

Artículo original

Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate

Clemencia Guédez^{a,*}, Luis Cañizalez^a, Carmen Castillo^a, Rafael Olivar^b

^aLaboratorio de Fitopatología y Control Biológico “Dr. Carlos Díaz Polanco”, Núcleo Universitario “Rafael Rangel”, Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela. ^bEscuela Técnica Agropecuaria Robinsoniana Zamorana. “Adolfo Navas Coronado”, Ministerio de Educación, Trujillo, Venezuela.

Recibido 3 de agosto de 2011; aceptado 22 de abril de 2012

Resumen: En este estudio se determinó la capacidad antagonista de aislamientos de *T. harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en raíces de plantas de tomate. Se obtuvieron 6 aislamientos de *T. harzianum* de 6 municipios del estado Trujillo, empleando la técnica de siembra directa de raíces en agar agua acidificada. El antagonismo se realizó en cultivos duales utilizando agar papa dextrosa, incubados a 25 °C, bajo un diseño al azar, con 18 tratamientos conformados por cada aislamiento de *T. harzianum* y cada patógeno, 3 tratamientos testigos correspondientes a cada patógeno y 3 repeticiones por tratamiento, evaluándose el modo de acción e inhibición del crecimiento radial al tercer día. Todos los aislamientos de *T. harzianum* mostraron un rápido crecimiento sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$), aún cuando se observó que el T121 fue más eficaz como controlador. Al comparar el crecimiento de los aislamientos de *T. harzianum* con el de los hongos patógenos, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$). Cuatro aislamientos de *T. harzianum* presentaron acción micoparasítica y dos de tipo antibiosis, mecanismos característicos de estas especies de biocontroladores. Todos los aislamientos de *T. harzianum* estudiados pueden ser utilizados para el control de patógenos de tomate.

Palabras clave: control biológico, antagonismo, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*.

In vitro evaluation of *Trichoderma harzianum* for control of *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, and *Fusarium oxysporum* in tomato plants

Abstract: This study determined the antagonistic capacity of *T. harzianum* isolates for control of *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, and *Fusarium oxysporum* in the roots of tomato plants. Six *T. harzianum* isolates were obtained from 6 municipalities of Trujillo State, using the direct inoculation of roots in acidified water agar technique. The antagonism was carried out in dual cultures using potato dextrose agar, incubated at 25 °C, under a random design, with 18 treatments conformed for each *T. harzianum* isolate and each pathogen, 3 control treatments corresponding to each pathogen, and 3 repetitions per treatment, evaluating the mode of action and inhibition of radial growth at the third day. All the *T. harzianum* isolates showed rapid growth without significant differences among them ($p > 0.05$), even though it was observed that T121 was more efficient as controller. When comparing the growth of the *T. harzianum* isolates with that of the pathogenic fungi, there were significant differences ($p < 0.05$). Four *T. harzianum* isolates showed mycoparasitic action, and two antibiosis type action, which are characteristic mechanisms of these bio-controlling species. All the *T. harzianum* isolates studied can be used for the control of tomato pathogens.

Keywords: biological control, antagonism, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*.

* Correspondencia:

E-mail: clemencia.guedez@gmail.com

Introducción

El tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) es uno de los cultivos hortícolas con mayor área cultivada a nivel mundial y, dada su importancia económica, es necesario realizar un buen manejo de plagas y enfermedades, para mantener la

demanda requerida. En Venezuela, el cultivo de tomate representa la principal hortaliza de producción, alcanzando para el año 2010 las 225.340 toneladas [1].

En los semilleros de tomate del estado Trujillo son comunes los hongos del suelo como *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp., que causan la enfermedad conocida como

“sancocho” o necrosis del tallo, siendo esta la enfermedad más importante en plántulas de tomate, debido a las grandes pérdidas que ocasiona en esta etapa del cultivo [2,3]. Es común realizar el control de esta enfermedad con productos químicos; sin embargo, su uso inconsciente ha traído como consecuencia la resistencia de los hongos del suelo a fungicidas, contaminación de los suelos, deterioro de la calidad del aire, agua y alimentos, así como también perjuicios a productores y consumidores [4-6].

La protección al medio ambiente y el desarrollo humano sustentable van de la mano. Sin embargo, uno de los problemas más importantes, a nivel mundial, es la conservación del ambiente y la salud humana, por lo que resulta innegable la necesidad de ampliar la investigación sobre la creación y utilización de métodos biológicos para la protección de los cultivos [7,8].

Uno de los métodos utilizado con este propósito es el control biológico a través de antagonistas. Los hongos del género *Trichoderma* poseen buenas cualidades por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, lo que ha permitido su utilización en el manejo de enfermedades de plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, como *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros [8-11].

Los mecanismos de acción mediante los cuales los aislamientos del género *Trichoderma* enfrentan al patógeno, son fundamentalmente de 3 tipos: competencia directa por el espacio o los nutrientes, fungistasis mediante producción de metabolitos secundarios de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de las especies sobre los hongos fitopatógenos [10-17].

A nivel mundial existen fórmulas comerciales basadas en el uso de especies de *Trichoderma* para el control de hongos fitopatógenos, las cuales no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas, debido a la diversidad de condiciones ambientales existentes en la naturaleza, que disminuyen la efectividad de estos productos [18]. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de aislamientos de *Trichoderma* autóctonos o nativos de cada región, que tengan efecto en el control de hongos patógenos de plantas bajo nuestras condiciones ambientales.

El control biológico basado en hongos como *Trichoderma*, es una estrategia efectiva a largo plazo, ya que es necesaria la adaptación del microorganismo al ambiente y su establecimiento en los ecosistemas, un mecanismo muy diferente al de los productos químicos, que son compuestos inertes. Todos estos aspectos deben tenerse en cuenta dentro del manejo integrado de enfermedades de plantas [18].

El objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* aislamientos autóctonos de *Trichoderma harzianum* provenientes de la rizósfera de raíces de plantas de tomate, para el control de *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum*.

Materiales y métodos

Toma de muestra en campo: Se muestrearon diferentes zonas productoras de tomate en seis municipios del estado

Trujillo. De cada siembra se tomaron 10 plantas, las cuales fueron escogidas entre toda la superficie sembrada. Se extrajeron plantas completas con las raíces y parte de suelo alrededor de ellas, se colocaron en bolsas plásticas y fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento. Los aislamientos de *T. harzianum* se realizaron a partir de plantas aparentemente sanas y, los aislamientos de los hongos del suelo patógenos del tomate, se obtuvieron de plantas enfermas con necrosis a nivel de cuello o raíz o con síntomas de marchitez.

Identificación y conservación de aislamientos de T. harzianum presentes en siembras de tomate: Los aislamientos de *T. harzianum* se aislaron de la rizósfera, empleando la técnica de siembra directa de raíces sin lavar en agar agua acidificada (AAa); ésta es una técnica que se implementó en nuestro laboratorio debido a que, comparada con las comúnmente utilizadas (diluciones seriadas de muestras de suelo o lavado de raíces propuesta por Garret [19]), se logró el aislamiento de colonias de hongos con menor contaminación bacteriana (muy común en muestras del suelo), así como colonias puras de los mismos en menor tiempo. La técnica consistió en cortar segmentos de 1cm de raíces secundarias provenientes de plantas de apariencia sana, eliminar el exceso de suelo con papel absorbente estéril y sembrar en medio de cultivo AAa en cajas de Petri, realizando observaciones periódicas para determinar la presencia de colonias de hongos, y así aislar las colonias puras en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Se descartaron las colonias de otros hongos, se seleccionaron las de color verde y se procedió a su identificación a través del montaje en lámina y el uso de las claves taxonómicas para el género *Trichoderma* de Barnett & Hunter [20]; para la identificación de la especie *T. harzianum* se usaron las claves de Domsch *et al* [21]. Todos los aislamientos fueron purificados y preservados en tubos de ensayo con PDA a temperatura de 10 °C para su posterior utilización.

Aislamiento e identificación de patógenos del suelo, asociados a plantas de tomate con necrosis del tallo: De la zona necrosada del tallo o raíz de la planta se tomaron fragmentos que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% por 3 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril, en condiciones de asepsia dentro de una cámara de aislamiento; se tomaron fracciones de 1 cm del área de avance de la enfermedad entre tejido necrosado y tejido sano [22], las cuales se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a temperatura ambiente (27 °C). Se realizaron observaciones diariamente hasta la aparición de colonias, las cuales fueron purificadas e identificadas en género y especie mediante claves taxonómicas [20,21,23], tomando en cuenta características como tipo de micelio, esporas o estructuras de resistencia. Se preservaron en tubos de ensayo con PDA para su posterior utilización.

Efecto antagónico de 6 aislamientos de T. harzianum

sobre los hongos *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum*: Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual [24]. Para ello se utilizaron cajas de Petri con 10 mL de medio de cultivo PDA. Se colocó en un extremo de la caja de Petri un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio del hongo patógeno (*R. solani*, *S. rolfsii* o *F. oxysporum*) y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio del antagonista (6 aislamientos de *T. harzianum*) con distancia de 4,5 cm aproximadamente entre ellos. Como testigos se colocaron en cajas de Petri los hongos fitopatógenos en un extremo sin la presencia de *T. harzianum*. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 27 °C hasta el contacto físico de antagonista y patógeno. Se realizaron mediciones del crecimiento radial de los hongos cada 24 horas.

En este ensayo se utilizaron 6 aislamientos de *T. harzianum*, uno de cada municipio bajo estudio y se realizó un diseño completamente al azar, con 18 tratamientos conformados por cada aislamiento de *T. harzianum* y cada patógeno y 3 tratamientos testigos correspondiente al crecimiento de cada patógeno para un total de 21 tratamientos, con 3 repeticiones por tratamiento, evaluándose el modo de acción e inhibición del crecimiento radial al tercer día.

El antagonismo de *T. harzianum* se evidenció estudiando las variables radio de crecimiento del antagonista, radio de crecimiento del patógeno y porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Se tomó como índice de antagonismo la invasión del antagonista sobre la superficie del micelio patógeno tomado en cuenta la escala mostrada en la tabla 1 [10]. El antagonismo se evaluó comparando las velocidades de crecimiento, para lo cual se midieron los radios de

Tabla 1. Escala de evaluación del antagonismo *in vitro*, tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum*.

Grado	Capacidad Antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo.
1	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno, esporulación sobre ella.

Ezziyyani M. *et al* [10].

crecimiento del patógeno, de los antagonistas y del testigo. Así mismo, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, a través de la fórmula de Ezziyyani [10]: $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$; donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial de los patógenos.

Para determinar el parasitismo, como posible mecanismo

de acción de los seis aislamientos de *T. harzianum*, se realizaron observaciones microscópicas de una muestra de la zona de encuentro en los cultivos duales, colocada en un portaobjeto y observada en un microscopio binocular marca Olympus modelo CX21 FS1, con aumento de 100X, donde se observó la interacción de las hifas antagonistas con las del patógeno, así como también el modo de acción por enrollamiento.

Los datos fueron analizados a través de un ANOVA y una comparación de medias de Tukey, a través del programa estadístico SAS Versión 9.1.

Resultados y discusión

Identificación de aislamientos de T. harzianum presentes en siembras de tomate: Se encontraron un total de 11 aislamientos de *Trichoderma* en todas las siembras de tomate de los municipios estudiados, de las cuales 6 se identificaron como *T. harzianum*; los otros aislamientos fueron preservados para estudios posteriores y forman parte de la colección del laboratorio.

Identificación de hongos patógenos del suelo asociados a la rizósfera de plantas de tomate: Del análisis de plantas con síntomas de enfermedad se identificaron los hongos *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum*, reconocidos como patógenos que causan enfermedades en este cultivo, disminuyendo drásticamente la producción. Estos hongos son causantes de pudriciones de raíces, marchitez y muerte de las plantas en semilleros y plantaciones de tomate; poseen la capacidad de mantenerse viables en el suelo aún en presencia o no del hospedero, debido a la presencia de esporas de resistencia como clamidosporas y estructuras como esclerocios [3,25-28].

Efecto antagónico de 6 aislamientos de T. harzianum sobre los hongos R. solani, S. rolfsii y F. oxysporum:

Competencia de nutrientes y espacio: Se determinó la competencia por nutrientes y espacio, encontrándose que los 6 aislamientos de *T. harzianum* (T813, T622, T121, T412, T523 y T212), se desarrollaron a una velocidad mayor a la de *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporu*. Los aislamientos de *T. harzianum* tuvieron un crecimiento promedio de 6,9; 6,6; 7,1; 6,5; 6,6 y 6,4 cm respectivamente al tercer día de enfrentamiento, mientras que los patógenos mostraron un crecimiento limitado en cultivo dual, con un promedio de 2,3 cm en todos los casos. La tasa de crecimiento de *Trichoderma* y de los fitopatógenos permitió determinar si en los cultivos apareados se debe sembrar uno de ellos antes (1 o 2 días), para conocer todo el potencial de producción de los metabolitos secundarios de los hongos [29]. En otras investigaciones de cultivos apareados entre *Trichoderma* spp. y varios fitopatógenos se han encontrado diferencias en el grado de antagonismo [30-32].

Todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron en crecimiento a los tres patógenos con diferencias significativas ($p < 0,05$) en la velocidad de crecimiento del

antagonista y el patógeno, observándose que el aislamiento T121 tuvo un crecimiento levemente mayor que los otros aislamientos de este hongo; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,005$) entre los 6 aislamientos de *T. harzianum* estudiados (Tabla 2). El hecho de que los aislamientos de *T. harzianum* tuvieran contacto rápidamente con los hongos patógenos en un lapso de 3 días, indica que existe agresividad; en este sentido Benhamou y Chet [33], indicaron que existe gran agresividad por parte del antagonista *T. harzianum* y susceptibilidad del fitopatógeno *R. solani*, con contacto desde el segundo día después de la inoculación. Sin embargo, se pueden obtener resultados diferentes con un primer contacto entre los 4 y 6 días en enfrentamientos entre *T. harzianum* y *F. subglutinans* [31]. La velocidad de crecimiento es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes; ésta es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio [24].

Tabla 2. Grado de parasitismo de *T. harzianum* sobre *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*.

Aislamiento	Grado de Parasitismo		
	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>F. oxysporum</i>
T813	2 a	1 b	1 b
T622	0 c	0 c	0 c
T121	2 a	1 b	1 b
T412	0 c	0 c	0 c
T523	1 b	1 b	1 b
T212	2 a	1 b	1 b

Letras iguales no presentan diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Lo anterior permite plantear que, con los aislamientos autóctonos de *T. harzianum*, es probable llegar a un control eficaz de los hongos patógenos *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum* en el cultivo de tomate, cuando se aplica de forma preventiva en semilleros y plantaciones definitivas, lo que permite la colonización de la rizósfera por la rapidez de crecimiento del hongo, impidiendo que proliferen poblaciones elevadas de hongos patógenos cerca de las plantas, siendo más eficiente cuando el antagonista se encuentra adaptado a las condiciones del medio ambiente [34]. Es conveniente evaluar todos estos aislamientos en bandejas germinadoras y semilleros, utilizando diferentes dosis, para dar una recomendación más apropiada y similar a las condiciones naturales.

Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii*: La inhibición del crecimiento se midió en todos los tratamientos al tercer día (Figura 1), aún cuando en algunos casos el antagonista se encontraba distante del patógeno a través de la antibiosis, mecanismo de acción característico para estas especies de biocontroladores, que se manifiesta por la asociación entre organismos o entre un

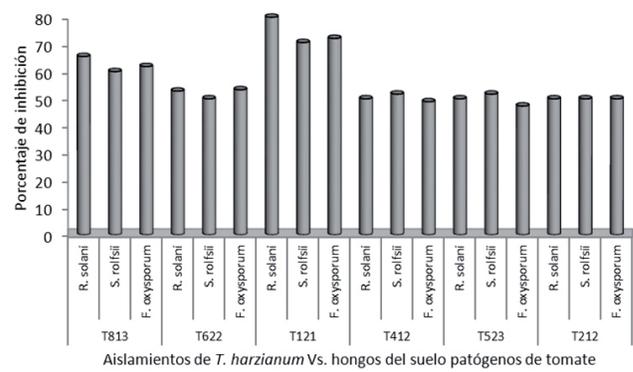


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial en cultivos duales de *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum* con aislamientos de *T. harzianum* al tercer día de evaluación.

organismo y un producto metabólico de otro organismo, que resulta perjudicial para uno de ellos [35]. La forma en que *T. harzianum* probablemente inhibe el crecimiento radial, aun estando a distancia del patógeno, está mediada por diversos mecanismos, destacándose la producción de compuestos inhibitorios al medio, antibiosis por producción de metabolitos volátiles y no volátiles (entre los cuales se encuentran, pirones, isocianatos, pépticos, y trichocinas), la producción de enzimas extracelulares difusibles hacia el patógeno (tales como peptinasas, cutinasas, glucanasas y quitinasas), así como inactivación de las mismas [36,37].

En los cultivos duales, la reducción del crecimiento de *R. solani* (Figura 2), se evidenció al tercer día en todos los tratamientos, con un porcentaje de inhibición superior al 50%; el aislamiento T121 presentó el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento contra los 3 hongos patógenos, con un 80%, 72% y 71% para *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii*, respectivamente, seguido por el aislamiento T813, con un 66%, 62% y 60% para los hongos mencionados anteriormente en el mismo orden, con diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$); los demás aislamientos no presentaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de inhibición.

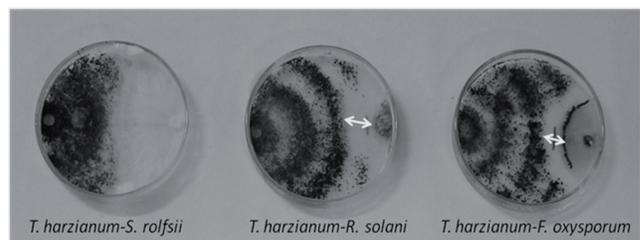


Figura 2. Inhibición del crecimiento de *S. rolfsii*, *R. solani* y *F. oxysporum* frente aislamientos de *T. harzianum* en cultivos duales, al séptimo día, a 27 °C. (Flecha: posible fungistasis).

Los valores de inhibición para *F. oxysporum* obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Michel-Aceves *et al.* [31,38], quienes encontraron que al evaluar el efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma* spp, sobre el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, los valores máximos de inhibición fueron de 47,6% y 73%, respectivamente. En otra investigación se

informó un alto porcentaje de inhibición (77,8%) para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [39].

Los mecanismos empleados por los agentes de control biológico, para controlar enfermedades de las plantas son muchos y complejas, y dependen del tipo de interacción hospedero-patógeno. Estos mecanismos pueden verse influenciados por el tipo de suelo, la temperatura, pH, humedad del ambiente y del suelo, así como por otros miembros de la microflora [36].

Se conoce que para el manejo de hongos del suelo, especialmente de *F. oxysporum*, se deben realizar aplicaciones de biocontroladores de manera preventiva, por lo tanto es conveniente elegir un aislamiento del antagonista que tenga una velocidad mayor de crecimiento que el hongo patógeno, semejante al comportamiento del aislamiento T121.

Grado de parasitismo de 6 aislamientos de Trichoderma harzianum: Cuatro aislamientos (T813, T121, T523, T212) presentaron modo de acción del tipo micoparasítico y dos del tipo fungistático (T622, T412) (Figuras 2 y 3). Los primeros lograron crecer sobre la mitad de la superficie del micelio de *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum*, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grado de parasitismo con respecto a la invasión grado 1 de *S. rolfsii* y *F. oxysporum*. El parasitismo se evidenció en las observaciones microscópicas, que mostraron enrollamiento de las hifas de *T. harzianum*.



Figura 3. Enrollamiento de *T. harzianum* ejercido sobre *F. oxysporum* (100X).

Existen informes de investigaciones donde *F. oxysporum* puede ser atacado por especies de *Trichoderma* y se ha observado parasitismo de aislamientos de este antagonista sobre *F. solani* [40,41].

El género *Trichoderma* está catalogado entre los agentes de control biológico más eficientes, debido al amplio espectro antagonista que presenta, la producción de enzimas extracelulares con actividad antibiótica, el parasitismo y la habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas, entre otros mecanismos de acción [35,36,42].

Conclusiones

Los seis aislamientos de *T. harzianum* evaluados en este

estudio son promisorios, en condiciones *in vitro*, para el control de hongos patógenos del tomate.

Los principales modos de acción de los aislamientos de *T. harzianum* fueron parasitismo y competencia de nutrientes y espacio, ya que se desarrollaron rápidamente, superando el crecimiento de *R. solani*, *S. rolfsii* y *F. oxysporum*, impidiendo el desarrollo normal e inhibiendo en más del 50% su desarrollo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA), por el financiamiento otorgado a la investigación, a través del Proyecto código NURR-C-503-09-01.B.

Referencias

1. Ministerio de Agricultura y Tierras. Producción de Hortalizas para el año 2010, 2011. En: http://www.mat.gob.ve/publiarchivos/boletin_electronico.html. Acceso: 30 de junio 2011.
2. Perdomo M, Peña J, Guédez C, Castillo C, Cañizalez L. *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad "Sancocho" en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Academia. 2007; 12:52-61.
3. Agrios GN. Fitopatología, 2ª ed. México: Editorial Limusa; 1995.
4. Hernández FD, Carvajal CR, Guerrero E, Sánchez A, Gallegos G, Lira RH. Susceptibilidad a fungicidas de grupos de anastomosis del hongo de *Rhizoctonia solani* Kühn colectados en zonas paperas de Chihuahua, México. Rev Int Bot Exp. 2005; 1:259-69.
5. Riveros BF, Sotomayor R, Rivera V, Secor G, Espinoza B. Resistencia de *Phytophthora infestans* (montagne) de bary a metalaxil en cultivo de papas en el norte de Chile. Agric Téc. 2003; 63:117-24.
6. Albert LA. Panorama de los plaguicidas en México. Rev Tox. 2004; 2:1-17.
7. Izquierdo J. Manual práctico de manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos hidropónicos en invernaderos. FAO/RLCA. En: <http://www.rle.fao.org/es/agricultura/aup/pdf/mip.pdf>. Acceso 30 de junio 2011.
8. Sempere F, Santamarina MP. *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. Mycopathol. 2007; 163:83-90.
9. Guédez C, Castillo C, Cañizalez L, Olivar R. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Academia. 2008; 13:50-74.
10. Ezziyyani M, Pérez C, Requena ME, Rubio L, Candela ME. Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anal Biol. 2004; 26:69-78.
11. Bernal A, Andréu CM, Moya MM, González O. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp *cubense* (e.f. Smith) Syd & Hans. Phytopathol. 2000; 12:16-9.
12. Ezziyyani M, Pérez C, Sid-Ahmed A, Requena ME, Candela ME. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el

- biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*). Anal Biol. 2004; 26:35-45.
13. Elad Y, Sadowsky Z, Chet I. Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. Trans Br Mycol Soc. 1987; 88:259-63.
 14. Chet I, Ibar J. Biological control of fungal pathogens. Appl Biochem Biotechnol. 1994; 48:37-43.
 15. Belanger R, Dufuor N, Caron J, Benhamou N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Bioc Sci Technol. 1995; 5:41-54.
 16. Chet I, Ibar J, Hadar I. Fungal antagonists and mycoparasites. En: Wicklow DT & Soderstrom B, editores. The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships. New York: Springer Verlag, 1997. pp. 165-192.
 17. Elías RO, Arcos O, Arbelaez G. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Agron Colomb. 1993; 10:52-61.
 18. Bale J, Van Lenteren JC, Bigler F. Biological control and sustainable food production. Phil Trans R Soc B. 2008; 363:761-76.
 19. Garrett S. Ecological groups of soil fungi: a survey of substrate relationship. New Phytologist. 1951; 50:149-66.
 20. Barnett IL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect fungi. 4th ed. New York: Macmillan Publishing Company; 1987.
 21. Domsch K, Gams W, Traute Heidi A. Compendium of soil fungi. New York: Academic Press; 1980.
 22. French E, Teddy R, Herbert T. Métodos de investigación fitopatológica y aislamiento de fitopatógenos. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, San José, Costa Rica. 1980.
 23. Sneh B, Burpee L, Ogoshi A. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society. St Paul, USA: APS Press; 1991.
 24. Dennis C, Webster J. Antagonistic Properties of species-groups of *Trichoderma*. I: Production of non-volatile antibiotics. Trans Brit Mycol Soc. 1971; 57:25-39.
 25. Hoyos-Carvajal L, Chaparro P, Abramsky M, Chet I, Orduz S. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agron Col. 2008; 26:451-8.
 26. Cruz-Alcalá AC, Mendoza-Zamora C, Romero-Cova S. Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el sureste del estado de México. Rev Chapingo. 2000; 6:25-32.
 27. Stefanova M, Leiva L, Larrinaga L, Courrone MF. Metabolic activity of *Trichoderma* spp. isolates for control of soilborne phytopathogenic fungi. Rev Fac Agro. 1999; 16:509-16.
 28. Villegas-Estrada B, Castaño-Zapata J. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora cactorum*, causante de la pudrición de la corona y raíz de manzano en Caldas. Fitotec. 1999; 32:23-4.
 29. Cherif M, Benhamou N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathol. 1990; 80:1406-14.
 30. Hadar Y, Chet I, Henis Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathol. 1979; 69:64-8.
 31. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero RD, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ariza-Flores R. Actividad micoparasítica *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *F. subglutinans*. Rev Mex Fitopatol. 2005; 23:253-61.
 32. Arzate-Vega J, Michel-Aceves AC, Domínguez-Márquez VM, Santos-Eméstica OA. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoca negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. Rev Mex Fitopatol. 2006; 24:98-104.
 33. Benhamou N, Chet I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathol. 1993; 83:1062-71.
 34. Fernández R, Suárez C. 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. Rev Fac Nal Agr Medellín. 2009; 62:4743-82.
 35. Benítez T, Rincon A, Limon MC, Codon A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int Microbiol. 2004; 7:249-60.
 36. Howell CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolutions of current concepts. Plant Dis. 2003; 87:4-10.
 37. Durán E, Robles F, Martínez J, Brito M. *Trichoderma*. Un hongo combatiente de patógenos. Rev Téc Amb Teor Amb. 2003; 42:23-6.
 38. Michel-Aceves AC, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "Escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Rev Mex Fitopatol. 2000; 19:154-60.
 39. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero RD, Ariza-Flores R, Barrios-Ayala A, Rebolledo-Martínez A. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Rev AIA. 2008; 12:43-54.
 40. Zago L. Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* sp. no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro. Tese de doutorado. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. 2006.
 41. Suárez CL, Fernández RJ, Valero NO, Gomez RM, Paez AR. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev Biotecnol. 2008; 10:35-43.
 42. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2004; 2:43-56.