de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Roberto Cevallos Castells

Código: 00107762

Cédula de identidad: 1718893280

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, a mi mama Sonsoles por el cariño y apoyo, a mi papa Carlos por su constante apoyo y seguimiento, a mi hermano Andrés junto a su esposa Naomi por sus consejos, interés, apoyo y amor. A mis tíos Antonio, Aracely y mi prima Antonia por ser una mano de apoyo y guía en momentos difíciles. A Antonio León, PhD, por su constante guía y dirección humana durante mi vida académica. A mis profesores Mario Caviedes, PhD y Carlos Rúaes, MS, por su constante apoyo, sus conocimientos y experiencias compartidas a lo largo de mi carrera. A mis compañeros de carrera y amigos por tantos momentos de apoyo y estudio. Finalmente quiero agradecer al laboratorio de agrobiotecnología de la USFQ en especial a Karen Herrera y Noelia Barriga, MS, por su colaboración en la ejecución de los experimentos.

RESUMEN

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno que genera pérdidas económicas y daños en los cultivos a nivel mundial, causando una enfermedad determinante y limitante dentro de cultivos como frutales, de cereales, ornamental, etc. *Trichoderma* es un bio-controlador alternativo el cual es usado como hongo antagonico frente a *Fusarium*. En este estudio, se identificaron 16 cepas de *Trichoderma* recolectadas en la sierra ecuatoriana y se reactivó una cepa de *Fusarium oxysporum* raza 1 obtenida previamente del cultivo de banano (*Musa paradisiaca*). Se enfrentaron las 16 cepas de *Trichoderma* frente a *Fusarium* por triplicado, dando un total de 48 repeticiones, con el fin de medir los efectos de antagonismo y micoparasitismo. Todos los tratamientos aplicados se encuentran dentro del mismo rango significativo en cuanto al efecto antagonico frente a *Fusarium*, mientras que, si existieron diferencias estadísticas en cuanto a micoparasitismo, siendo cuatro cepas de *Trichoderma* las más eficientes frente a la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*

Palabras clave: Bio-controlador, *Fusarium*, *Trichoderma*, Antagonismo, Micoparasitismo.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum is a phytopathogenic fungus that generates significant economic losses and crop damages worldwide. *Fusarium* causes a determining and limiting disease within crops such as fruit trees, cereals, ornamentals, etc. *Trichoderma* is an alternative bio-controller which is used as an antagonistic fungus against *Fusarium*. In this study, 16 *Trichoderma* strains, collected in the Ecuadorian highlands, were identified and a strain of *Fusarium oxysporum* race 1, previously reactivated from the banana crop (*Musa paradisiaca*), was reactivated. In order to measure the effects of antagonism and mycoparasitism, the 16 strains of *Trichoderma* were confronted against *Fusarium* by triplicated, giving a total of 48 repetitions. All tested treatments were within the same significant range regarding the antagonistic effect against *Fusarium*. By other hand, statistical differences were significant when mycoparasitism was evaluated, and four *Trichoderma* strains were the most efficient against *Fusarium* growth inhibition.

Key words: Bio-controller, *Fusarium*, *Trichoderma*, Antagonism, Mycoparasitism.

TABLA DE CONTENIDOS

1	Introducción	10
1.1	Antecedentes	10
1.1.1	Importancia de la agricultura en la economía.	10
1.1.2	<i>Trichoderma</i> y sus características generales	12
1.1.3	Mecanismos de control de <i>Trichoderma</i>	12
1.2	Planteamiento del problema de investigación	14
1.3	Justificación	16
2	Objetivo general:	18
2.1	Objetivo general.....	18
2.2	Objetivos específicos:	18
3	Hipótesis.....	18
3.1	Hipótesis	18
4	Materiales y métodos	19
4.1.1	Obtención de microorganismos para su multiplicación	19
4.1.2	Crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	20
4.1.3	Crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	21
4.1.4	Identificación de material vegetal sembrado.....	22
4.1.5	Evaluación del efecto antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i>	22
4.1.6	Obtención de Resultados: crecimiento de micelio	23

4.1.7	Análisis estadístico.....	23
5	Resultados y discusion	24
5.1	Identificación morfológica de las cepas de <i>Trichoderma</i>	24
5.1.1	Resultados antagonismos <i>Trichoderma</i> vs <i>Fusarium oxysporum</i> ... 27	
	Gráfica sobre la diferencia significativa del crecimiento de <i>Fusarium</i> frente a cepas de <i>Trichoderma</i>	28
5.2	Obtención de resultados de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> vs <i>Fusarium oxysporum</i>	30
	Gráfica y análisis de la varianza sobre el crecimiento de <i>Fusarium</i> frente a <i>Trichoderma</i>	33
5.3	Análisis de la varianza del crecimiento de <i>Fusarium</i> frente a <i>Trichoderma</i>	36
6	Conclusiones	37
7	Anexos.....	38
8	Bibliografía.....	39

TABLA DE FIGURAS

Figura 2. Porcentaje del uso de Insumos Químicos y Orgánicos en cultivos Transitorios y Permanentes en Ecuador. (INEC, 2016)	14
Figura 6.2. Identificación morfológica de las cepas de <i>Trichoderma</i>	25
Figura 6.3. Identificación morfológica de las cepas de <i>Trichoderma</i>	26
Figura 6.4 Resultado de antagonismo de <i>Trichoderma</i> vs <i>Fusarium</i>	27
Figura 6.5 Grafica <i>Fusarium</i> frente a <i>Trichoderma</i>	28
Figura 6.6 Resultado final de 60% de micoparasitismo <i>Trichoderma</i> vs <i>Fusarium</i>	32
Figura 6,7 diferencia significativa entre las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> ..	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Analisis de la Varianza del Crecimiento de <i>Fusarium</i> frente a <i>Trichoderma</i>	29
Tabla 2 Escala de porcentaje de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium</i>	31
Tabla 3 Análisis de la varianza de micoparasitismo	36

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1 Importancia de la agricultura en la economía.

El inicio de la agricultura hace miles de años, fue un hito indispensable para el desarrollo de la civilización. Con la domesticación de las plantas, los seres humanos dejaron de ser nómadas y pasaron a ser sedentarios, contribuyendo a la construcción de centros poblados, a la cultura y a una mejor calidad y mayor disponibilidad de alimentos. En la actualidad, la agricultura es el rubro económico más importante en el mundo y lo es por dos principales motivos: genera réditos significativos para los países productores y, segundo, aporta la alimentación para una población en exponencial crecimiento (FAO, n.d.)

La tendencia internacional es la comercialización de productos agrícolas libres de pesticidas, consecuentemente en Ecuador también se vuelto una tendencia obtener productos orgánicos. En Ecuador se calcula que existen aproximadamente 2'813.217 hectáreas sembradas, de las cuales 1'320.988,67 hectáreas utilizan algún tipo de plaguicida químico, esto representa el 43% del sector agrícola, mientras que el otro 57% practica una agricultura ecológica o amigable con el ambiente (INEC, 2013). Por la información proporcionada por INEC, en el año 2013, se han incrementado las actividades agrícolas en Ecuador, debido a que su territorio presenta diversos factores climáticos que permiten que la producción agrícola sea alta y de calidad.

Ecuador por sus características; climatológicas, suelos y altura es un país altamente apto para la agricultura, pero también megadiverso, lo cual también podría perjudicar al sector agrícola por las potenciales amenazas de plagas, hongos y enfermedades que pueden tener los diversos cultivos que se pretende producir.

Actualmente existe un constante desarrollo de control de plagas y enfermedades, que permita un manejo amigable con el ambiente y el consumidor. Por otro lado, existen agentes biológicos como: bacterias y hongos, que benefician a los agricultores a reducir el uso de químicos. Uno de los agentes biológicos que ayudan a mitigar las enfermedades es el hongo *Trichoderma* spp. (Chiriboga, 2015)

El control biológico consiste en el control de plagas que afectan un cultivo mediante el uso de enemigos naturales que se encuentran dentro de un ecosistema o pueden ser insertados (Rubio, 2006). Mediante el uso de agentes biológicos para el control de organismos perjudiciales evita que las plagas o enfermedades desarrollen resistencia. Por otro lado, el uso de pesticidas químicos puede permitir la generación de resistencia frente al modo de acción. Existen varios métodos para el empleo de agentes biológicos entre los cuales se encuentra la conservación de la fauna del agroecosistema que permite el control del hábitat mediante depredadores. También se debe tomar en cuenta el uso de especies insertadas en un agroecosistema que actúan como enemigo natural sobre las plagas generando un equilibrio dentro del sistema (SENASA, 2016).

Según Araya, R., et al (2003), el uso de controladores biológicos es una opción para prevenir, eliminar o disminuir el daño generado por las plagas de los cultivos. Además, son agentes biológicos que suelen actuar específicamente sobre los organismos de interés. El uso de bio controladores permite la reducción del uso de químicos, por ende, se reducen costos además de evitar la contaminación de fuentes de riego (Araya, 2003).

1.1.2 *Trichoderma* y sus características generales

Existe un constante uso de *Trichoderma* dentro de la agricultura. Dos de las principales son *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum*. Estas presentan las mismas características morfológicas de identificación, su producción abundante de conidios que al comienzo presentan un color amarillento, que luego se transforma en verde. Se forma una estructura piramidal a partir de los conidióforos, produciendo conidias de un color verde claro con forma ovalada (López, 2011).

1.1.3 Mecanismos de control de *Trichoderma*.

Según Bravo et al, 2016, *Trichoderma* es un género de hongo saprofita de fácil crecimiento en el suelo de variados ecosistemas. Además, es un grupo de hongos de suma importancia dentro de la agricultura, esto debido a que interactúa con las raíces y tejido foliar de las plantas generando una simbiosis, lo cual le permite a *Trichoderma* hospedarse y a las plantas mejorar el crecimiento y desarrollo de sus raíces, y así aprovechar de mejor manera los nutrientes que se encuentran en los suelos. Por otro lado, a *Trichoderma* se le considera un eficiente controlador biológico sobre los patógenos que se encuentran en el suelo. *Trichoderma* es un agente biológico que actúa como un hiperparásito que genera competencia con otros hongos, produciendo metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de otros hongos (Bravo, 2016).

Trichoderma tiene diversos mecanismos de acción bio-controlador sobre los hongos fitopatógenos. Los principales mecanismos de acción que actúan de manera directa sobre los hongos fitopatógenos son; competencia por espacio y nutrientes, antibiosis y micoparasitismo (Lorenzo, 2001). Según Harman, G., (2004), *Trichoderma* presenta otro mecanismo de defensa indirecta, puesto que benefician a la planta porque

ayudan a inducir la resistencia vegetal, de esta manera la planta genera respuestas tanto fisiológicas como bioquímicas inducidas por *Trichoderma*. Adicionalmente, ayuda a la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para la planta; también ayuda a crear un ambiente beneficioso para el desarrollo radicular, esto permite aumentar la tolerancia de la planta frente a situaciones de estrés (Harman G. , Universidad Nacional de Colombia, 2003). Así, globalmente, *Trichoderma* se caracteriza por brindar mecanismos de defensa a la planta los cuales son; antibiosis, competencia, micoparazitismo.

La competencia representa un mecanismo antagónico de suma importancia. Según Infante (2009) el antagonismo es la competencia que existe entre dos organismos frente a un nutriente, esta competencia por el nutriente genera la reducción sobre la disponibilidad del espacio para el otro individuo. “Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros“ (Ahmad, 1987); (Hjeljord, 1998).

Por otro lado, el micoparazitismo es definido como “una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados” (Infante, 2009). Finalmente, la antibiosis se relaciona a la producción de metabolitos tóxicos que generan danos a otros microorganismos sensibles a los antibióticos secretados. Este mecanismo no es muy recomendado usar ya que el patógeno puede desarrollar inmunidad ante los metabolitos secretados (Mendez, 1999).

1.2 Planteamiento del problema de investigación

De acuerdo a los datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística y Censos, INEC, (2013), existe amplio uso de agroquímicos en las actividades agrícolas en el Ecuador. En el 2016, el uso de químicos en cultivos permanentes fue de un 50% de los productores, mientras que apenas un 2% realizó un tipo de aplicación con insumos orgánicos. Por otro lado, en los cultivos transitorios incremento notablemente el uso de químicos a un 78% mientras que el uso de insumos orgánicos tiene un incremento de 2,66%. Esto se realiza con el fin de combatir enfermedades de y plagas, entre otros (INEC, 2016).

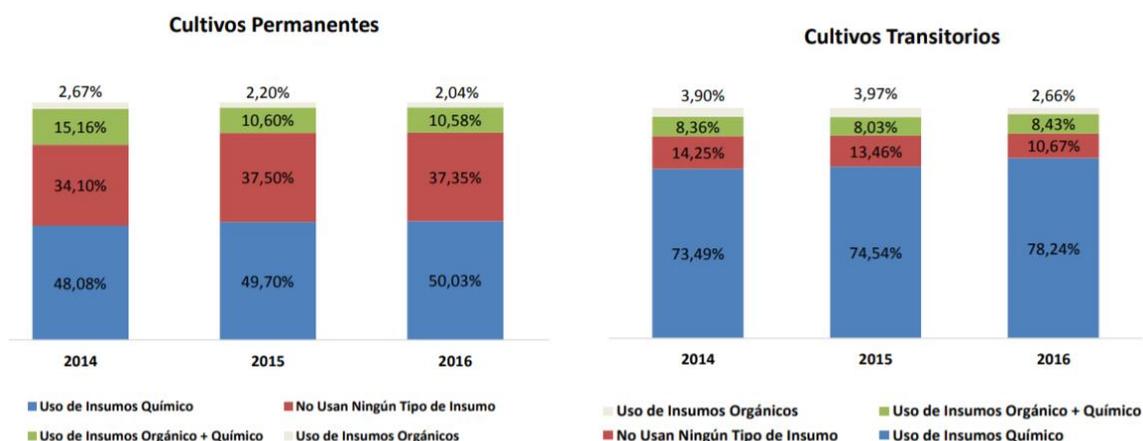


Figura 2. Porcentaje del uso de Insumos Químicos y Orgánicos en cultivos Transitorios y Permanentes en Ecuador. (INEC, 2016)

Fusarium es un género de hongo patógeno que dentro en la agricultura provoca pérdidas notables. Según Bharathi et al (2012), *Fusarium* genera un 21% de pérdidas en tomate cuando su producción es bajo invernadero, el cual es un ambiente con mayor

control. Mientras que cuando el cultivo se encuentra expuesto, sin la protección de un invernadero, pueden llegar a existir pérdidas de hasta el 47% (Bharathi, 2012). Por otro lado, otro género que tiene un alto impacto en la agricultura es *Alternaria*.

El método que más se usa para el control de enfermedades causada por hongos, en este caso específicamente *Fusarium*, es la aplicación de diferentes fungicidas sistémicos químicos que se encuentran disponibles en el mercado como Benomil y Amistar (FAO, 2019). Una nueva alternativa para el control preventiva de hongos es el uso de agentes biológicos como suspensiones basadas en *Trichoderma*. Tanto *Alternaria* como *Fusarium* pueden ser controlados mediante *Trichoderma*, debido a que genera competencia por el espacio y nutrientes de la planta, inhibiendo e impidiendo el crecimiento del agente fitopatógeno causal (Benítez T., 2004).

Según Pérez, L., et al, (2009), experimentos que fueron realizados en campo para el control del fitopatógeno *Fusarium*, mostraron que las áreas que fueron tratadas con el bio-controlador *Trichoderma harzianum*, se obtuvieron resultados que marcan la inhibición del fitopatógeno (Pérez, 2009). Por otro lado, Gonzalez, J., et al (2005) muestra que el damping-off producida por *Fusarium* en las plantaciones de papaya en México, puede ser eficazmente controlada mediante el uso de *Trichoderma harzianum* (Gonzalez, 2005).

Debido a la dificultad de realizar pruebas de campo, una alternativa apropiada para la evaluación preliminar de los mecanismos de acción de agentes biológicos para la inhibición de los fitopatógenos es la realización de bioensayos *in vitro*. Brevemente, en el presente estudio se plantea a escala de laboratorio, mediante el uso de cajas Petri, la siembra de *Fusarium* para, una vez desarrolladas las cepas, inocular *Trichoderma* y observar los efectos sobre los fitopatógenos. De esta manera, es posible observar cuál es la cepa de *Trichoderma* que mejor actúa sobre *Fusarium*, para luego propagarla y

potencialmente proponer un método eficiente para el control biológico, además amigable con la salud humana y el ambiente.

1.3 Justificación

Debido a restricciones fitosanitarias y de salud pública, el sector agrícola tiene una fuerte tendencia hacia la producción orgánica. Actualmente el uso de pesticidas para control biológico busca ser reducido, por dos principales motivos: la afectación que tienen sobre la salud humana y además los efectos perjudiciales que provocan en los suelos. La salud humana se ve afectada, generando enfermedades pulmonares, cáncer, entre otros. Mientras que al suelo se ve afectado por la lixiviación, que es el flujo de sustancias sobre la superficie del suelo (Rodríguez, 2014).

Los insumos orgánicos son una alternativa que ha incrementado en los últimos años según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2016) y se ha incrementado en casi un 1% el uso de productos orgánicos como agentes biológicos. Esto se debe a que los productores prefieren el uso de un producto químico que ya han aplicado previamente y conocen su rápido modo de acción. El uso de bio-funguicidas además de tener un resultado eficaz, cuida los diferentes recursos naturales como el suelo, el agua, en general la contaminación medio ambiental. Además de esto es más amigable con la salud del humano (FAO, 2019).

Al saber que los recursos son limitados y las necesidades básicas humanas, cada día incrementan más lo necesario el uso de prácticas de producción amigables con el ambiente, con un enfoque dirigido a la explotación consiente de los recursos naturales de

cada país con el objetivo de reducir hasta erradicar el uso de pesticidas. Casi en su totalidad tanto las plagas como fitopatógenos tienen enemigos naturales dentro del mismo ecosistema donde viven. Estos antagonistas biológicos pueden ser usados como parte de un programa de manejo integrado para control biológico (Punschke, 2015).

Se han realizado durante la historia varios bio preparados para el control fúngico para así de esta manera proteger y a su vez activar las defensas de la planta (FAO, 2010). En la actualidad se presentan diversas alternativas para el control de hongos, en este caso el trabajo con *Trichoderma* se ha incrementado notablemente, mostrando mayor eficiencia que el resto de bio pesticidas. Por este motivo es importante evaluar las diversas cepas de *Trichoderma* que se pueden encontrar en Ecuador. Esto con el fin de obtener resultados que permitan determinar cuál es la más apta para competir contra hongos fitopatógenos, como son *Fusarium* y *Alternaria*.

2 OBJETIVO GENERAL:

2.1 Objetivo general

- Evaluar *in vitro* de los mecanismos de acción de 16 cepas de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* para la inhibición del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

2.2 Objetivos específicos:

- Multiplicar 16 cepas de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum*, previamente estudiadas, del banco del laboratorio de Agrobiotecnología y Alimentos USFQ.
- Reactivar y cultivar las cepas de *Fusarium oxysporum* raza 1 de banano
- Evaluar el antagonismo y micoparasitismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *F. oxysporum* usando pruebas duales.

3 HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis

El efecto de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* *in vitro* en medio PDA incide en el crecimiento de *F. oxysporum*

4 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología usada en el presente estudio es la descrita por Muñoz (2012), la cual en un principio consiste en el desarrollo y crecimiento del hongo en los diferentes medios específicos para su crecimiento (Muñoz, 2012). Posteriormente se usó la metodología de Acevedo (1995), la cual consiste en poner un disco de *F. oxysporum* obtenido con el sacabocados de aproximadamente 5 mm en un extremo de la caja Petri con medio Potato dextro agar PDA (DIFCO) y al otro extremo depositar un disco de *Trichoderma* para así realizar finalmente el ensayo por triplicado (Acevedo, 1995).

4.1.1 Obtención de microorganismos para su multiplicación

Las cepas estudiadas de *Trichoderma* fueron obtenidas del banco de microorganismos del laboratorio de Agrobiotecnología y Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, las cuales fueron previamente recolectadas en cinco diferentes fincas ubicadas en la sierra ecuatoriana y que además fueron caracterizadas a nivel molecular y funcional (Muñoz, 2012).

Localidad	Trichoderma	Código	Especie
Imbabura	2	C2BR6	<i>Trichoderma harzanium</i>
Imbabura	5	C4BR3	<i>Trichoderma harzanium</i>
Imbabura	6	C5AR6	<i>Trichoderma asperelum</i>
Pichincha	7	P1AR6	<i>Trichoderma asperelum</i>
Pichincha	8	P1AR1	<i>Trichoderma harzanium</i>
Cotopaxi	16	T2AR3	<i>Trichoderma asperelum</i>
Cotopaxi	18	T3CR4	<i>Trichoderma asperelum</i>
Cotopaxi	20	T5BR5	<i>Trichoderma asperelum</i>
Cotopaxi	21	T5CR1	<i>Trichoderma asperelum</i>
Chimborazo	24	S2BR1	<i>Trichoderma asperelum</i>
Chimborazo	25	S2CR1	<i>Trichoderma asperelum</i>
Chimborazo	26	S3AR1	<i>Trichoderma asperelum</i>
Chimborazo	27	S3CR3	<i>Trichoderma asperelum</i>
Chimborazo	28	S5CR6	<i>Trichoderma asperelum</i>
Chimborazo	29	S5C(2)R6	<i>Trichoderma asperelum</i>
Loja	33	L3CR2	<i>Trichoderma harzanium</i>

Para la obtención de *Fusarium*, se obtuvo de igual manera del Banco de microorganismos del laboratorio de Agrobiotecnología y Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, proveniente de un estudio realizado con anterioridad por Mishell Corral 2017, *Fusarium* obtenido de banano (*Musa paradisiaca*).

4.1.2 Crecimiento de *F. oxysporum*

El medio seleccionado para la siembra de *F. oxysporum* fue PDA, este medio es específico para el crecimiento de hongos. Según Ellis (1968) se observaron estudios en

los cuales se ve un alto índice de crecimiento general de hongos (Ellis, 1968). Para la realización del medio, se tomaron 49 gr de medio PDA y se los disolvió en agua destilada. Luego se procedió a autoclavar la mezcla a 121°C por 20 minutos. Una vez finalizado el proceso de autoclavado y, una vez se alcanzó una temperatura inferior a 45 °C, se colocó gentamicina en la mezcla, en una dosis de 160 mg por litro. Finalmente, en la cámara de flujo laminar se dispensó el medio en cajas Petri plásticas. Una vez que el medio PDA se solidificó, se procedió a colocar *F. oxysporum* con el uso de palillos estériles de madera, que previamente fueron autoclavados para evitar la contaminación de los medios. El palillo con la muestra de *F. oxysporum* fue introducido en el medio de la caja. Para evitar la contaminación de las cajas Petri, éstas fueron selladas con doble cinta Parafilm. Finalmente se depositó las cajas en la incubadora a 30°C hasta que el hongo ocupó toda la superficie de la caja (aproximadamente 10 días), una vez que se alcanzó el crecimiento deseado del hongo, cada caja fue almacenada a 4 °C hasta su posterior uso.

4.1.3 Crecimiento de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum*

El medio seleccionado para la siembra de *Trichoderma* fue TSM, este medio es específico para su crecimiento (EladI, 1981). Para la realización del medio, se preparó medio TSM (Anexo 1) y se disolvió en 1 litro de agua destilada. Luego se procedió autoclavar la mezcla a 121°C por 20 minutos. Una vez finalizado el proceso de autolavado se colocó gentamicina en la mezcla cuando la temperatura fue inferior a 45 °C, en una dosis de 160 mg por litro. Finalmente, en la cámara de flujo laminar se dispensó el medio en cajas Petri plásticas.

Una vez que el medio TSM se solidificó, se procedió a tomar las 16 diferentes cepas liofilizadas de *Trichoderma*, mediante el uso de una micropipeta previamente autoclavada y a inocularlas en medio de la caja Petri. Una vez liberada *Trichoderma* en

el medio, mediante el uso de una Asa de extensión se desplaza *Trichoderma* por toda la caja Petri. Para evitar la contaminación, las cajas Petri fueron selladas con doble cinta Parafilm. Se procedió de igual manera con cada una de las 16 cepas de *Trichoderma*. Finalmente, las cajas fueron colocadas en la incubadora a 26°C hasta que el hongo ocupó toda la superficie de la caja (aproximadamente 7 días); una vez que se observó el crecimiento del hongo, cada caja fue almacenada a 4° hasta su posterior uso.

4.1.4 Identificación de material vegetal sembrado

Una vez que se obtuvo el material vegetal se procedió a identificar que *Trichoderma* spp y *F. oxysporum* presentaran las características morfológicas esperadas, de acuerdo a las claves taxonómicas de descritas por (Muñoz, 2012). Una vez identificados los hongos, cada cepa fue cultivada por triplicado para proseguir a la siguiente parte del experimento.

4.1.5 Evaluación del efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *F. oxysporum*

El medio seleccionado para la siembra de *F. oxysporum* y *Trichoderma* spp. fue PDA. Para la preparación del medio, se tomaron 98 gr de medio PDA y se los disolvió en 2 litros de agua destilada. Luego se procedió autoclavar la mezcla a 121°C por 20 minutos. Una vez finalizado el proceso de autolavado se colocó gentamicina en la mezcla, cuando la temperatura fue inferior a 45 °C, en una dosis de 160 mg por litro. Finalmente, en la cámara de flujo laminar, el medio de cultivo fue dispensado en cajas Petri plásticas. Se obtuvieron aproximadamente 60 cajas Petri con medio PDA en su interior, esto con la finalidad de realizar cada experimento por triplicado. Mediante el uso de un sacabocados se sacaron muestras de *F. oxysporum*, que fueron depositadas en un extremo de las cajas

Petri, esto se realizó por 48 repeticiones, más otras 16 cajas Petri que fueron tomadas como controles. Una vez sembrado el hongo *F. oxysporum*, se selló con doble cinta Parafilm y se depositó las cajas Petri en la incubadora que se encontraba a 30°C, durante 3 días, cuando ya se puede observar el inicio de crecimiento del hongo (aproximadamente 1 cm de diámetro). Luego de los tres días se procedió a realizar de la misma manera que para *F. oxysporum*, la siembra de *Trichoderma* spp. al extremo opuesto de la caja Petri.

4.1.6 Obtención de Resultados: crecimiento de micelio.

Para la obtención de datos se usó una regla de escala en mm. Se procedió a medir el crecimiento tanto de *F. oxysporum* como de *Trichoderma* spp. Luego, se colocó la regla en uno de los extremos y se midió en cm. Se tomó datos hasta observar el crecimiento total de los controles.

4.1.7 Análisis estadístico

Mediante la obtención de los resultados de antagonismo y micoparasitismo, se procedió a realizar un análisis mediante el uso del modelo estadístico de ANOVA. Luego se realizó la prueba de significancia de Tukey al 5%. (Sanchez, 2017).

5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Identificación morfológica de las cepas de *Trichoderma*

Luego de transcurrir los siete días de crecimiento de *Trichoderma* se procedió a observar las características morfológicas de las cepas. Las características que presentaron en cada una de las cepas usadas como tratamientos presentaron la morfología, los metabolitos, la formación de conidios los cuales permiten identificar cada una de las cepas de *Trichoderma* y de su característico verde alfombrado, junto con la formación de pequeños montículos blancos. Según Harman (1998), para identificar las cepas de *Trichoderma* se deben observar conidios a partir de células conidiógenas entero-blásticas fialídicas, estas se deben agrupar al final del conidióforo y presentaron formas ovoides, elipsoidales y redondas, con pared lisa, de color verde brillante (Harman G. K., 1998).

Al observar los resultados que se obtuvieron en la figura 3.1 y 3.2 fueron similares a los obtenidos por Muñoz (2012), las cuales fueron identificadas microscópicamente observando el crecimiento de colonias, la formación de penachos blancos de textura lanuda formando una conexión en el medio PDA. Otra de las características relacionadas son las que presentan el estudio realizado por Harman et al. (1998), la esporulación del hongo realiza un cambio en la coloración del micelio transformándolo de blanco a un color amarillento o verdoso. Se reportó un estudio en el que la observación microscópica de los conidióforos muestra una distribución piramidal, sumamente ramificada y erecta (Guigón C., 2010)

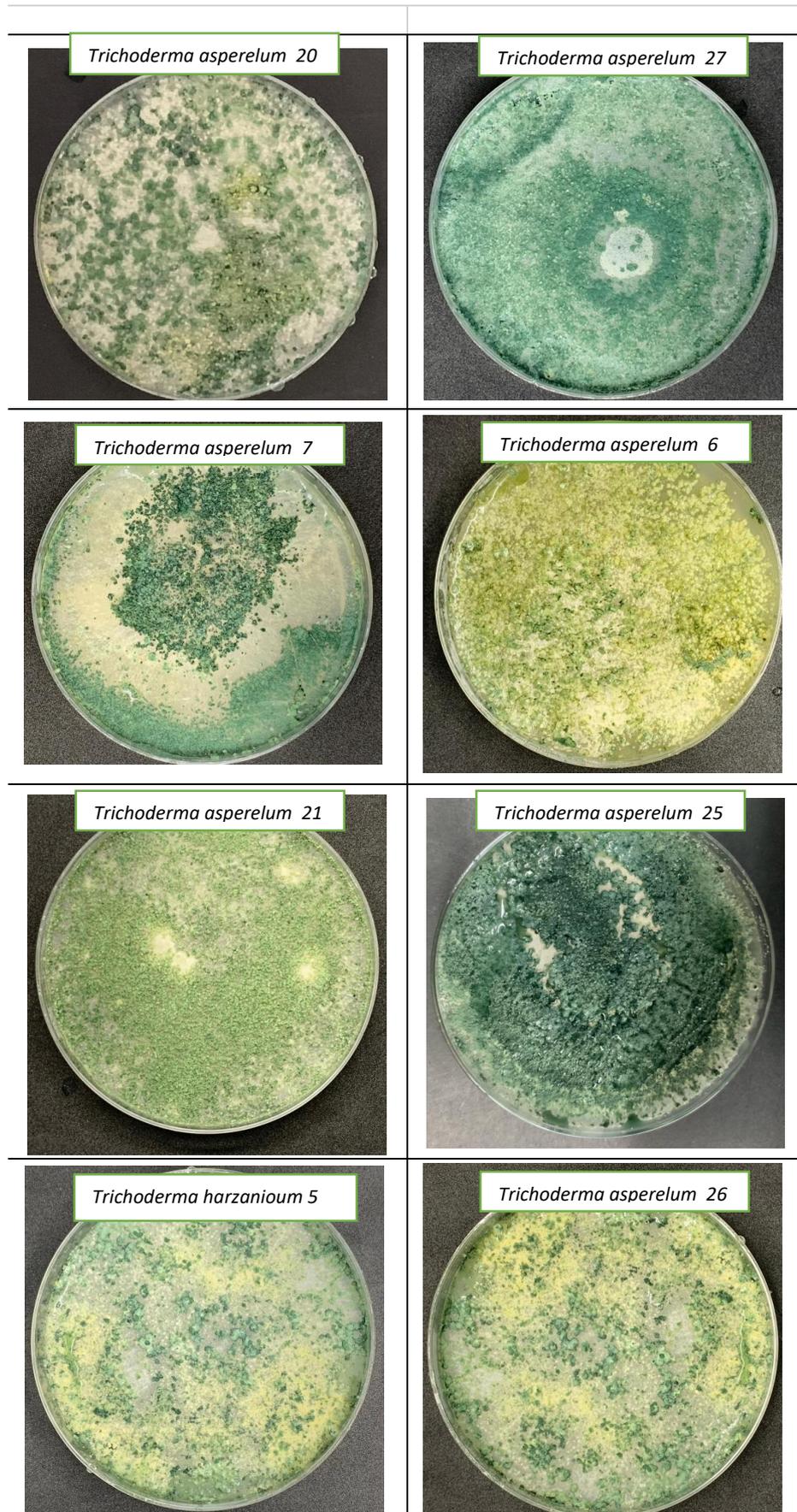


Figura 6.2. Identificación morfológica de las cepas de Trichoderma

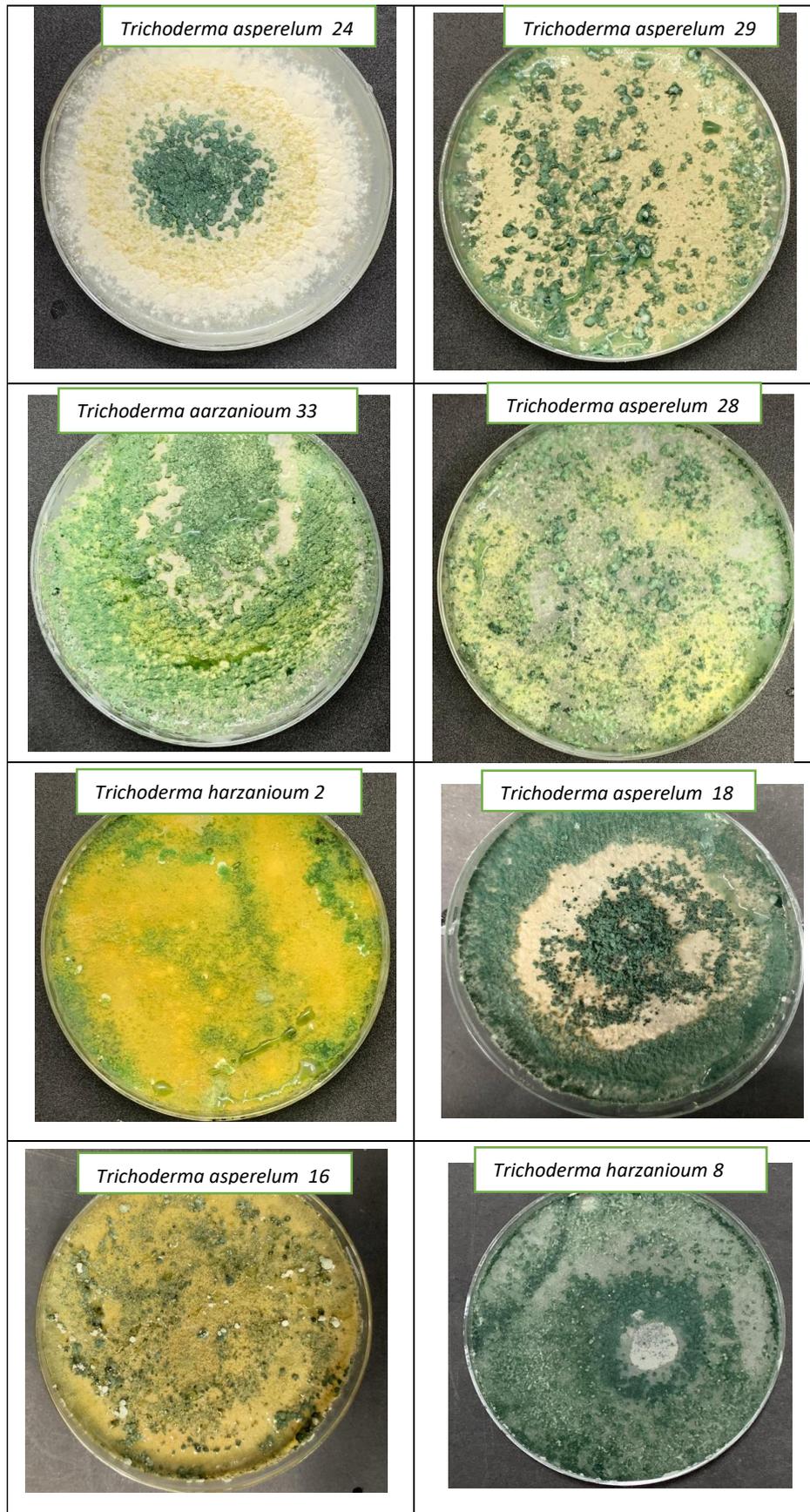


Figura 6.3. Identificación morfológica de las cepas de Trichoderma

5.1.1 Resultados antagonismos *Trichoderma* spp. vs *F. oxysporum*

Los resultados obtenidos por antagonismo se observan que en general las diferentes cepas de *Trichoderma* spp tuvieron un resultado similar en su enfrentamiento frente a *F. oxysporum*. Ciertas cepas mostraron una mayor cobertura, pero ninguna con un resultado significativamente distinto entre cepas, cayendo en el mismo rango estadístico (Figura 6,5).

Resultado de antagonismo de *Trichoderma* vs *Fusarium*

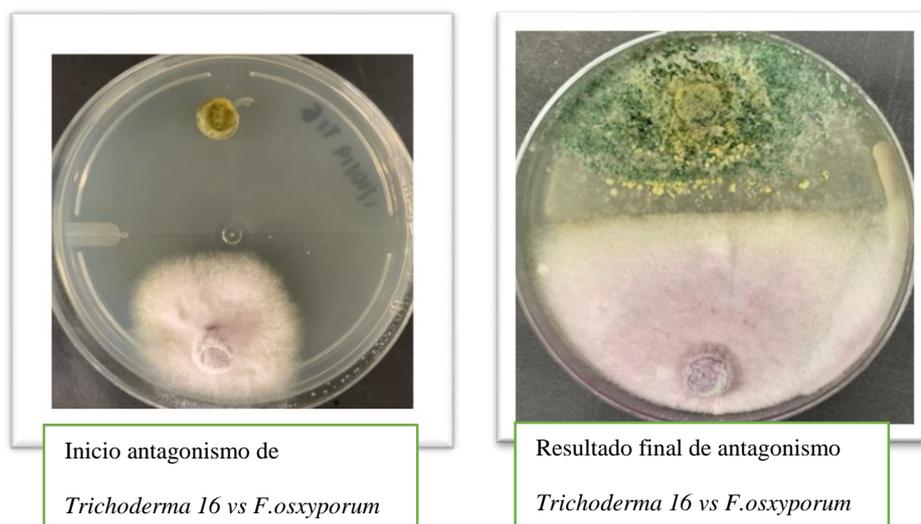


Figura 6.4 Resultado de antagonismo de *Trichoderma* vs *Fusarium*

Se observa el crecimiento de la *Trichoderma* 16 frente a *F. oxysporum*. La cepa número 16 fue de las de mejor crecimiento frente a *F. oxysporum*, se puede observar en los resultados obtenidos donde creció en promedio 2,7 cm de los posibles 7 cm del control sin patógeno. Las cepas de *Trichoderma* spp. no presentan una mayor diferencia entre sus cepas (Figura 6,5). Por otro lado, la cepa de *Trichoderma* spp. número 5 presentó una menor inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*. Según Rivero al. (2008) evaluar los

efectos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Fusarium*, la antibiosis libera metabolitos que inhiben el crecimiento de *F. oxysporum*. (Rivero, 2008)

Diferencia significativa del crecimiento de *F. oxysporum* frente a cepas de *Trichoderma* spp

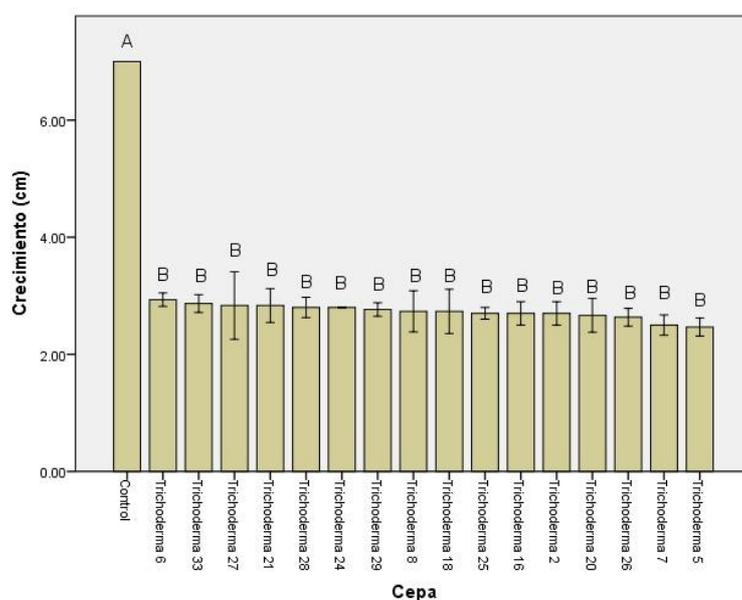


Figura 6.5 Grafica *F. oxysporum* frente a *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* no presentan una mayor diferencia significativa entre sus cepas con respecto a la inhibición del patógeno. El control presenta una diferencia significativa debido a que en este caso *F. oxysporum* no tuvo enfrentamiento frente a *Trichoderma* spp. Se esperó a que *Fusarium* complete en crecimiento dentro de la caja Petri, 7 cm desde el punto de siembra. La cepa de *T. asperelum* 6 presentó la mejor inhibición de crecimiento de *F. oxysporum* mientras que la cepa de *T. harzanioum* número

5 fue la que menor inhibición de crecimiento de *F. oxysporum*. Ninguna de las cepas de *Trichoderma* spp. muestra diferencia estadística frente al crecimiento de *F. oxysporum*, esto quiere decir que todas se encuentran dentro del mismo rango de crecimiento.

En el estudio realizado en Colombia por Reinel (2009) sobre antagonismo *in vitro* sobre *T. harzianum* frente a *F. oxysporum*, se observa que no existe diferencia estadística significativa entre las medias de crecimiento de *Trichoderma*, teniendo un mayor crecimiento notable frente a *Fusarium* en un medio agar Sabouraud dextrosa (ASD) (Reinel J., 2009). En este específico caso el crecimiento de *Trichoderma* fue notablemente mayor que el de *F. oxysporum*, esto se debe a que la siembra tanto de *Trichoderma* como de *Fusarium* fue realizado el mismo día. *Trichoderma* presenta una esporulación más rápida (Vasquez, 2010), esto quiere decir que el crecimiento de *Trichoderma* va hacer mucho más rápida es por eso que para este experimento se permitió un previo desarrollo de *Fusarium* con 3 días antes de realizar las competencias por espacio y nutrientes.

Tabla 1: Análisis de la varianza del crecimiento de *Fusarium* frente a *Trichoderma*

ANOVA Crecimiento <i>Fusarium</i> (cm)					
FV	GL	SC	CM	F calcula	P-Value
Total	50	54.2204			
Tratamientos	16	52.1937	3.26211	54.726*	1.95
E.E	34	2.02667	0.05961		

Tabla 1 ANALISIS DE LA VARIANZA DEL CRECIMIENTO *F. Oxysporum* frente a *Trichoderma* spp.

Cv 14.1421356

SY 0.14095844

SD 0.19934533

El coeficiente de variación es de 14.14% con intervalo de confianza del 95%. Lo cual se encuentra en un rango de confianza aceptable. Según (Sanchez, 2017), los experimentos que son realizados bajo condiciones de laboratorio muestran un 5% de coeficiente de variación, mientras que los experimentos realizados en invernadero un 10% y los realizados en campo un 15% para ser fiables. . Esto se debe a que las medias de los tratamientos se encuentran dentro de un rango mientras que el control esta fuera del rango de las medias. Esto quiere decir que existió una diferencia estadística significativa entre las cepas de *Trichoderma* en estudio y el control.

En los resultados presentados en la Figura 6.5 no se observa diferencia significativa entre las cepas estudiadas. El control marca la única diferencia significativa entre todos los resultados obtenidos. La prueba de Tukey al 5% realizada muestra que no existe diferencia entre las medias de las cepas en estudio, con excepción del control (Sanchez, 2017).

5.2 Obtención de resultados de micoparasitismo de *Trichoderma* vs *F. oxysporum*

La definición de micoparasitismo o considerada también como simbiosis antagónica entre organismos, es la parasitación de un hongo por a otro mediante una acción enzimática o acción mecánica. El ataque de un hongo a otro provoca la destrucción estructural que además sirve para que el hongo hospedero sea una fuente de nutrientes (Van Gelden, 2009). *Trichoderma* actúa frente a *Fusarium* como un agente parasitante, en el cual luego de haber inhibido su crecimiento y nutrientes lo usa como un agente hospedero.

En los resultados obtenidos se observa como una ligera cobertura verde comienza a recubrir el patógeno, esto sucede una vez que el crecimiento de *Trichoderma* se ve

limitado por el espacio. Cuando las cepas de *Trichoderma* en estudio están en el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente sobre el patógeno, de esta manera se adhieren a las hifas de *F. oxysporum*, para así de esta manera observar finalmente la degradación de la pared celular del hospedero (Carsolio C., 1999) .

Tabla 2: Escala de porcentaje de micoparasitismo de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum*

Escala de micoparasitismo	
Porcentaje	Cobertura
25%	Ligera cobertura sobre el patógeno
50%	Media cobertura sobre el patógeno
75%	Alta cobertura sobre el patógeno
100%	Completa cobertura sobre el patógeno

Tabla 2 Escala de porcentaje de micoparasitismo *de Trichoderma sobre F. oxysporum*

***Trichoderma* 27 frente a *F. oxysporum* con 60% de micoparasitismo**



Figura 6.6 Resultado final de 60% de micoparasitismo *Trichoderma* vs *F. oxysporum*

***Trichoderma* 16 frente a *F. oxysporum* con 15% de micoparasitismo**



Figura 6.7 Resultado final de 15% de micoparasitismo *Trichoderma* vs *F. oxysporum*

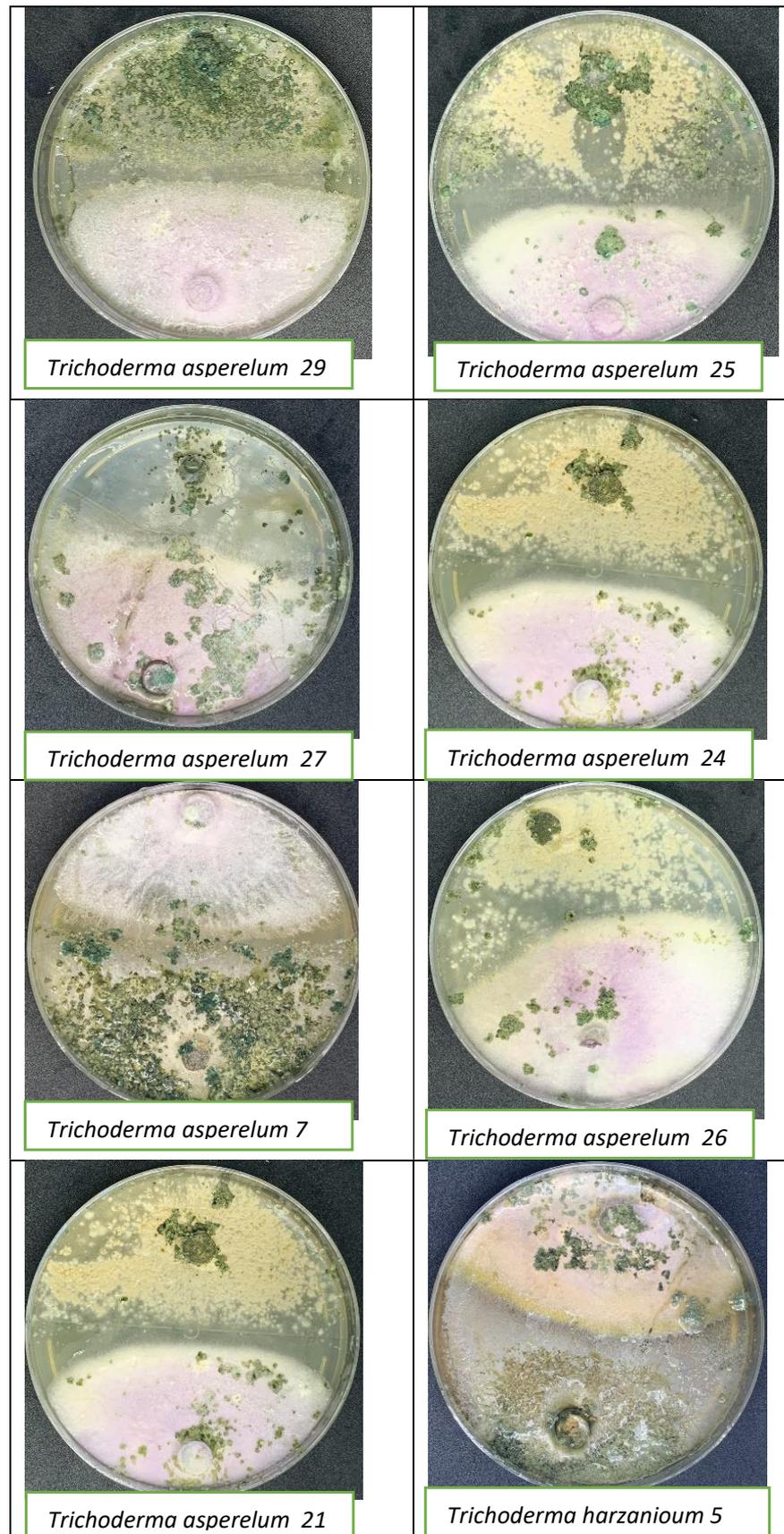


Figura 6.8 Micoparasitismo de *Trichoderma* spp sobre *F. oxysporum*

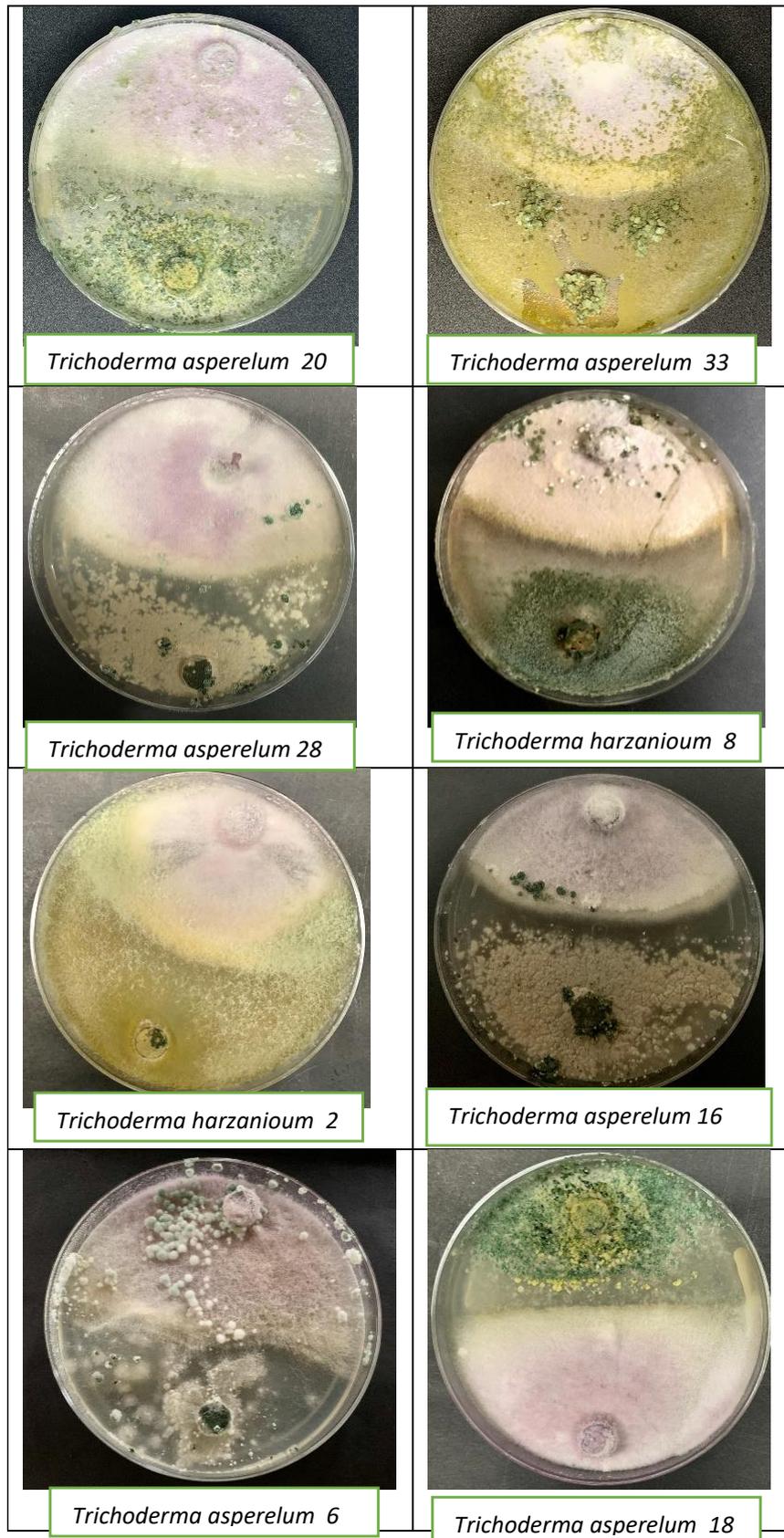


Figura 6.9 Micoparasitismo de *Trichoderma* spp sobre *F. oxysporum*

Gráfica y análisis de la varianza sobre el crecimiento de *F. oxysporum* frente a *Trichoderma*

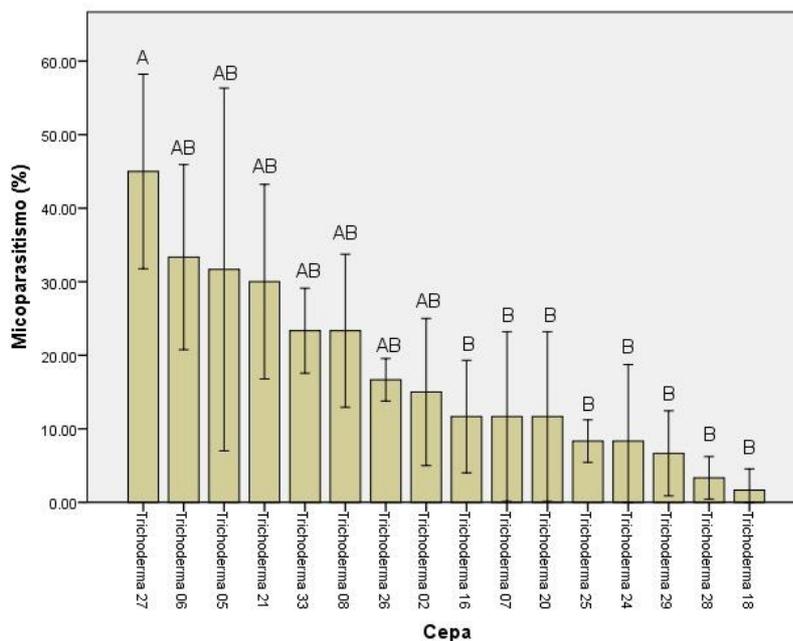


Figura 6,7 Diferencia significativa entre las diferentes cepas de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* presentan diferencia significativa entre la media de *Trichoderma 27* frente a las medias de las cepas de *Trichoderma 16, 7, 20, 25, 24, 29, 26* y *18*. La cepa de *Trichoderma 27* presenta un mayor porcentaje de micoparasitismo frente al resto de biocontroladores. En cuanto a los resultados del resto de cepas de *Trichoderma* pueden ser de menor porcentaje de micoparasitismo debido a que las condiciones ambientales y nutritivas no fueron las indicadas. Según Papavizas, G. (1990), *Trichoderma* requiere de materia orgánica para tener un mejor crecimiento. Por este motivo cuando se realiza una constante aplicación de *Trichoderma* se recomienda el uso de fertilizantes y nutrientes, esto con el fin de un mejor crecimiento y desarrollo (Benítez T., 2004).

5.3 Análisis de la varianza del crecimiento de *Fusarium* frente a *Trichoderma*

Tabla 4: Análisis de la varianza de micoparasitismo

ANOVA Micoparasitismo <i>Trichoderma</i> frente a <i>Fusarium</i>					
FV	GL	SC	CM	FCalculada	P-value
Total	47	1.05495			
Tratamientos	15	0.68328	0.04555	3.92197*	0.001
E.E	32	0.37167	0.01161		

Tabla 3 Análisis de la varianza de micoparasitismo

Cv 25.68585824

Sy 0.062221602

Sd 0.087994634

Existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, esto significa que existe diferencia estadística entre las medias obtenidas, por lo tanto, se podría recomendar el uso de la *Trichoderma 27* como agente biocontrolador. Por otro lado, el coeficiente de variación de un 25 por ciento con un intervalo de confianza del 95 por ciento se encuentra como datos no confiables. Esto se puede deber a que existieron cepas que el tiempo de estudio no lograron un desarrollo óptimo como el resto de las cepas.

6 CONCLUSIONES

Se replicaron con éxito 16 cepas de *Trichoderma asperelum* y *Trichoderma harzianum*, las cuales fueron previamente estudiadas por Javier Muñoz en su trabajo sobre “Caracterización molecular y funcional de *Trichoderma* spp. recolectadas en fincas orgánicas de la región sierra del Ecuador” éstas fueron preservadas en el banco del laboratorio USFQ (Muñoz, 2012).

Se reactivó y cultivó con éxito las cepas de *Fusarium oxysporum* obtenidas mediante el aislamiento de una cepa obtenida del cultivo de banano. De las 48 réplicas se realizaron los repiques donde todas crecieron.

Para el primer experimento se pudo evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum*, donde todas las cepas inhibieron el crecimiento del patógeno. Siendo de esta manera *Trichoderma* 6 la más eficiente y *Trichoderma* 5 la menos eficiente, pero ninguna de las dos presentó una diferencia significativa entre estos tratamientos.

En el segundo experimento se evaluó el micoparasitismo de *Trichoderma* spp sobre *F. oxysporum*. Existieron varias cepas que no lograron micoparasitismo, siendo *Trichoderma* 18 la menos eficiente. Por otro lado, la cepa *Trichoderma* 27 fue la que mayor porcentaje de micoparasitismo presentó.

7 ANEXOS

ANEXO A: Medio selectivo Trichoderma TSM

Componente	Cantidad (g/L)
Nitrato de Calcio tetra-hidratado	1,4
Nitrato de Potasio	0,26
Sulfato de Magnesio hepta-hidratado	0,26
Fosfato de Potasio	0,12
Cloruro de Calcio di-hidratado	1
Ácido Cítrico	0,05
Sacarosa	2
Agar	20
Tween 20	1mL
Gentamicina	1 ampolleta
Captan 80	0,05
Rovral 50	0,05

Tomar en cuenta pH 6.5 – 7

Fuente: (Elad, 1981)

8 BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, R. (1995). *Control biológico de la pudrición blanca del ajo (Sclerotium cepivorum Berk) utilizando el micoparasitismo Trichoderma spp.* . San Crstobal: Universidad Nacional Experimental de Táchira.
- Ahmad, J. B. (1987). Rhizosphere Competence of *Trichoderma harzianum*. En J. B. Ahmad, *Phytopathol* (págs. 182-189).
- Araya, R. F. (2003). Efectividad de varios biocontroladores en el control de plagas en la Zona Norte Costa Rica . *Tecnología en marcha* , 92:83.
- Benítez T., R. A. (2004). Biocontrol Mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260. .
- Bharathi, R. M. (2012). Induction of chitinase and β -1, 3-glucanase PR proteins in tomato through h liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium wilt*. *Journal of Today's Biological Sciences: Research & Review*, 50-60.
- Bravo, V. R. (2016). Efecto enraizador de *Trichoderma Asperellum* en el cultivo de palma aceitera. *Ecuador es calidad: Revista Científica Ecuatoriana*, 2016, *Especial de Suelos*, 21-23.
- Carsolio C., B. N. (1999). Carsolio Carolina, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutierrez Ana, Chet I, Herrera-Estrella A. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol.*, 929-935.
- Carvajal, F. (2011). *Ecuador: la evolución de su economía 1950-2008*. Flacso, Economía. Quito: Estado País.
- Chiriboga, H. G. (2015). *Trichoderma spp, para el control biologico de enfermedades*. Paraguay: IICA.

- EladI, Y. C. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 59-67.
- Ellis, M. (1968). *Alternaria brassicae*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*, 162-171.
- FAO. (9 de 12 de 2019). *Food and Agriculture Organization*. Obtenido de FAO: <http://www.fao.org/3/a1374s/a1374s06.pdf>
- FAO. (s.f.). *Food and Agriculture Organization*. Obtenido de Food and Agriculture Organization: <http://www.fao.org/3/y5673s/y5673s05.htm>
- Gonzalez, J. M. (2005). Evaluacion de diferentes cepas de *Trichoderma* spp contra *Fusarium oxysporum* agente causasal de la pudricion de las plantulas de papaya. *Revista UDO Agricola*, 46:47.
- Guigón C., G. V. (2010). Molecular Identification of *Trichoderma* spp. Strains, in vitro Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología.*, 28: 87-96. .
- Harman, G. (2003). *Universidad Nacional de Colombia*. Obtenido de ibun.unal.edu.co: <http://ibun.unal.edu.co/index.php/ct-menu-item-67>
- Harman, G. (2004). *Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on Trichoderma harzianum T22*. Genova: The American Phytopathological Society.
- Harman, G. (2004). *Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on Trichoderma harzianum T22*. Genova: The American Phytopathological Society.
- Harman, G. K. (1998). *Trichoderma and Gliocadium. Basic biology. Taxonomy and genetics*. United Kingdom: Taylor & Francis UK .

- Harman, G. (s.f.). Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22.
- Herrea, F. (2016). Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de *Alternaria* spp. sobre botones de Rosa (*Rosa* sp) y plantas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Universidad San Francisco de Quito*, 13-14.
- Hjeljord, L. T. (1998). *Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview*. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Vienna: Taylor & Francis Ltd .
- INEC. (2013). *Módulo Ambiental uso de Plaguicidas en el Medio Ambiente* . Quito: Ecuador en cifras.
- INEC. (2016). *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. Obtenido de Ecuador en cifras: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Informacion_ambiental_en_la_agricultura/2016/PRESENTACION_AGRO_AMBIENTE_2016.pdf
- Infante, D. M. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos *S. Rev. Protección Veg.*, 14-21.
- López, R. (2011). *Detección y cuantificación de Trichoderma harzianum, y evaluación de su actividad biocontrol frente a la fusariosis vascular del melón mediante la aplicación de herramientas moleculares*. Alicante: Universidad de Alicante .
- Lorenzo, N. (2001). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. *Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana*.

- Mendez, V. M. (26 de Noviembre de 1999). *Medidas para Conservar Frutas y Hortalizas Control Biológico Postcosecha*. Obtenido de Horticultura Internacional: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/art_horticultura.pdf
- Monteros, A. S. (Diciembre de 2015). *Sinagap*. (G. A. Ministerio de agricultura, Productor) Recuperado el 13 de Marzo de 2018, de Panorama Agroeconomico del Ecuador Una Visión al 2015: http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/panorama_agro-economico_ecuador2015.pdf
- Munoz, J. (2012). *Caracterización molecular y funcional de Trichoderma spp. recolectadas en fincas orgánicas de la región sierra del Ecuador*. 2012: Departamento de ciencias de la vida carrera de Biotecnologica.
- Papavizas G., R. S. (1990). (1990). Development of mutants of *Gliocladium virens* tolerant to benomyl. *Canadian Journal Microbiology*, 36: 484 – 489.
- Pérez, L. V. (2009). Eficacia de *Trichoderma harzianum* a34 en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. Sp . cubense, agente causal de la marchitez por fusarium o mal de Panamá de los bananos en Cuba. *sciELO*, 1:2.
- Punschke, K. (2015). *Registro y control de productos formulados con agentes de control biológico de uso agrícola..* Uruguay: Dirección General de Servicios Agrícolas - MGAP.
- Reinel J., F. B. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 4743-4748.
- Rivero, D. (2008). Identificación y control in vitro con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev Protección Veg*, 67.

- Rodríguez, A. S. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*.
- Rubio, V. F. (2006). *Control Biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Madrid: Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC).
- Sanchez, J. (2017). *Introducción al Diseño Experimental*. Quito: Giro Creativo.
- SENASA. (29 de 11 de 2016). *Ministerio de Agricultura Peru*. Obtenido de SENASA: <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/importancia-del-control-biologico-de-plagas-en-la-agricultura-peruana/>
- Stefanova, M. L. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*, 509-516.
- Van Gelden, A. (2009). Micoparasitismo Biotrófico de *Fusarium oxysporum* sobre *Cunninghamella* sp. *Boletín Micológico*, 51;52.
- Vasquez, J. (2010). *Caracterización microbiológica de producción de Trichoderma*. Bogotá : Pontificia Universidad Javeriana.