



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE
CIENCIAS EXPERIMENTALES
INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA

**“Evaluación del uso de un aislado fúngico micopatógeno
aplicado en sustrato en plántulas de melón”**

Alumno: Juan José Martínez Moya

Almería, noviembre 2013

Directores: Dr. Dña. Milagrosa Santos Hernández

Dr. Dn. Fernando José Diánez Martínez

Índice

1. Interés y objetivos
1.1. Importancia de los biofertilizantes en la agricultura
1.2 Objetivos de la investigación
2. Revisión bibliográfica
2.1. El cultivo del melón (<i>Cucumis melo</i> L.)
2.1.1. Mercado del melón
2.1.2. Calidad
2.1.2.1. Métodos para determinar la calidad
2.1.2.2. Principales parámetros de calidad
2.1.2.3. Evolución de los parámetros de calidad interna con el estado de maduración
2.1.2.4. Causas de la pérdida de calidad o desvalorización del melón
2.1.2.5. Pos-recolección en melón
2.2 El uso de biofertilizantes en la agricultura
2.2.2.1 Fijadores de nitrógeno
2.2.2 Hongos micorrícicos
2.2.3 Promotores del crecimiento vegetal
2.2.3.1 Bacterias
2.2.3.2 Hongos
2.2.3.2.1 Género <i>Trichoderma</i>
2.2.3.2.1.1- Características ecológicas de <i>Trichoderma</i> .
2.3. <i>Trichoderma</i> como biofertilizante
2.3.1. Características de <i>Trichoderma aggressivum</i>
3. Materiales y métodos.

3.1. Introducción.

3.2. Multiplicación y preparación de inóculo.

3.2.1. Preparación del medio de cultivo para la cepa *Trichoderma aggressivum*

3.2.2. Preparación de disoluciones y cuantificación de esporas

3.3. Inoculación en semillero.

3.4. Evaluación del estado y calidad de las plántulas.

3.4.1. Metodología empleada en la realización de las medidas.

3.4.2. Análisis estadístico de los datos obtenidos

4. Resultados y discusión.

4.1. Introducción

4.2. Medidas de cada uno de los parámetros estudiados.

4.2.1. Longitud.

4.2.2. Número de hojas

4.2.3. Calibre

4.2.4. Peso seco raíz

4.2.5. Peso seco parte aérea

4.2.6. Peso seco tallo

4.2.7. Peso seco hoja

4.2.8. Peso seco total

4.2.9. Área foliar

4.2.10. Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt

4.2.11. Índice tallo raíz (ITR)

4.2.12. Índice de calidad de Dickson (QI)

4.2.13. Área foliar específica (AFE)

4.2.14. Cociente de área foliar (CAF)

4.2.15. Índice de calidad hortícola al pre-trasplante

4.3 Comparación de *Trichoderma aggressivum* en sustrato con *Trichoderma aggressivum* aplicación foliar.

5. Conclusiones

Índice de tablas

Tabla.1 Principales países productores de melón (<http://www.made-in-argentina.com>, 2013)

Tabla 2: Resumen histórico taxonómico del género *Trichoderma spp.*

Tabla 3: Productos basados en *Trichoderma* registrados y comercializados como agentes de control biológico.

Tabla 4: *Trichoderma* registrados y comercializados como agentes de control biológico según MAGRAMA.

Tabla 5: Resultados obtenidos. Valores de cada parámetro con sus tratamientos.

Tabla 6: Resultados obtenidos por Francisca Rodríguez Salmerón.

Índice de figuras

Figura 1: Conidios y conidióforos de *Trichoderma sp.* (400x)

Figura 2: Detalle de cómo afecta la *Trichoderma* al casco del champiñón

Figura 3: Detalle del corte del Champiñón

Figura 4: Detalle al microscopio de <i>T. aggressivum</i>
Figura 5: Cuadro de los diferentes tratamientos
Figura 6: Preparación inoculo en semillero
Figura 7: Despiece previamente de las plantas de melón
Figura 8: Medida del calibre de las plantas de melón
Figura 9: Preparando las plantas para medición del área foliar
Figura 10: Preparando raíz para secado
Figura 11: Pesando la raíz
Figura 12: Longitud media del tallo de las plantas de melón (cm), inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).
Figura 13: Número medio de hojas de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).
Figura 14: Calibre medio del tallo de las plantas de melón (mm), inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (ANOVA, LSD 95%).
Figura 15: Peso seco medio total de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).
Figura 16: Peso seco medio de la parte aérea de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).
Figura 17: Peso seco medio de los tallos de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).
Figura 18: Peso seco medio de las hojas de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de <i>Trichoderma spp.</i> Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).
Figura 19: Peso seco total de las plantas de melón (mm), inoculadas con las distintas

cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (ANOVA, LSD 95%).

Figura 20: Área foliar media de las plantas de melón (cm²), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Figura 21: Índice de esbeltez (IE) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Figura 22: Índice de tallo raíz (ITR) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Figura 23: Índice de calidad de Dickson (QI) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Figura 24: Área foliar específica (AFE) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Figura 25: Cociente de área foliar (CAF) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (ANOVA LSD 95%).

Figura 26: Índice propuesto en el trabajo (IHP); Índice de calidad hortícola al pre-trasplante de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

1. Interés y objetivos

1.1 Importancia de los biofertilizantes en la agricultura

En la agricultura tradicional, se alternaban las líneas de cultivo en el suelo, o bien se dejaba descansar la tierra durante un tiempo. Actualmente, en la agricultura intensiva, el suelo apenas está sin cultivo, y se planta siempre en la misma línea de terreno, por lo que se degrada el suelo rápidamente.

Por todas estas razones, se está empleado lo que se denomina “Biofertilización”, que consiste en aumentar el número de microorganismos de un suelo, de esta forma, acelerar todos los procesos microbianos, aumentar la cantidad de nutrientes asimilables por la planta, etc.

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizosfera de la planta (Rodríguez, 1990).

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos *Fusarium* y otros (González et ál, 2002).

Este hongo actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y micoparasitismo, además de producir sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Stefanova 1996).

Este proyecto de investigación se ha centrado en un hongo beneficioso para el suelo y para la planta, y se engloba dentro del género *Trichoderma*.

1.2 Objetivos de la investigación

1. Evaluación de la capacidad bioestimulante de *Trichoderma aggressivum* aplicado en sustrato en comparación con un producto comercial basado en otras especies del mismo género, sobre plántulas de melón en semillero.

2. Evaluación de la calidad de la plántula obtenida mediante el cálculo de diferentes índices.

2. Revisión bibliográfica

2.1. El cultivo del melón (*Cucumis melo* L.)

Dados los objetivos de este trabajo, se exponen a continuación algunos aspectos de interés sobre el cultivo del melón, como los principales países productores y la calidad que deben de tener los frutos.

2.1.1. Mercado del melón

Países Productores:

País	Producción
China	44%
España	34%
Irán	4%
Turquía	3,5%
E.E.U.U.	3%
Rumania	1%

Tabla 1. Principales países productores de melón (<http://www.made-in-argentina.com>, 2013)

2.1.2. Calidad

2.1.2.1. Métodos para determinar la calidad

La calidad que va a tener el fruto depende de diversos factores, y la valoración de la misma tiene como único objetivo satisfacer las necesidades del consumidor, motivo por el cual se lleva a cabo la evolución real de la calidad en el momento de consumo. Para analizar la calidad se han desarrollado distintos métodos:

1) Métodos subjetivos

Estos métodos de evaluación están basados en la opinión de los investigadores, ocasionalmente en el resultado de una reacción fisiológica de entrenamientos, experiencias individuales, influencias de las preferencias personales, poder de percepción, etc. Esta evaluación es subjetiva porque el individuo requiere de un proceso mental para dar su opinión de los valores cualitativos y cuantitativos de las características estudiadas. Estos métodos suelen involucrar los sentidos de la percepción, evaluando el sabor, el aroma, sabor, color, textura, tacto, olor.

2) Métodos objetivos

La evaluación de la calidad objetivamente está basada en la observación, que excluye las aptitudes del investigador. Son representativos del control de calidad actual porque el elemento humano es excluido. Se puede dividir en tres grupos generales (Wilbur, 1983).

- a) Métodos de medida físicos: mide los atributos tales como el tamaño, textura, color, consistencia de la pulpa...
- b) Métodos de medida química: los métodos de análisis utilizados son la de evaluación cuantitativa de los valores nutritivos y niveles de calidad, pH, acidez.
- c) Métodos de microscopio: son de excelente aplicación a los programas de control de calidad y se dividen en dos categorías

- Test de contaminación, indicados para detectar la presencia de bacterias, hongos o materias extrañas.
- Diferenciación del tipo de células, tejidos y microorganismos de frutos y hortalizas.

2.1.2.2. Principales parámetros de calidad

Bajo el concepto de calidad, se engloban gran número de parámetros que en conjunto determinan que un fruto sea apto para el consumo se admiten como usuales los parámetros como sabor, aromas, color, calibre, firmeza, sólidos solubles, acidez, valor nutritivo, etc. (Casas et al., 1993).

Aroma y sabor

El aroma como característica más o menos subjetiva es un parámetro de calidad que está afectando tanto por las prácticas agrícolas, como por los tratamientos de pos-cosecha y el control genético. Las características del sabor dulce y la intensidad en el aroma del melón, están afectadas por todos los constituyentes cuantificables individualmente del melón. Existe unanimidad entre los diferentes autores en señalar que la salinidad provoca un aumento del contenido en sólidos solubles, considerados estos como índice de la dulzura del fruto (Costa *et al.*, 1997).

El fruto se debe recolectar cuando alcanza el mayor contenido en azúcares, dentro de la madurez fisiológica, pues una vez cortados, estos prácticamente no aumentan. Si la recolección se lleva a efecto demasiado pronto, quedará falto de aroma y sabor (Giambanco, 1997).

Color

El color es un factor importante para valorar la calidad, ya que frecuentemente está ligado a la maduración, presencia de impurezas, realización apropiada o defectuosa de un tratamiento tecnológico, malas condiciones de almacenamiento, comienzo de una alteración por microorganismos, etc. Por eso, se basan en el color varios métodos oficiales para valorar la calidad.

Los alimentos presentan una coloración porque los pigmentos que contienen absorben la luz de unas determinadas longitudes de onda y reflejan o transmiten la luz de otras. El color se ve afectado no solo por la concentración de pigmentos, sino también por la estructura física del alimento o por la forma en que se dispersa la luz desde la superficie.

Calibre

El calibre de cada fruto dependerá del peso en cuestión de cada melón.

Firmeza

El parámetro que mide la resistencia de penetración de los tejidos del fruto es la firmeza. Como consecuencia de la maduración, se produce la disminución de la firmeza

de los tejidos. La dureza de la pulpa se mide con el penetrómetro. Esta prueba determina la consistencia del fruto durante la fase de comercialización. Los valores comprendidos entre 0,5 y 1,5 kg·cm⁻² son los considerados idóneos para el transporte (Giambanco, 1997).

Sólidos Solubles

La composición en azúcares de los frutos de melón, a lo largo de su desarrollo y maduración, es un aspecto de gran interés en la determinación del punto de madurez de los frutos; de manera que, si los frutos son cortados prematuramente de las plantas como el contenido en sacarosa de los mismos procede de la descomposición y translocación de los hidratos de carbono de las hojas (principalmente almidón), proceso que se reduce muy tardíamente, las pulpas pueden no haber alcanzado un suficiente grado de dulzor y este proceso no se altera con el paso del tiempo y almacenamiento.

La determinación del punto de madurez, en contraposición de lo que ocurre con otras hortalizas, es bastante dificultosa, y el intervalo de recolección de un fruto, es bastante estrecho. Para el melón tipo Cantaloup el rango óptimo de sólidos solubles para la recolección oscila entre 12 y 14 ° Brix ya que por encima de 15 ° Brix la conservación es bastante corta (Maroto, 1997).

2.1.2.3. Evolución de los parámetros de calidad interna con el estado de maduración.

Para la formación y maduración de los frutos del melón deben transcurrir unos 40 días. Los primeros quince días tras la fecundación de las flores, son de crecimiento exponencial en peso, al término de los cuales el fruto ha alcanzado la mitad de su volumen total, y a partir de ese momento se inicia la pérdida de color de la pulpa por degradación de los carotenos. Desde ese instante, el crecimiento disminuye y cuando ha transcurrido un mes tras la fecundación, puede decirse que el fruto ha alcanzado prácticamente su tamaño definitivo, produciéndose la maduración durante los últimos 10 días, fase en la que se producen importantes cambios bioquímicos que conducen a un incremento notable del contenido en azúcares del fruto (Maroto, 1983).

Firmeza

La reducción de la firmeza en los frutos es una consecuencia de la actividad de la enzima poligacturonasa (PG) sobre las pectinas y paredes celulares, provocando cambios en las características de los tejidos que conducen al ablandamiento. Esta enzima aparece progresivamente en el proceso de maduración mientras que en los frutos verdes no aparece esta enzima.

Sólidos Solubles

En los primeros estadios de crecimiento de los frutos, el contenido en azúcares totales es escaso, y está formado principalmente por fructosa y glucosa. A medida que los frutos de melón van madurando, el contenido en azúcares se va incrementando hasta superar el 97% de los sólidos solubles, siendo la sacarosa el hidrato de carbono más importante con más del 50% del total de estos.

En estudios efectuados sobre melón “reticulado”, se ha visto que al principio de la formación de los frutos, la glucosa y la fructosa se forman gracias a la actividad de la enzima invertasa, pero con el paso del tiempo, y el desarrollo de la maduración de los frutos, la actividad de esta enzima va disminuyendo, mientras se va incrementando la operatividad de otra enzima, la sacarosa-fosfato-sintasa, encargada de formar sacarosa (Mc Collimet *al.*, 1998). Con menores disponibilidades de hidrogenocarbonatos de partida, pero en cualquier caso una supresión más o menos intensa del área foliar, podría influir de forma clara en la acumulación de azúcares, al ser precisamente en las hojas, donde se elabora el almidón, del que posteriormente se forman los oligosacáridos en el interior de los frutos. (Hubbard y Pharr, 1990).

El máximo incremento de azúcar en los frutos de melón, se desarrolla entre los días 28 y 42 tras la antesis, produciéndose ésta principalmente en forma de sacarosa.

Acidez valorable

La acidez valorable es un parámetro que varía con el estado de maduración del fruto (González, 1998).

pH

El pH del fruto, es un parámetro que tiende a ir aumentando con la maduración del fruto (González, 1998).

2.1.2.4. Causas de la pérdida de calidad o desvalorización del melón

Los melones deben tratarse con cuidado para evitar que aparezcan daños por golpes durante la pos-recolección. La presencia de frutos deformados es normalmente consecuencia de una mala polinización debida a condiciones climáticas desfavorables o a la falta de insectos polinizadores. También puede ser debido a tratamientos excesivos de hormonas, provocando un crecimiento exagerado del fruto. Existen numerosas causas por las que el melón puede perder calidad y como consecuencia se produce una desvalorización del producto. A continuación se enumeran las posibles causas:

Golpes

Los melones deben tratarse con cuidado, para evitar que aparezcan daños por golpes durante la pos-recolección. Los melones de tipo reticulado son más sensibles que los amarillos o los Honey Dew a los golpes. A su vez, los híbridos son más sensibles a este tipo de daño por su corteza más fina, que las variedades tradicionales (Namesny, 1999).

Deformaciones

La presencia de frutos deformados es normalmente consecuencia de una mala polinización, debida a condiciones climáticas desfavorables o a la falta de insectos polinizadores. Estas deformaciones también pueden ser debidas a tratamientos excesivos de hormonas. Es más frecuente en cultivo bajo plástico (Namesny, 1999).

Podredumbre apical

El fruto adquiere una coloración oscura, correosa y puede afectar a todo el fruto. Se minimiza aplicando recubrimientos al suelo que mantengan constante la humedad, aplicando fertilizantes con calcio y evitando los niveles altos de nitrógeno (Namesny, 1999).

Grietas de crecimiento

Se trata de grietas longitudinales que aparecen en los frutos. La causa de este desorden parece ligada a la nutrición y especialmente a la disponibilidad de agua en el suelo. Los riegos irregulares las favorecen y existen diferencias varietales de susceptibilidad a esta fisiopatía (Namesny, 1999).

Planchado

Consiste en manchas blancuzcas en la superficie de los frutos, causados por la incidencia directa de rayos solares y temperaturas altas. Es debida a los rayos ultravioleta, al igual que el pardeamiento del sistema vascular que se presenta en melón Cantaloup después de la recolección. Los más afectados son los tejidos o zonas normalmente a la sombra cuando se exponen accidentalmente al sol. La zona afectada deja de crecer, lo que produce una deformación del fruto (Namesny, 1999).

Amarilleo del melón

El amarilleo del melón, consiste en zonas de ese color que desvalorizan el aspecto exterior de los frutos. Es debida a la exposición directa al sol y existen diferencias varietales de susceptibilidad (Namesny, 1999).

Agrietado

Consiste en grietas, normalmente longitudinales. Se produce por variaciones marcadas ya sea en la humedad del suelo o del aire y existen diferencias varietales de susceptibilidad (Namesny, 1999).

Enrejado

Se manifiesta por una necrosis de los tejidos y su origen parece asociado a desequilibrios hídricos, al igual que la necrosis apical del tomate o de la lechuga (Namesny, 1999).

Sarampión

Los melones de piel lisa evidencian más esta alteración, conocida en literatura inglesa como “measles”, manchas pequeñas, pardas, se distribuyen sobre la superficie del fruto. La causa está en la elevada humedad del invernadero y bajo las hojas. En estas condiciones, grupos de células de la epidermis saturadas de agua se hinchan y estallan. Su posterior suberificación le da el aspecto de pústulas. En otras ocasiones, las manchas son debidas a pequeñas quemaduras por tratamientos sobre la piel delicada de los frutos jóvenes que al desarrollarse toman un aspecto rugoso y con más o menos relieve (Cantón et al., 1999).

Cicatriz estilar suberosa

Esta anomalía produce un desarrollo de corcho muy marcado de la cicatriz estilar. Su incidencia no es alta y cuando se manifiesta es principalmente en variedades andromonoicas y en los cultivos precoces, ya sea en invernadero o al aire libre. La favorecen condiciones climáticas desfavorables, como temperaturas bajas durante la floración y el cuajado. Existen diferencias varietales de susceptibilidad (Namesny., 1999).

Vitrescencia

En los frutos con vitrescencia partes de la carne adquieren un aspecto vítreo y esas zonas evolucionan ablandándose y desprendiendo olor alcohólico. Puede manifestarse ya en campo o desarrollarse en almacenamiento. Las causas no están claras, pero parece ligada al metabolismo de los hidratos de carbono. Parece favorecida por condiciones edafoclimáticas desfavorables y a déficit de calcio o déficit de potasio durante el desarrollo de los frutos. Existen diferencias varietales de susceptibilidad: los melones con carácter larga vida son resistentes a la enfermedad (Namesny., 1999).

Formación de sustancias alcohólicas

Los melones, como muchas plantas, producen alcoholes, un proceso asociado a la formación de sustancias volátiles en la madurez. En algunas variedades la cantidad de alcoholes producida puede afectar negativamente a la calidad. Las concentraciones altas

de estos compuestos se encuentran sólo en tejido más interno del fruto (Motomura., 1994).

Deficiencias nutricionales

Los melones Cantaloup afectados por deficiencia de nitrógeno son pequeños, de colores claros, de piel fina y con semillas pequeñas (Namesny., 1999)

Oxidación de la pulpa

La oxidación de la pulpa es una alteración que afecta a melones Cantaloup cultivados al aire libre en Almería, desconocida en Francia. Se atribuye a las altas temperaturas que debe soportar el cultivo (Namesny., 1999).

2.1.2.5. Post-recolección en melón

Condiciones óptimas de conservación

Temperatura óptima

La vida de almacenamiento es hasta de 21 días a 2,2 °C, pero la calidad sensorial puede reducirse. Generalmente, se pueden esperar de 12 a 15 días como vida pos-cosecha normal dentro del intervalo óptimo de temperatura. En ocasiones, durante el almacenamiento de corto plazo o el transporte, se aplican temperaturas inferiores, pero pueden dar lugar a daño por frío después de algunos días.

Humedad relativa óptima

Entre el 90-95%; la humedad relativa alta es esencial para maximizar la calidad pos-cosecha y prevenir la desecación. La pérdida de agua puede ser significativa a través de las áreas dañadas o maltratadas a través de la redcilla del fruto. Los periodos prolongados en humedades superiores al intervalo óptimo o la condensación puede estimular el crecimiento de mohos en la superficie o en la cicatriz del pedúnculo.

2.2 El uso de los biofertilizantes en la agricultura

El uso de biofertilizantes en la agricultura.

Un biofertilizante es una sustancia que contiene microorganismos vivos, los cuales, cuando se aplican a semillas, superficies de plantas o suelos, colonizan la rizosfera o el interior de la planta, y promueven el crecimiento al incrementar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped. Esta definición separa a los biofertilizantes de los fertilizantes orgánicos. Estos últimos contienen compuestos orgánicos, los cuales, sea directamente o por descomposición, incrementan la fertilidad del suelo. Asimismo, el término biofertilizante no debe ser usado de forma intercambiada con los términos abono verde, abono, intercultivo, o fertilizante químico con suplemento orgánico (Vessey, 2003).

Ciertos microorganismos del suelo pueden incrementar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, otros producen compuestos como vitaminas, hormonas y antibióticos que contribuyen a la salud vegetal y a la obtención de altos rendimientos. El hombre con el desarrollo tecnológico aplicó métodos microbiológicos para estudiar estos microorganismos y utilizarlos posteriormente, bajo el nombre genérico de biofertilizantes, en las prácticas agrícolas contemporáneas (Compagnoni, 1997; Guet, 1997). La importancia económica de los biofertilizantes ha crecido en los últimos años; factores del mercado y el creciente predominio de una cultura de la sustentabilidad en el desarrollo económico son los dos principales fenómenos que impulsan la producción y el consumo de biofertilizantes en el mundo (Martínez y Ramírez, 2000). La sostenibilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo efectivo de los recursos internos de los agro ecosistemas. En este sentido, los biofertilizantes constituyen un componente vital de los sistemas sostenibles, ya que son un medio económicamente atractivo y aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos (Mejía, 1995).

En general, se puede decir que el funcionamiento de un ecosistema edáfico depende en gran medida de la actividad microbiana del suelo, dado que los microorganismos protagonizan diversas acciones que producen beneficios para las plantas a las que se asocian (Kennedy y Smith, 1995; Barea, 1998; Bowen y Rovira, 1999). Entre otras acciones, los microorganismos beneficiosos facilitan la captación de nutrientes, producen fitohormonas que favorecen el enraizamiento, protegen a la planta frente a

patógenos, descomponen sustancias tóxicas y mejoran la estructura del suelo (Barea, 1998).

Entre los beneficios del uso de microorganismos en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Martínez, 2002).

Mayea (1995) señala que los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un triple papel como suministradores de nutrientes, fitohormonas y antagonistas de hongos fitopatógenos.

Entre los principales microorganismos presentes en el suelo capaces de lograr este efecto se encuentran el hongo antagonista *Trichoderma harzianum*, del cual se ha comprobado su efecto como estimulador de crecimiento en múltiples cultivos y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Parets, 2002; Fernández, 1999).

Los microorganismos con efectos benéficos sobre las plantas tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes de biocontrol. Pueden distinguirse tres grandes grupos (Kloepper *et al.*, 1989):

- 1) fijadores de nitrógeno
- 2) hongos micorrízicos
- 3) promotores del crecimiento vegetal, entre los que encontramos bacterias y hongo

2.2.1 Fijadores de nitrógeno

Existen algunas especies de microorganismos que poseen la habilidad de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+) mediante la acción de la enzima nitrogenasa. Estas especies son denominados diazótrofos y requieren de energía para realizar su metabolismo. Dentro de los diazótrofos capaces de realizar este proceso se encuentran los denominados fijadores de vida libre, los cuales fijan N_2 atmosférico sin la cooperación de otras formas vivas, siendo la familia *Azotobacteriaceae* la que agrupa uno de los géneros más importantes utilizados en la biofertilización a diferentes cultivos. El género *Azotobacter* es uno de los microorganismos utilizados como

biofertilizantes. Sus propiedades beneficiosas se ponen de manifiesto en una gran variedad de hortalizas, granos y viandas (Mayea *et al.*, 1998). Bhattacharya y Chaudhuri(1993) afirman que es capaz de fijar de 20 a 30 kg de N/ha año, pero tanto en *Azotobacter* como *Azospirillum* en determinadas condiciones su efecto beneficioso no se debe solamente a la cantidad de N₂ atmosférico fijado, sino a la capacidad de producir vitaminas y sustancias estimuladoras del crecimiento (ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas) que influyen directamente en el desarrollo vegetal (Rodelas, 2001).

Otro grupo de microorganismos que se convierten en fijadores de N₂ cuando viven en asociaciones simbióticas con organismos superiores de vida son las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, las cuales establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas (Bauer, 2001).

Entre los diferentes sistemas biológicos capaces de fijar N₂ atmosférico, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa constituye con la mayor cantidad aportada al ecosistema y a la producción de alimentos. Se estima que esta puede oscilar entre 200 y 250 kg N/ ha año (FAO, 1995), calculándose que puede alcanzar el 20% de la cantidad fijada anualmente sobre el planeta, constituyendo la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y microorganismos (Burdman *et al.*, 1998).

2.2.2 Hongos micorrícicos

Dentro de este grupo de microorganismos beneficiosos, se encuentran los hongos formadores de micorrizas. Las micorrizas son asociaciones mutualistas que se establecen entre ciertos hongos del suelo y la mayoría de las plantas terrestres. Las micorrizas se encuentran prácticamente en todos los hábitats de la tierra, desde ecosistemas acuáticos a desiertos, en bosques tropicales, en diferentes altitudes y latitudes (Allen, 1991).

En la naturaleza, el 95% de las plantas poseen hongos micorrícicos (Trappe, 1977).

Se reconoce de los hongos micorrícicos su capacidad para mejorar la estructura del suelo gracias al crecimiento del micelio y la secreción de glomalinas (Faggioliet *al.*, 2008). Asimismo, actúan como una prolongación del sistema radicular (Peterson *et al.*, 2004), facilitando la adquisición de agua y nutrientes de baja movilidad como potasio (K), zinc (Zn) y especialmente fósforo (P). Al incrementar el flujo de P a la raíz, de

manera indirecta se mejoran otros procesos fisiológicos en que participa este nutriente. Por su menor diámetro, las micorrizas tienen mayor superficie de absorción que las raíces del vegetal. Si bien utilizan P bajo las mismas formas que las plantas, tienen mayor afinidad por P y una concentración crítica en solución más baja para lograr su absorción (García *et al.*, 2006).

La proliferación e importancia agronómica de las micorrizas es más relevante en suelos deficientes de P (Covasevic *et al.*, 1995). Ante situaciones de carencia, contribuyen con la síntesis de proteínas de estrés en planta. El estrés conduce a la expresión diferencial de la información genética, produciendo cambios en la síntesis de nuevas proteínas, llamadas micorrizinas, las cuales posiblemente dotan a las plantas de la capacidad de adaptación al estrés. La respuesta agronómica en rendimiento podría estar asociada a suelos con baja disponibilidad de P, pero no se ha visto afectada por la dosis de fertilizante agregado (Ferraris y Couretot, 2008).

Los hongos micorrícicos necesitan oxígeno para vivir, por ello las poblaciones son muy bajas en suelos de drenaje pobre y anegables. También en suelos salinos y/o sódicos (Abbot y Robson, 1991). En cambio un suelo poroso y bien estructurado las favorece. Cultivos de cobertura aumentan mucho la micorrización, lo mismo que la siembra de maíz y sorgo, que tienen alta dependencia micorrícica e incrementan su población (Faggioli *et al.*, 2008). Las labranzas rompen el entramado de micelios del hongo, destruyendo el efecto benéfico sobre la estructura del suelo (Schalamuk *et al.*, 2006). Dosis medias de fertilizante no afectan a las micorrizas, al igual que insecticidas y herbicidas, a dosis normales (Coyne, 1999).

Existe una gran diversidad en cuanto a morfología y fisiología de las asociaciones micorrícicas, lo que permite reconocer varios tipos de micorrizas diferentes. Las micorrizas que forman la mayoría de plantas de interés agrícola son las endomicorrizas, en las cuales el hongo coloniza de forma intracelular la raíz, y dentro de éstas, las micorrizas arbusculares (MA), que se caracterizan porque el hongo presenta, dentro de la raíz, hifas intercelulares, arbuscúlos (hifas intracelulares muy ramificadas, formadas por divisiones dicotómicas sucesivas) y vesículas intra o intercelulares. De todos los tipos de micorrizas, las MA son las más extendidas en la naturaleza, formando esta asociación plantas pertenecientes al 80-90% de las familias botánicas (Honrubia *et al.*, 1992). Los hongos formadores de MA, son simbiontes biotrofos obligados puesto que

sólo pueden completar su ciclo de vida cuando colonizan las raíces de la planta hospedadora.

La introducción de hongos micorrícicos arbusculares en los suelos de cultivo agrícolas, y también forestales, mejora el crecimiento y la tolerancia de las plantas frente a problemas de salinidad y sequía (Morte *et al.*, 2000; Morte *et al.* 2001; Dell'Amico *et al.* 2002).

El desarrollo óptimo del cultivo del melón demanda una elevada aplicación de fertilizantes minerales y pesticidas. El uso de dichos insumos químicos implica no solo un costo y requerimiento energético elevados, sino que su aporte indiscriminado pudiera provocar problemas de salinización y contaminación del manto freático. El desarrollo vegetal puede incrementarse con la utilización de elementos biológicos que actúan de forma coordinada en la interfase suelo-raíz, entre estos y como factores imprescindibles se encuentran los hongos formadores de micorrizas-arbusculares (Barea *et al.*; 1991 y Fernández, 1999).

En el marco de una agricultura sostenible, la utilización de hongos formadores de micorrizas-arbusculares (MA) debe ser considerada en el diseño de cualquier sistema de producción agrícola, pues además de ser estos microsimbiontes, componentes inseparables de los agro ecosistemas, realizan diversas funciones en su asociación con las plantas, pues pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales (Thompson, 1991).

La utilización de las micorrizas arbusculares (MA) no implica que se pueda dejar de fertilizar, sino que la fertilización se hace más eficiente y se puede ahorrar cantidades importantes de fertilizantes minerales al tiempo que se logra una mayor absorción de los nutrientes disponibles en el suelo por parte de las plantas (Tejeda,1998).

Se sabe desde hace tiempo que una correcta selección y aplicación de hongos micorrícicos, considerados como fertilizantes biológicos o biofertilizantes, mejora la nutrición vegetal (Smith y Read, 1997; Allen, 1992; Harley y Smith, 1983; Morte y Honrubia, 2002), incrementa la resistencia de las plantas y, sobre todo, su capacidad de recuperación frente a situaciones de estrés abiótico (Augé, 2001; Morte *et al.*, 2001) y biótico, al aumentar la resistencia de las plantas frente a patógenos (Linderman, 2000; Borowicz, 2001).

En los invernaderos de Almería se hacen cultivos ecológicos desde 1994, incrementando cada año el número de agricultores implicados y la superficie en producción (unas 170 ha hortícolas en invernadero en el año 2006). Actualmente no existen en el mercado variedades ecológicas adaptadas al cultivo bajo abrigo. Por ello en los cultivos ecológicos se utilizan las mismas variedades híbridas que en los convencionales, pero sin tratamientos químicos. Estas variedades son muy productivas y por tanto muy exigentes en nutrientes, especialmente en la época de desarrollo y maduración de los frutos. (González-Vizcaíno *et al.*, 2007).

Por otra parte, el Reglamento CE2092/91 sobre Agricultura Ecológica marca una limitación de 170 unidades fertilizantes de nitrógeno por hectárea y año. Por tanto, es obvia la necesidad de alternativas, conforme a la normativa asociada a este tipo de agricultura, que siendo respetuosas con el medio ambiente, optimicen el aprovechamiento de los nutrientes disponibles por parte de la planta y mejoren la tolerancia de éstas frente a estreses. (González-Vizcaíno *et al.*, 2007)

Una de las estrategias agrícolas que permitirían una productividad sostenible con bajo coste ecológico y económico es la aplicación y manejo de microorganismos beneficiosos que estimulen el crecimiento vegetal. A este respecto la investigación relativa al posible papel de las micorrizas arbusculares en los sistemas agrícolas tiene especial interés, ya que se ha descrito su influencia positiva sobre el vigor y el estado sanitario de las plantas en especies vegetales muy diversas (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Jeffries *et al.*, 2003; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Sin embargo, hasta ahora la aplicación de hongos micorrícicos en los sistemas agrícolas de producción ha sido limitada, probablemente debido a dos problemas fundamentales (Harrier y Watson, 2003):

- 1) Las condiciones de cultivo empleadas en las prácticas de agricultura intensiva no favorecen el desarrollo de la simbiosis, principalmente por el abuso de fertilizantes de síntesis.

- 2) No existen suficientes estudios dirigidos a adecuar las condiciones de cultivo y compatibilizarlas con aquellas favorables para el establecimiento de los hongos micorrícicos y desarrollo de las micorrizas.

La agricultura ecológica, en cuanto conlleva un menor uso de fertilizantes y pesticidas, y promueve prácticas menos agresivas de laboreo, constituye un marco más favorable para el desarrollo de la simbiosis micorrícica y por tanto, favorece la expresión del potencial de los hongos formadores de micorrizas como biofertilizantes (Harrier y Watson, 2003).

2.2.3 Promotores del crecimiento vegetal

Dentro de los promotores del crecimiento vegetal podemos diferenciar dos grandes grupos, como son los hongos y las bacterias.

2.2.3.1 Bacterias

Las bacterias PGPR o Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal comenzaron a ser aisladas, clasificadas y estudiadas hacia fines del siglo XIX. Durante el siglo XX se profundizaron los conocimientos sobre las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y genéticas de cada uno de estos grupos bacterianos. Es a partir de fines del siglo pasado y principios del actual siglo XXI, cuando comenzaron a evaluarse estos microorganismos bajo condiciones extensivas de campo con el propósito de estudiar sus efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos (González, 2009).

Los microorganismos descubiertos y estudiados son numerosos y se sabe que quedan muchos por aislar e investigar. No obstante, hoy se disponen de grupos bacterianos que son capaces de proporcionar impactos productivos interesantes en cultivos como el Maíz. Uno de éstos es el de *Pseudomona ssp.*, y particularmente, un pequeño grupo de cepas denominadas *Pseudomonas fluorescens*. Estas últimas han demostrado a través de numerosos experimentos que son capaces de (González, 2009):

Incrementar la capacidad de solubilizar el fósforo del suelo no disponible para las plantas. Ello se logra a través de la producción de importantes cantidades de fosfatasas y ácidos orgánicos, desde las fracciones orgánica e inorgánica del suelo, como así también, de aquel que es aportado por los fertilizantes fosforados.

Incrementar la producción de fitohormonas que mejoran la plasticidad de la pared celular, promueven la elongación de las células radiculares y fundamentalmente dilatan la senescencia del sistema radical. De esta manera se mantienen las raíces activas por más tiempo de manera que aumentan la captación de agua y nutrientes.

Todas estas propiedades bacterianas son esenciales a la hora de emplear un microorganismo por sus efectos benéficos sobre los cultivos de Maíz. Pero, al mismo tiempo, es fundamental sumar a estas excelentes características todos los avances tecnológicos que nos aseguran su implementación bajo condiciones extensivas de campo (González, 2009).

Las bacterias benéficas de vida libre son usualmente denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (Kumar *et al.*, 2006). Las PGPR participan en diversos procesos del ecosistema, que incluyen el reciclaje y solubilización de nutrientes, establecimiento de plántulas, fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, control de patógenos de plantas, además de ser utilizados para propósitos forestales (Weller y Thomashow, 1993; Glick, 1995; Rodríguez y Fraga, 1999; Elo *et al.*, 2000; Vessey, 2003; Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Las PGPR son componentes importantes en el agroecosistema porque no solo contribuyen en la disponibilidad de nutrientes que promueven el crecimiento vegetal, sino también en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía (Gobat *et al.*, 2004). Además, favorecen la tasa de germinación, el crecimiento de las raíces, incrementa el contenido de proteínas, aumenta la tolerancia vegetal a factores que originan estrés y también funcionan como agentes de biocontrol (Glick, 2004; Bashan y de-Bashan, 2005).

2.2.3.2 Hongos

En este trabajo se ha evaluado la capacidad bioestimulante de *Trichoderma aggressivum* por ello para conocer más sobre las características del género *Trichoderma*, éste se describe en el siguiente apartado.

2.2.3.2.1 Género *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* forman parte de un grupo complejo de hongos filamentosos clasificados como Ascomicetos pertenecientes al orden Hipocreales. Se reproducen clonalmente mediante un ciclo de vida asexual en el que se alternan micelio

y esporas o conidios. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Los conidios poseen un sólo núcleo haploide, son ovoides, de color verde (excepcionalmente hialinos) y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fiálides (Rosen *et al.*, 1974). En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación se producen otro tipo de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas (Lewis y Papavizas, 1984).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova *et al.*, 1999.)

No obstante, las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30oC).

Debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Díaz, 1994).

A un número creciente de especies de *Trichoderma* se les ha relacionado con una fase sexual o teleomorfo representada por especies del género *Hypocrea*, como por ejemplo a *Trichoderma reesei* con *Hypocrea jecorina*, demostrándose que *Trichoderma* puede representar a un grupo de derivados clónales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de realizar ciclo sexual (Kuhls *et al.*, 1996).

Las colonias de *Trichoderma* presentan crecimiento rápido, que va formando una colonia delgada sobre la superficie del agar, debido a la conidiación que presenta a través de su desarrollo. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan penachos blancos o algodonosos de micelio blanco conformando una red densa responsable del pigmento característico (Barnett y Hunter, 1982). Las especies del género *Trichoderma* presentan conidióforos complejos y altamente ramificados en forma piramidal o cónica dando origen a esterigmas, con extremos ahusados. Al microscopio las fiálides se observan más estrechas en la base que la parte superior, permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de estas (Barnett y Hunter, 1982).

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la

identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai M., 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Harman, 2003). Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio.

Trichoderma sp., es un habitante natural del suelo, caracterizado por un comportamiento saprófito o parásito, propiedades que benefician su actividad antagónica. Es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de materia orgánica en descomposición, también es aislado comúnmente a partir de raíces de varias plantas de madera y parasitando estructuras de diferentes hongos patógenos debido a la competencia por nutrientes y micoparasitismo (Camargo, 2005).

Las clasificaciones taxonómicas existentes se basan fundamentalmente en las características morfológicas de las especies, que a menudo no aportan la información suficiente para discernir unas de otras. Aunque existe un concepto general de morfología básica de *Trichoderma* (crecimiento rápido, esporulación abundante, conidios verdes y conidióforos mal definidos), éste no está establecido por completo, existiendo una intergradación con otros géneros hifomicetos. Rifai (1969), por ejemplo, dividió el género en nueve agregados de especies y Gams y Bissett(1998) definieron las secciones *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium* e *Hypocreanum*. Desde entonces y con la aplicación de diversas técnicas moleculares como cariotipos electroforéticos, análisis de isoenzimas, análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD), secuenciación de ADN (por ejemplo, de secuencias espaciadoras intergénicas del ADN ribosómico o ITS), junto con técnicas bioquímicas y fisiológicas, se han ido redefiniendo o confirmando tanto secciones completas como especies dentro del género (Lieckfeldt et al., 1998). Por ejemplo, la inclusión en el género *Trichoderma* de *Gliocladium virens*, uno de los hongos más citados en control biológico, ha sido aceptada sólo después de ser determinada mediante el análisis de secuencias de ITS (Rehner y Samuels, 1994).

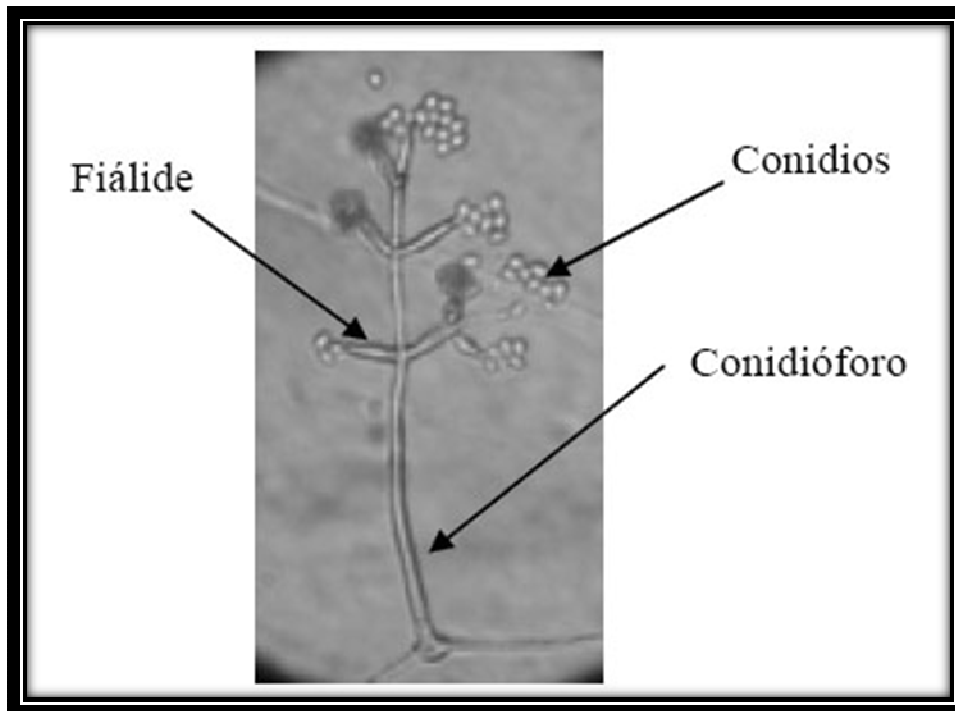


Figura 1: Conidios y conidióforos de *Trichoderma* sp. (400x) v.24 n.1 La Habana ene.-abr. 2009 Consultado: 30 julio 2013
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext

El género *Trichoderma* spp., fue introducido a la literatura en 1794 por Persoon para clasificar cuatro especies que actualmente se consideran no relacionadas entre sí, éstas son: *Trichoderma viride* (Pers.: S.F. Gray), *Xylohiaphanigresce* (Pers.), *Sporotrichumaureum* (Link), y *Trichoteciumroseum* (Pers.). La primera delimitación genética de *Trichoderma* spp., la realizó Hartz en 1871, quien enfatizó la importancia y las características microscópicas en la delimitación del género, especialmente por la presencia de fiálides (Bisset, 1991; Chen et al., 1999). En 1916 Waksman describió seis cepas de *Trichoderma* spp., de acuerdo a la apariencia macroscópica, el tamaño, y la forma de las fiálides. Diez años después, Abbott en 1926 al estudiar siete aislamientos de *Trichoderma* spp., concluyó que eran tres especies y fueron identificadas como *T. lignorum* (Harz), *T. koningii* (Qudem), y *Trichoderma glaucum* (Abbott). En 1969 Rifairrealizó una revisión del género y describió 9 especies de *Trichoderma* spp. (Bisby, 1939; Rifai, 1969; Bisset, 1992).

AUTOR	FECHA	COMENTARIOS
Persoon	1974	Introduce el género <i>Trichoderma spp.</i> , y describe a <i>T. harzianum</i> (Rifai), como sinónimo de <i>Pyreniumlignorum var. Vulgare Tode</i> (1790).
Fries	1829	Reduce la sinonimia de ambas especies a <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Harz	1871	Realiza la primera delimitación del género con base en observaciones microscópicas de las fiálides.
Tulasne	1860	Identifica a <i>Trichoderma spp.</i> , como <i>Fungi Imperfecti</i> .
Saccardo	1885	Crea el género <i>Pachybasium spp.</i> , para incluir a 13 especies de <i>Trichoderma spp.</i> , excluyendo a <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Vuillemin	1887	Transfiere <i>T. viride</i> a <i>Acrostalagmus viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Brefeld	1891	Menciona que <i>Hypocrea rufa</i> es sinónimo de <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oudemans y Koning	1902	Primera descripción de <i>Trichoderma spp.</i> , en el suelo. Qudemans identifica a <i>T. koningii</i> (Qudem).
Cook y Taubenhaus	1911	Reconocen diferencias entre <i>T. koningii</i> (Qudem.) y <i>T. viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Oale	1912-1914	Describe a <i>T. koningii</i> (Qudem.), <i>T. lignorum</i> (Harz), y <i>T. álbum</i> (Alb.).
Goddard	1913	Describe a <i>T. nigrovirens</i> (Goddard).

Waksman	1916	Reporta 5 cepas de <i>Trichoderma spp.</i> , en el suelo.
Abbott	1926	Describe 4 especies, incluyendo a <i>Trichoderma lignorum</i> (Lig.), <i>T. koningii</i> (Qudem) y <i>T. glaucum</i> (Abbott).
Gilman y Abbott	1927	Construyen una clave para identificar las especies de <i>Trichoderma spp.</i>
Beach	1937	Realiza el primer reporte de <i>Trichoderma spp.</i> , y los síntomas que provoca como enfermedad del champiñón.
Bisby	1939	Al estudiar numerosas colecciones y cepas identificadas como <i>Trichoderma spp.</i> , concluye que el género es monotípico (cuando un género se establece con una sola especie) y menciona que <i>Hypocrea gelatinosa</i> es en realidad <i>Trichoderma viride</i> (Pers.: S.F. Gray).
Rifai y Webster	1966	Demostraron que la nomenclatura de Bisby era errónea al examinar las diferencias entre <i>H. rufa</i> (Pers.), <i>H. aeuroviride</i> (Rifai), <i>H. vinosa</i> (Cooke), y otras especies de <i>Hypocrea spp.</i> , no mencionadas.
Rifai	1969	Hace una revisión del género <i>Trichoderma spp.</i> , ofrece una clave de identificación de 9 especies describiéndolas ampliamente. Actualmente es la clave más aceptada.
Bissett	1984-1992	Realiza una amplia descripción de <i>T. atroviride</i> (Bissett), sugiriendo que la descripción original realizada por Karsten (1892) debe ser modificada y ampliada de acuerdo a las nuevas técnicas disponibles (la microscopia electrónica y la genética molecular).
Doyle, Seaby, Chen, Castle y Hermosa.	1991-2000	Diferenciaron cuatro formas biológicas de <i>T. harzianum</i> (Rifai), Th1, Th2, Th3 y Th4.
Sobal M.	2004	Identifica a <i>T. aggressivum f. aggressivum</i> (Samuels&W. Gams), en la planta de Hongos México.

Tabla 2: Resumen histórico taxonómico del género *Trichoderma spp.* (Bisby, 1939; Rifai, 1969; Bissett, 1991; 1992; Fletcher, 1987; Doyle, 1991; Seaby, 1987; Castle et al., 1998; Chen et al., 1999; Sharma et al., 1999; Hermosa, 2000; Sobal, 2007).

2.2.3.2.1.1- Características ecológicas de *Trichoderma*.

Las características ecológicas de los hongos pertenecientes a este género los hacen especialmente adecuados para su aplicación como agentes de control biológico de enfermedades producidas por hongos. Las especies de *Trichoderma* son ubicuas, se hallan ampliamente distribuidas tanto geográficamente como en distintos tipos de suelo, siendo predominantes en hábitats donde abundan restos vegetales y madera en descomposición. Son hongos saprofitos, con la excepción de algunas especies que además son micoparásitas. Poseen una gran capacidad de colonización de distintos ambientes debido a que crecen muy rápidamente, tienen pocos requerimientos nutricionales y sobreviven en condiciones muy adversas (Papavizas, 1985).

Una de las características más interesantes de las cepas de *Trichoderma* es que tienen una capacidad metabólica muy diversa. Las especies de este género son capaces de transformar una amplia variedad de materia orgánica de origen natural y xenobiótico mediante la producción de gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan distintos tipos de polímeros, entre ellos polisacáridos como la celulosa, la quitina, la laminarina, la pectina, el almidón y el xilano. Esto lo convierte, como veremos más adelante, en un microorganismo de gran interés biotecnológico (Buchert *et al.*, 1998; Galante *et al.*, 1998) y medioambiental (Espósito y da Silva, 1998).

Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales se produce este efecto permanecen aún sin identificar. Uno de ellos podría ser la capacidad de *Trichoderma* desolubilizar metales, como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos así en nutrientes asimilables por las plantas (Altomare *et al.*, 1999). Otro efecto indirecto podría ser la eliminación de la rizosfera de patógenos de menor incidencia, como es el caso de *Pythium*, sin los cuales las plantas alcanzarían su máximo potencial de desarrollo (Harman *et al.*, 1989). Aún así, en experimentos de laboratorio en los que sólo están presentes *Trichoderma* y la planta a ensayar, también se produce el estímulo del crecimiento. Existen evidencias de que hay factores difusibles, aún no identificados, que intervienen en el desencadenamiento de la respuesta de la planta, dado que experimentos en los que los dos organismos, planta y hongo, se separan mediante una membrana de celofán dan resultados similares (Windham *et al.*, 1986). Una hipótesis más reciente propone que *Trichoderma* es capaz de limitar e incluso revertir el efecto del daño oxidativo en la raíz (Björkman *et al.*, 1998).

Producto comercial		Dosis
BIO 16-TRICOFAG	<i>Trichoderma harzianum</i>	Sust inertes o mezclas: 250 mL/m ³ Semilleros, plantas pequeñas: 250 mL/1000 m ² Frutales, vid, ornamentales: 5-10 mL/planta Cultivos establecidos en campo: 3-5 L/ha Césped y jardines: 2 L/ha
TRIANUM -P	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	Semillero: 1 g/m ² Campo: 3 g/m ²
TRIANUM-G	<i>Trichoderma harzianum</i> T-22	Sustrato (primera inoculación): 750 g/m ³ de sustrato
BIOPONIC MIX	<i>Trichoderma</i>	Solución nutritiva: 10 g/100 L
TRICHOTROPICO	<i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma koningii</i>	Control de enfermedades: 750-1000 g/ha reinoculacionesg/ha: 500-750
TRICHOAGRO W.P	<i>Trichoderma harzianum</i>	Semilla: 2 g/kg de semilla Semilleros: 1-2 g/L agua, y 30-60 días después En melón 15 días después de germinación
PRQTECTOR	<i>Trichoderma harzianum</i>	Semillero, almácigos y cultivos: 1-2 g/L de agua Flores: 0,5-0,8 g/m ²
AKTRIVATOR	<i>Trichoderma harzianum</i>	250 g/m ³ de sustrato 1 g/30 plantas
TRICODERMA MERISTEM	<i>Trichoderma harzianum</i>	Semillero 30 g/1000 plantas (cada 10 días) Trasplante 2% P/V campo: 3-5 Kg/ha (cada 20 días) Frutales: 5 g/árbol

		Semillas: 20 g/kg semillas
TRICHO-TEC	<i>Trichoderma harzianum</i>	Semillero :30 g/1000 plantas (o m2) Trasplante: 2% P/V inmersión de raíces 15-20 min. Campo: 3,5 Kg/ha en riego Frutales: 5 g/árbol Césped y jardinería: 2-4 kg/ha primavera
TRICHO-NOVA	<i>Trichoderma hamatum</i> y <i>Trichoderma koningii</i>	Semillero: 10-20 g/1000 pl en hojas verdaderas Fertirriego: 2-4 kg/ha en el ciclo. 150-200 g/ha
TRICHO-CAN	<i>Trichoderma hamatum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .	Semillero: 10-20 g/1000 pl Fertirriego: 2-4 kg/ha en el ciclo. 150-200 g/ha
TRIFENDER	<i>Trichoderma asperellum</i>	0,5-1,5 kg/ha, en 400 L/ha de agua
TRICHODERMA HARZIANUM	<i>Trichoderma harzianum</i> IAB/TH/01	Pone que consultar fabricante
TRIDERMA	<i>Trichoderma asperellum</i>	50 g/ha (es correcto el dato, 50) Semillero: 0,25 g/L 2-3 días antes de siembra Semilla: 50 g/ha
TRICHO PHIT	<i>Trichoderma Harzianum</i>	
BIOPACIFIC		1 g/planta 1 Kg/m2
TRIFESOL	<i>Trichoderma viride</i>	Arroz: 1 L- 1 kg/ha
TRICHOP		
TRICHO DRY	<i>Trichoderma atroviride</i>	Semillero: 1 kg/m3
TRICHO FLOW	<i>Trichoderma atroviride</i>	Semillero: 250 g/100 L agua

TRICHO SPRAY	<i>Trichoderma atroviride</i>	100 g/100 L de agua
VINEVAX	<i>Trichoderma harzianum</i>	
TRICHO BUILD		
TRICHOPEL	<i>Trichoderma harzianum</i>	Semillas pequeñas: 5-10 kg/ha Semillas grandes y bulbos: 10-25 kg/ha Semilleros: 1 kg/100 m ² Árboles y vid: 5-25 g/planta
SENTINEL	<i>Trichoderma atroviride</i>	200 g/ha
UNITE	<i>Trichoderma atroviride</i>	500 g/1000 L 750 g/ha
TENET	<i>Trichoderma atroviride</i> LC52	25-50 kg/ha
LETTUCEMATE	<i>Trichoderma hamatum</i>	2 Kg/m ³ de sustrato 1 g/L en el último riego antes de trasplante
PLANTMATE	<i>Trichoderma atroviride</i>	1-10 kg/ha,
ONIONMATE	<i>Trichoderma atrovir</i>	
NICODERMA	<i>Trichoderma Viride</i>	4 kg/ha mezclado con Mat. orgánica
NUTRI-LIFE SHIELD	TRICHO- <i>Trichoderma harzianum,</i> <i>Trichoderma lignorum</i> <i>and Trichoderma koningii</i>	Inmersión de plántulas: 5 g/L semillas: 5 g/Kg semillas Esquejes: 10 g/L (mantenerlos 15 min.)
DRH CI		Turba: 5-10 g/m ³ Plantas: 100 g/ha 5-20 g (25-100 millones de esporas/m ²)
TRI – D25	<i>Trichoderma koningii</i> y	Plántulas: 100gr of TRI-D25 per

	<i>Trichoderma harzianum</i>	400sqm
	<i>Trichoderma viride</i>	Cultivo: 1 jg/ha
SANJEEVANI	<i>Trichoderma harzianum</i>	
ECO - T	<i>Trichoderma harzianum</i> strain B77.	5-75 g/ha,
ECO - 77	<i>Trichoderma Viride</i>	0,5 g/L
TRICHODERMA VIRIDE		
TRICHOFLOW	<i>Trichoderma viride</i>	
TRIXHOPEL		
GMAX TRICON		2 kg/50 L agua 5 kg/100 kg mat orgánica
GMAX TRICON H	<i>Trichoderma harzianum</i>	2 kg/50 L agua 5 kg/100 kg mat orgánica
SARDAR ECO GREEN	<i>Trichoderma harzianum</i>	Semillas: 5-10 g/kg cultivos: 2,5 kg /ha
TRICHODERMA, ORGANIC FERTILIZER		
NIPROT	<i>Trichoderma viride</i> ó <i>Trichoderma harzianum</i>	Semilleros: 5 g/m ² /L de agua 1-2 kg en 100 kg de mat orgánica 15 días
BINAB T	<i>Trichoderma harzianum</i> (=viridae) y <i>Trichoderma polysporum</i>	Heridas de poda: 5-17 g/L Patógenos el suelo: 50-100 g/m ³ de suelo Hortalizas y ornamentales: 0,1-0,2 g/planta
PLANTSHIELD	<i>Trichoderma harzianum</i> T22	100 g/450 L
ROOTSHIELD	<i>Trichoderma harzianum</i> T22	
ROOTSHIELD	<i>Trichoderma harzianum</i> KRL-AG2	Suelo: 10-12 kg/ha Semillero: 5-25 g/m ³

AVANCED ROOTSHIELD	<i>Trichoderma harzianum</i>	Suelo: 20 mL/ha Foliar: 20-30 mL/ha Ornamentales y árboles: 15-50 g/planta
TRICHOMIC +	5 cepas	Semilleros: 500 mL/m ³ sustrato Hortícolas y árboles: 5-7 L/ha
BIOTRICH	<i>Trichoderma harzianum</i>	Hortícolas: 3-5 kg/ha Árboles: 4-7
MOO56	<i>Trichoderma harzianum</i>	Turba: 5 L/m ³ Plantas: 300 mL/1000 plantas
TRICHONATIVA	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Trichoderma virens</i> <i>Trichoderma parceanamosum</i>	100 mL/100 L de agua 1,5 L/ha
TRICHODERMUS	<i>Trichoderma harzianum</i>	1 g/L
TRICHODERMA SP	<i>Trichoderma sp</i>	1-2 L/ha
PHC T – 22	<i>Trichoderma harzianum T-22</i>	0,7-.5 kg /ha
PHC BIOPAK - F	<i>Trichoderma harzianum T-22</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Algas...</i>	2,5 g /L agua

Tabla 3: Productos basados en *Trichoderma* registrados y comercializados como agentes de control biológico. (Vademecum, 2013)

Según el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, las especies de *Trichoderma* registradas como productos fitosanitarios son (MARM, 2013):

Nombre comercial	Composición
Bioten	TRICHODERMA ASPERELLUM (CEPA ICC012) 2% (5 X 10 E7 UFC/G) + TRICHODERMA GAMSII

	(CEPA ICC080) 2% (5 X 10 E7 UFC/G) [WP] P/P
Tusal	TRICHODERMA HARZIANUM 0,5% (1X10E8 UFC/G) + TRICHODERMA VIRIDE 0,5% (1X10E8 UFC/G) [WG] P/P

Tabla 4: *Trichoderma* registrados y comercializados como agentes de control biológico según MAGRAMA.2013

- *Trichoderma asperellum* (cepa ICC 012) + *Trichoderma gamsii* (cepa ICC080), cuyo nombre comercial es Bioten y n° de registro 25234.
- *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viride*, cuyo nombre comercial es Tusal y n° de registro 24244.

2.3. *Trichoderma* como biofertilizante.

Se ha encontrado que algunas especies de *Trichoderma*, especialmente *T.harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas; esto parece deberse a la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes (Widham *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1986; Chet, 1987). El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2001).

Rara vez se ha asociado a *Trichoderma* con enfermedades de plantas, sino que, al contrario, se considera un organismo beneficioso para las mismas. La promoción del crecimiento vegetal por parte de *Trichoderma* es un fenómeno que se ha observado en varios tipos de cultivos (Harman *et al.*, 1989; Lindsey y Baker, 1967). Este fenómeno se manifiesta como una potenciación de la germinación de las semillas, una floración más abundante y temprana y aumentos de altura y peso de las plantas (Chang y Baker, 1986).

Las diferentes especies de *Trichoderma* se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas que ayuda a la colonización de diversos sustratos y del suelo. Así mismo pueden producir enzimas extracelulares, antibióticos antifúngicos, pueden ser competidores contra hongos patógenos, promover el crecimiento en plantas, e inducir resistencia (Zimand *et al.*, 1996). Además compiten muy bien por nutrientes, son micoparásitos muy activos y son competidoras muy eficientes de la rizosfera (Papavizas, 1985; Ahmad y Baker, 1987).

La habilidad para desarrollarse sobre amplios rangos de condiciones externas de pH es un importante componente del complejo conjunto de características que *Trichoderma* ,mejor adaptado a suelos ácidos, encuentra durante esta interacción con otros organismos (Benítez *et al.*, 2004).

Las cepas de *Trichoderma* están siempre asociadas con raíces de plantas y ecosistemas de raíces. Algunos autores han definido las cepas de *Trichoderma* como plantas simbiotes oportunistas, organismos virulentos, capaces de colonizar raíces de plantas por mecanismos similares a los de los hongos micorrizales y producir compuestos que estimulan el crecimiento como citoquininas, zeatinas y giberelinas (GA3) o relacionadas con GA3; así como promover mecanismos de defensa en plantas (Harman *et al.*, 2004).

La colonización implica la habilidad para adherirse y reconocer raíces, penetrar y resistir metabolitos tóxicos producidos en respuesta a la invasión de organismo extraños, sean o no patógenos (Benítez *et al.*, 2004). Así mismo *Trichoderma* frecuentemente incrementa el crecimiento de raíces y su desarrollo, productividad del cultivo, resistencia a estrés abiótico y la toma y uso de nutrientes (Arora y Elander, 1992).

El biocontrol de hongos del género *Trichoderma* ha desarrollado una habilidad asombrosa para interactuar tanto de forma parasítica como simbióticamente, con diferentes sustratos y organismos vivos, incluidas las plantas y otros microbios. Estos hongos pueden utilizar una variada fuente de nutrientes. Están entre los microbios más resistentes a las toxinas y productos químicos naturales o producidos por el hombre, y pueden degradar efectivamente algunas de ellas, incluidos hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y plaguicidas xenobióticos. Muchas cepas de *Trichoderma* son fuertes invasores oportunistas, de rápido crecimiento y productoras de antibióticos poderosos. Estas propiedades hacen a estos hongos muy exitosos ecológicamente, ya que las cepas se han encontrado en la agricultura, pradera nativa, bosque, ciénaga salada y suelos desérticos de todas las zonas climáticas, así como en agua de lago, material

vegetal muerto, raíces vivas de virtualmente cualquier especie de planta, semillas y aire. *Trichoderma* spp., se usa ampliamente en la agricultura y la industria. Esto es posible porque los propágulos de *Trichoderma* pueden producirse con bajo costo y en grandes cantidades, muy concentradas, en formulaciones líquida y sólida, y se conservan durante meses. En la actualidad se pueden encontrar más de cincuenta productos diferentes a base de *Trichoderma* registrados en muchos países diferentes de cinco continentes, y se venden y aplican para proteger y mejorar el rendimiento de vegetales, ornamentales y árboles frutales. Adicionalmente se han desarrollado métodos para modificar genéticamente estos hongos de una manera muy precisa, lo que permite el mejoramiento de su capacidad para segregar enzimas, matar patógenos de plantas o estimular el crecimiento de las plantas y la resistencia a enfermedades. Estos resultados están basados en la investigación sobre *Trichoderma* spp., llevada a cabo en los últimos veinte años, en que se han descubierto las bases molecular y genética de los mecanismos involucrados en muchos procesos biológicos útiles y beneficiosos (Lorito, 2006).

La abundancia de *Trichoderma* spp. en varios suelos, junto con su habilidad para degradar varios sustratos orgánicos, su versatilidad metabólica y su resistencia a inhibidores microbianos, sugiere que este hongo puede poseer la habilidad para sobrevivir en varios nichos ecológicos, dependiendo de las condiciones que prevalezcan y sobre las especies involucradas (Riegel y Nielsen, 1996).

2.3.1 *Trichoderma aggressivum*.

Las enfermedades más graves en el cultivo de hongos son las llamadas mohos verdes causadas por hongos del género *Trichoderma* (Mamon et al. 2000) dando lugar a enormes pérdidas de rendimiento en las plantaciones de setas.



Figura 2: Detalle de cómo afecta la al casco del champiñón



Figura 3: Detalle del corte del Champiñón *Trichoderma*

En Europa, la forma más agresiva es una cepa designada como Th2, *Trichoderma aggressivum f. europaeum*. Esta variedad es un biotipo de no-agresiva de la *T. harzianum* (Williams et al. 2003) pero difiere considerablemente de ella, principalmente por la velocidad de crecimiento del micelio (Samuels et al. 2002; Sobieralski et al. 2009).

La primera epidemia importante de moho verde apareció en Irlanda del Norte en 1985, que fue rápidamente seguido por los posteriores brotes en varios países. Los síntomas del moho verde aparecen como grandes manchas de estiércol convirtiendo rápidamente en verde. Los brotes epidémicos se deben a dos variedades de la especie *T. aggressivum*. Esta especie compite de manera eficiente por espacio y nutrientes, produce enzimas extracelulares, tóxicos metabolitos secundarios y compuestos orgánicos volátiles, que se traduce en pérdidas de cosechas drásticas. El hábitat natural de *T. aggressivum* es aún desconocido. Las posibles vías de infección son el aire, vehículos, ropa contaminada y los animales.

Las infecciones de los cultivos de hongos debido a los miembros del género *Trichoderma* han llegado a ser conocido como la "enfermedad del moho verde" (Sinden y Hauser. 1953).

En todo el mundo el cultivo de hongos está dominado por la producción de *Agaricus bisporus* (champiñón), que es seguido de *Lentinula edodes* (shiitake) y *Pleurotus ostreatus* (seta ostra) (Chang. 1999).

Históricamente, *Trichoderma viride* y *Trichoderma koningii* fueron descritas como causantes de las pérdidas en el cultivo de champiñones episódicamente (Sinden y Hauser. 1953). Sinden considera el género *Trichoderma* como las especies que compiten con el hongo o el indicador de compost de los pobres, asociando su presencia a situaciones con pH ácido o residuos de azúcares solubles. Hasta los años 80, el moho verde de setas fue considerado como el único problema, asociado principalmente con la baja calidad del compost o de la falta de higiene, lo que podría ser gestionado efectivamente mediante la modificación del proceso de compostaje, la mejora del saneamiento o la intervención química (Geels et al. 1988).

Este punto de vista básicamente cambió después de las epidemias de los primeros mohos verdes que aparecieron en las Islas Británicas durante 1985-1986 y a finales de 1990 y 1991 que causó pérdidas de alrededor de 3-4 millones (Fletcher. 1990).

También hubo graves pérdidas en los Países Bajos en 1994 (Geels y Rondetafel. 1997).

En la década de 1990, una enfermedad similar apareció en los cultivos de hongos en América del Norte (Alberta, Ontario, Columbia Británica, y Pensilvania), causando pérdidas de más de \$ 30 millones (Rinker. 1993; Spillmann. 2002).

En Francia, la enfermedad fue detectada en 1997 (Mamoun et al. 2000). En España, las primeras observaciones de las cepas de *Trichoderma*, mucho más agresiva que las conocidas previamente, fueron hechas por los criadores de plantas en La Rioja durante el invierno de 1996-1997 (García-Morras y Olivan. 1999; Hermosa et al. 1999).

Se observó posteriormente en recipientes de cultivo de la misma ciudad y al final de la campaña de la enfermedad se extendió a los pueblos vecinos. Durante la última década, la enfermedad *Trichoderma* moho verde de *A. bisporus* también apareció en Hungría (Hatvani. 2007), Croacia (Hatvani et al. Sin publicar), Polonia, México y Australia.

Aunque un número de *Trichoderma spp.* (Por ejemplo, *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. crassum*, *T. spirale* (Castle et al. 1998) han sido aislados de compost de champiñón, la colonización agresiva dando lugar a brotes epidémicos se atribuyeron inicialmente a solo *T. harzianum* (Doyle. 1991).

El compost de las Islas Británicas identificado como *T. harzianum* se han diferenciado en tres formas biológicas (Seaby. 1987). Biotipos Th1, Th2 y Th3 se encontró que difieren en sus tasas de crecimiento, los patrones de la esporulación y la agresividad en la colonización de compost, con Th2 es la forma agresiva responsables de las epidemias de moho verde, basado en experimentos de inoculación (Fletcher. 1990; Staunton. 1987).

El biotipo Th1 se encuentran comúnmente en los materiales de compost primarios, pero rara vez se encuentran en bolsas de compost pasteurizado (Seaby. 1987).

Crece rápidamente (1 mm / h) a 27 ° C y la esporulación se produce en dos días después de la exposición a la luz, creando una gran cantidad de micelio aéreo. Los tejidos esporulados adquieren color verde similar a la espinaca. La cosecha tiene olor a malta (Seaby. 1987). Th2 está presente predominantemente en el compost afectada, pero rara vez en el material de abono compuesto crudo (Morris y Doyle. 1995).

Crece rápidamente (1 mm / h) a 27 ° C, produciendo una algodonosa capa de micelio aéreo. La esporulación no ocurre hasta que al menos cuatro días y luego se presenta en la zona central en verde bandas concéntricas. Th3 se encuentra en las materias primas, pero rara vez en bolsas de afectados, bandejas o estantes, salvo en los casos donde el polvo de los ingredientes podría haber soplado sobre la composta pasteurizada (Seaby. 1996).

Crece a un ritmo de 0.5-1 mm / h. Las colonias tienen un aspecto radial y la cultura huele a coco. En este grupo inicial se confirmó posteriormente durante la investigación de 81 cepas de *Trichoderma* aisladas de hongos abono por una serie de técnicas moleculares, incluyendo polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), al azar amplificación de ADN polimórfico (RAPD) con seis cebadores y el análisis de secuencias del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) región (Clift y Shamshad. 2009).

La uniformidad genética se encontró en el caso de Th2 (Muthumeenakshi. 1994), que apoya la hipótesis de que el agente de moho verde es a través de las islas británicas que puede tener su origen en una única fuente, posiblemente en Irlanda del Norte (Morris et al. 1995), que se deriva de un mutante particularmente adecuado para el crecimiento de hongos sobre compost (Seaby. 1987). Sin embargo, la variación menor en el ADN mitocondrial (ADNmt) pueden distinguir las cepas de los irlandeses en Gran Bretaña (Seaby. 1994).

Esta variación genética puede ser debido a un gran número de eventos mutacionales después de la primera mutación que permitió la colonización inicial del compost. Las técnicas moleculares antes mencionadas fueron utilizadas más en adelante para la caracterización molecular de cepas de *Trichoderma* aislado de las granjas de hongos del Norte de América (Castle. 1985).

El grupo agresivo Th2 en las Islas Británicas se encontró que era diferente de la observada en América del Norte (grupo Th4). Las cepas del biotipo Th4 parecían ser genéticamente uniforme, lo que sugiere que las cepas TH4 pueden originarse a partir de una sola fuente. La diferencia en la secuencia ITS1 fue 5 pares de bases entre biotipos Th2 y TH4, y el análisis de secuencias ITS1 reveló que estos dos biotipos son

filogenéticamente muy relacionada con *T. harzianum* grupo de Th1 (Muthumeenakshi. 1998).

La tasa de crecimiento de la Th4 es de 0,8 mm / h, las colonias producción de micelio aéreo y con bordes ondulados. La esporulación se produce en las bandas. Basándose en estos resultados se llegó a la conclusión de que la enfermedad del moho verde no fue causado por una sola cepa, la creación de la hipótesis alternativa de formas agresivas surgió por lo menos de dos fuentes independientes (en las Islas Británicas y en Norteamérica) por él la adaptación de las poblaciones existentes a las condiciones ambientales de la producción de setas. Esta hipótesis explica las diferencias entre la América del Norte y los aislamientos irlandeses y británicos. Como *T. harzianum* es una especie de uso frecuente para el control biológico de hongos patógenos de plantas, han surgido preocupaciones con respecto a la posible participación de las cepas de control biológico en el desarrollo de moho verde de setas. Sin embargo, estudios moleculares filogenéticos basados en análisis RAPD así como el análisis de la secuencia de la región ITS1-5.8S ADNr-ITS2 la región reveló que, aunque aislados del molde de control biológico y verde están estrechamente relacionadas, podrían ser claramente distinguidos unos de otros (Royse. 2001; Hermosa. 2000), lo que sugiere que Th2 y Th4 han evolucionado de un ancestro común reciente tanto para el control biológico y verde biotipos relacionadas con el moho. El análisis filogenético del gen de la tubulina apoyaban los resultados, por otra parte, los ensayos de patogenicidad también indicó que comercial (Romaine. 1999) es de control biológico de *T. harzianum* cepas y los relacionados desde el biotipo Th1 no fueron patogénicos en *A. bisporus*, en contraste con TH4 aislados (Romaine. 2001; Rinker. 1998).

Basado en él diferencias moleculares entre los biotipos de tipo Th1-3, Muthumeenakshi et al. (Muthumeenakshi. 1994) que ya se ha sugerido que podría representar tres especies diferentes. Evidencias moleculares indican más adelante que el biotipo Th3 era en realidad *T. atroviride* (Castle. 1998; Ospina-Giraldo. 1998), mientras que Th1 fue reconocida como *T. harzianum* en sentido estricto. Estas dos especies se encontró que más del comunes las especies de *Trichoderma* en la industria de los hongos de Australia (Clift y Shamshad. 2009).

Más recientemente, los dos biotipos agresivos, Th2 y Th4 se reescribe sobre la base de características morfológicas y los análisis filogenéticos de ITS1 el factor de elongación de la traducción 1-alfa (TEF1) de genes como *T. aggressivum f. europaeum* y *T. aggressivum f. aggressivum*, respectivamente (Samuels et al. 2002).

T. aggressivum f. europaeum es responsable de los problemas de moho verde en Europa, mientras que *T. aggressivum f. aggressivum* se conoce como un patógeno de *A. bisporus* cultivado en Canadá, EE.UU. y México.

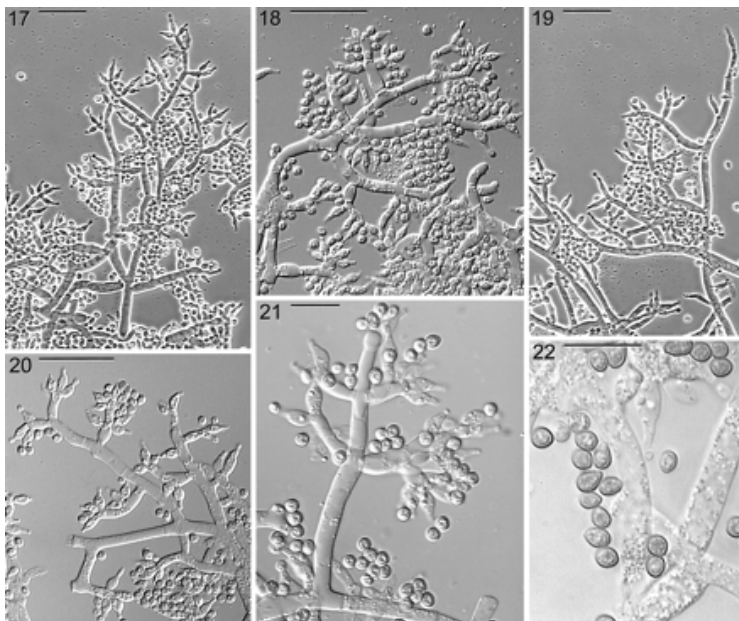


Figura 4: Detalle al microscopio de *T. aggressivum*

3. Materiales y métodos.

3.1. Introducción.

El trabajo se ha dividido en dos fases, en cuanto a instalaciones empleadas en la realización del mismo se refiere. Por un lado, una parte de laboratorio, para la cual se ha empleado el laboratorio de protección vegetal de la universidad de Almería, donde se han realizado todas las operaciones previas y posteriores al trabajo, como diseño de los tratamientos, preparación de disoluciones, toma de datos (pesos secos y frescos de las distintas partes de las plántulas, diámetro medio del tallo etc.). Por otro lado una parte de campo donde se han empleado las instalaciones de un semillero comercial de la provincia de Almería, concretamente el semillero Vitalplant S.L, que se encuentra en el Término Municipal de San Isidro (Níjar), en este semillero se han realizado la inoculación, así como todas las operaciones que se derivan de la producción de plántula de melón.

En el presente estudio se ha evaluado la capacidad *Trichoderma aggressivum* en plántulas de melón. De un modo más concreto se ha evaluado la influencia de los distintos tratamientos sobre el desarrollo de:

- Sistema radicular.
- Parte aérea.
- Determinación de los distintos índices de calidad de plántulas:
 - Índice tallo raíz (ITR) (Iverson, 1984).
 - Índice de calidad de Dickson (QI) (Dickson *et al.*, 1960).
 - Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE) (Schmid-Vogt, 1980).
 - Índice de calidad hortícola al pre-trasplante (IHP)
 - Coeficiente de área foliar (CAF)

- Área foliar específica (AFE)

Se ha realizado un ensayo con 192 semillas de melón con cinco tratamientos diferentes, en el que cada tratamiento constaba de cuarenta plántulas. Cada bandeja consta de 96 alveolos, y cada bandeja constara de dos tratamientos. Se aplicara *Trichoderma aggressivum* aplicada al sustrato a una concentración igual que la dosis comercial, 4 aislados (4 bandejas)+ 2 bandejas sin tratamiento + T1 + T2 + T3 + T4 (2 bandejas).

Tratamientos

R1	R1
R2	R2
R3	R3
R4	R4

Figura 5: Cuadro de los diferentes tratamientos

3.2. Multiplicación y preparación de inóculo.

En el ensayo se han utilizado como inóculo la cepa de *Trichoderma aggressivum*.

3.2.1. Preparación del medio de cultivo para la cepa *Trichoderma aggressivum*.

Para la inoculación con la cepa de *Trichoderma aggressivum*, primero se replican en el medio de cultivo de agar-malta. Para ello se incuban, en placas de Petri, una vez que hayan crecido en estas placas, se extrae un fragmento del medio de cultivo conteniendo al hongo de cada placa y se introduce en una nueva placa. Se dejan crecer 8 días en el laboratorio.

En la preparación de 1 L de medio de cultivo para la replicación de la cepa de *Trichoderma aggressivum* se ha utilizado 17 g de agar y 17 g de extracto de malta. Una vez pesadas estas dos cantidades se introducen ambas en una botella de vidrio y completamos con un litro de agua destilada; seguidamente agitamos la mezcla hasta conseguir una mezcla homogénea. A continuación, se introduce el recipiente con la mezcla en una autoclave durante 30 minutos a 121 °C.

3.2.2. Preparación de disoluciones y cuantificación de esporas.

Para la cuantificación del número conidias se han seguido los siguientes pasos:

1. Las cepas de *Trichoderma aggressivum*, se multiplican en placas de Petri.
2. Con una micropipeta se depositan 4 mL de agua destilada en cada placa y con un asa de vidrio se raspa la superficie para liberar las esporas.
3. Se vierte esa mezcla en un recipiente estéril.
4. Se flamea un colador y se cuele la mezcla, después se pasa por un embudo con papel de filtro, para dejar pasar solamente las conidias.
5. Para proceder a la cuantificación de las conidias primero se diluye la mezcla con agua destilada en un vial, ya que la concentración inicial de conidias es muy elevada y no se pueden cuantificar. A continuación se moja una micro pipeta en Tween 20 para disminuir la tensión superficial y se sumerge en el vial, se cierra y mantiene 1 h en agitación continua en un agitador orbital. Se toma con la micropipeta un poco de mezcla del vial y por último se deposita en el hematocímetro, en el cual se ha puesto un cubreobjetos encima. Con la ayuda de un microscopio óptico se procede a la cuantificación de conidias.

Una vez contadas las esporas y conociendo las medidas anteriormente descritas, mediante la siguiente fórmula se obtiene la concentración de esporas.

○ Fórmula de valoración (válida universalmente):

$$\text{partículas por volumen} = \frac{\text{partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} \cdot \text{profundidad cámara (mm)} \cdot \text{dilución}}$$

Calculada la concentración inicial de las dos cepas de *Trichoderma* sp., éstas se diluyen, hasta alcanzar la concentración deseada.

3.3. Inoculación en semillero.

Una vez preparadas todas las disoluciones en laboratorio, se ha procedido a la inoculación manual directa en semillero. El volumen de disolución total para cada alveolo es de 10 mL, variando la concentración de conidias por plántula según el tratamiento.



Figura 5: Preparación inoculo en semillero

- **Metodología empleada en el proceso de inoculación:**
 1. Las bandejas de turba donde posteriormente serian plantadas de melón, las suministró el semillero preparadas para proceder a la inoculación.
 2. Manualmente se ha procedido al vertido del inoculo en una bandeja junto con el sustrato, donde se mezcló.

3. Una vez que se encuentra la concentración de inóculo deseada en el sustrato, las bandejas, se fueron rellenando, manualmente para dejar las bandejas preparadas para plantar.
4. Seguidamente se fueron plantando las semillas en cada uno de los alveolos, donde dejamos crecer la planta en el vivero unos 30 días.

3.4. Evaluación del estado y calidad de las plántulas.

Las plántulas han permanecido en las instalaciones del semillero durante 30 días después de la inoculación y antes de la toma y recogida de datos de las mismas, en condiciones ambientales y cuidados propios para la producción de este tipo de cultivo. Estas condiciones no han sido reveladas para la realización del presente estudio ya que son propiedad del semillero.

En las medidas realizadas en el cálculo de la calidad pre-trasplante de las plántulas de melón, no se han visto afectadas todas las plántulas, si no que tomamos diez plantas al azar de cada repetición.

De cada uno de las cuarenta plantas de cada tratamiento analizaremos los siguientes parámetros:

- Longitud de las plantas (cm).
- Número de hojas.
- Calibre (mm).
- Peso seco de la raíz (gr).
- Peso seco del tallo (gr).
- Peso seco de las hojas (gr).
- Área foliar (cm²).

Con todos estos parámetros se procederán a la evaluación y cálculo de la calidad pre-trasplante de las plántulas en los distintos tratamientos, para ello se calcularán los diferentes índices:

❖ **Índice tallo raíz (ITR)** (Iverson, 1984).

Indica que la mejor calidad de una planta se obtiene cuando la parte aérea es relativamente pequeña y la raíz es grande, lo que puede garantizar una mayor supervivencia ya que se evita que la transpiración exceda la capacidad de absorción (May, 1984).

$$\text{ITR} = \frac{\text{peso seco del tallo (g)}}{\text{peso seco de la raíz (g)}}$$

❖ **Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE)** (Schmidt- Vogt, 1980)

Relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma. Valores altos de este índice serán indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante (Toral, 1997).

$$\text{IE} = \frac{\text{diámetro tallo (mm)}}{\frac{\text{altura tallo (cm)}}{10} + 2}$$

❖ **Índice de calidad de Dickson (QI)** (Dickson *et al.*, 1960)

Combina la información de los dos índices anteriores y los ajusta por el efecto del tamaño de la planta, por lo que un aumento en el índice representa a plantas de mejor calidad, lo cual implica que, por una parte, el desarrollo de la planta es grande y que, al mismo tiempo, las fracciones aérea y radical están equilibradas (Oliet, 2000).

$$\text{QI} = \frac{\text{peso seco total (g)}}{\frac{\text{altura tallo (mm)}}{\text{diámetro tallo (mm)}} + \frac{\text{peso seco tallo (g)}}{\text{peso seco raíces (g)}}$$

❖ **Área foliar específica (AFE).**

Es el cociente entre el área foliar (cm²) y la materia seca de las hojas (g). Según Masson et al., (1991) valores bajos de este índice, implica la existencia de plantas que resisten mejor el choque del trasplante.

$$AFE = \frac{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}{\text{materia seca de las hojas (g)}}$$

❖ **Coefficiente de área foliar (CAF).**

$$CAF = \frac{\text{área foliar (cm}^2\text{)}}{\text{materia seca total (g)}}$$

Es el cociente entre el área foliar (cm²) y la materia seca total (g). Masson et al., (1991), recomiendan la utilización del AFE para calcular la calidad pre-trasplante.

❖ **Índice de calidad hortícola al pre-trasplante (ICPH).**

Éste índice intenta compilar toda la información que relaciona los parámetros deseados o buscados en plántulas al pre-trasplante dedicadas a la producción hortícola en intensivo.

$$ICPH = 10000 \times \frac{\text{peso seco aéreo (g)}}{\text{área foliar (cm}^2\text{)}} \times \frac{\text{peso seco raíz (g)}}{\text{peso total seco (g)}} \times \frac{\text{calibre (cm)}}{\text{altura del tallo (cm)}}$$

3.4.1. Metodología empleada en la realización de las medidas.



Figura 6: Despiece previamente de las plantas de melón

1. Medida de la longitud total.

Se ha considerado como longitud total de las plántulas a la distancia comprendida entre la parte superior del sustrato y ápice de la plántula a través de una cinta métrica.

2. Medida del diámetro del tallo.

Se ha considerado como valor del diámetro del tallo, a la media aritmética de dos medidas realizadas de forma decusada, en primer lugar paralela al cotiledón, y en segundo lugar perpendicular al mismo cotiledón. La medida se ha realizado con un calibre, con una precisión en la medida de ± 1 mm.



Figura 7: Medida del calibre de las plantas de melón

3. Medida área foliar.

El área foliar se ha calculado con un programa informático (WinDIAS 3.1.lnk) para ello ha sido preciso escanear las hojas en un escáner convencional. Se ha considerado área foliar a la suma limbo más el peciolo.



Figura 8: Preparando las plantas para medición del área foliar

4. Cuantificación del número de hojas.

Para la cuantificación del número de hojas se ha prestado especial atención a la distinción entre hojas verdaderas y cotiledones. Las plántulas de melón tienen dos cotiledones.

5. Cálculo del peso seco de cada una de las partes de las plántulas.

Después de haber realizado las medidas, se introducen las raíces, los tallos y las partes aéreas, por separado y perfectamente identificadas en una estufa a 70 °C durante 48 horas, para posteriormente proceder al pesado de cada una de estas partes en una balanza de precisión $\pm 0,01$ g, para obtener el valor de la materia seca total por plántula y de sus distintas partes.

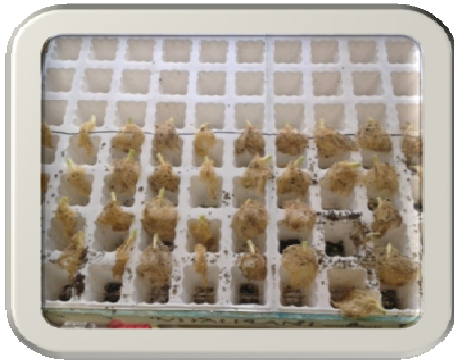


Figura 9: Preparando raíz para secado



Figura 10: Pesando la raíz

3.4.2. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Con los parámetros registrados se ha realizado un análisis estadístico de comparación de la medias (ANOVA LSD 95% y test de rango múltiple) con el programa estadístico Statgraphic Centurion. Además, se han calculado distintos índices de estimación de la calidad de plántulas.

4. Resultados y discusión.

4.1. Introducción

En este estudio se ha evaluado si *Trichoderma aggressivum* actúa en el cultivo del melón como agente de control biológico.

Para comprobar que *Trichoderma aggressivum* aplicado en sustrato promueve el desarrollo de plantas de melón haremos una comparativa con *Trichoderma aggressivum* en aplicación foliar en plantas de melón. De esta forma podremos saber que modo de aplicación es más eficaz para su posterior uso en plántulas de semillero, ya que la práctica habitual en semillero es aplicarlo mediante pulverización.

Las investigaciones han mostrado que con la aplicación de *Trichoderma spp.*, en plantas de diferentes cultivos son generalmente más vigorosas, con mayor peso húmedo y seco y mejor desarrollo del sistema radical (Donoso et al. 2008; Torres et al. 2008; Lo et al. 1997; Windham et al. 1986).

Los diferentes tratamientos evaluados durante el ensayo de *Trichoderma aggressivum* aplicado en sustrato son los siguientes:

TO: Tratamiento testigo, sin incorporación de *Trichoderma*.

T1: *T. aggressivum* cepa1 aplicada a $2,5 \times 10^5$ conidias x ml⁻¹.

T2: *T. aggressivum* cepa2 aplicada a $2,5 \times 10^5$ conidias x ml⁻¹.

T3: *T. aggressivum* cepa3 aplicada a $2,5 \times 10^5$ conidias x ml⁻¹.

T4: *T. aggressivum* cepa4 aplicada a $2,5 \times 10^5$ conidias x ml⁻¹.

4.2. Medidas de cada uno de los parámetros estudiados.

4.2.1. Longitud del tallo.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el desarrollo del tallo.

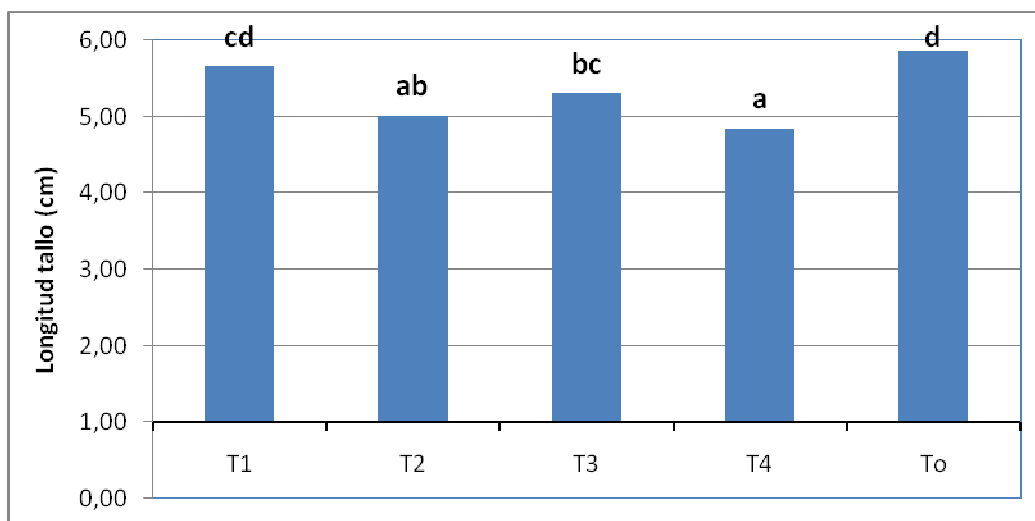


Figura 11: Longitud media del tallo de las plantas de melón (cm), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

La longitud media del tallo (Figura 10), ha obtenido el mayor valor en el tratamiento To (testigo), siendo equiparable a T1, mientras que el tratamiento T4 es en el que se obtiene un menor valor de longitud existiendo así grandes diferencias significativas según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), a diferencia del resto de tratamientos.

4.2.2. Número de hojas

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el número de hojas.

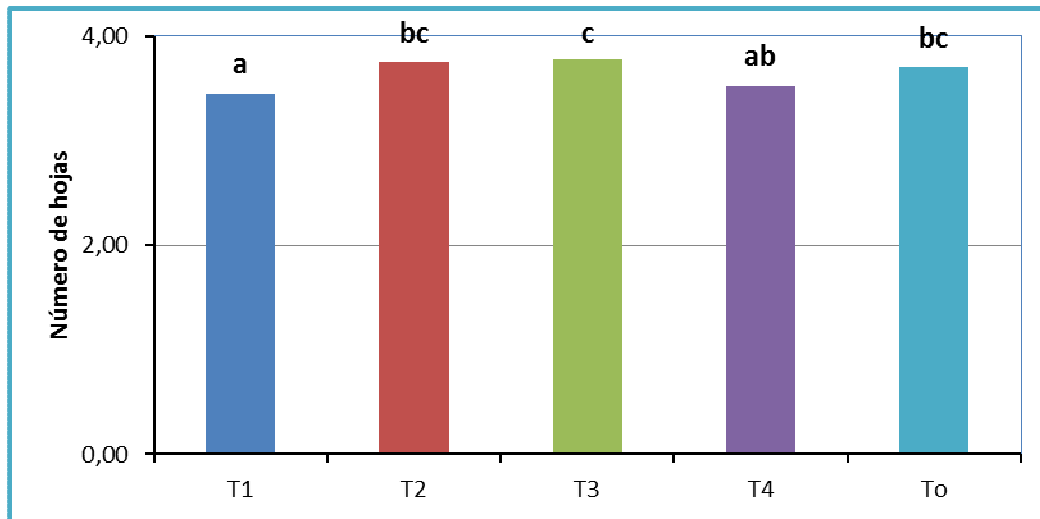


Figura 12: Número medio de hojas de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

En los resultados obtenidos (Figura 11), todos los tratamientos obtienen un número parecido de hojas con respecto al testigo.

En este caso sí que se muestran diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), resaltando las del tratamiento T3 en la que se obtiene un mayor número de hojas respecto a las demás.

4.2.3. Diámetro

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el diámetro del tallo.

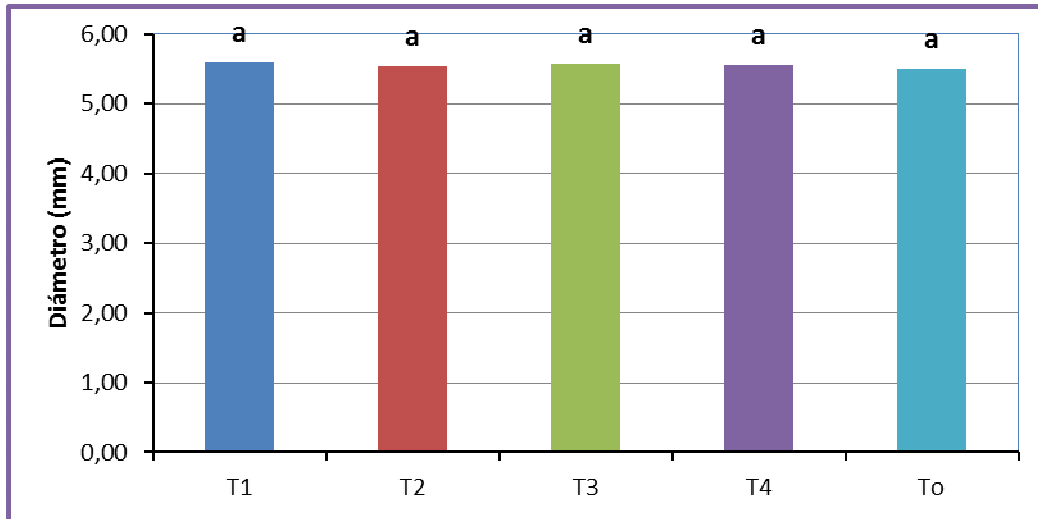


Figura 13: Diámetro medio del tallo de las plantas de melón (mm), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (ANOVA, LSD 95%).

En los resultados obtenidos sobre el calibre (Figura 12), no hemos podido encontrar ninguna diferencia significativa estadísticamente según (ANOVA, LSD 95%), por lo cual, todos los tratamientos tuvieron un calibre similar.

4.2.4. Peso seco raíz.

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el peso seco de la raíz.

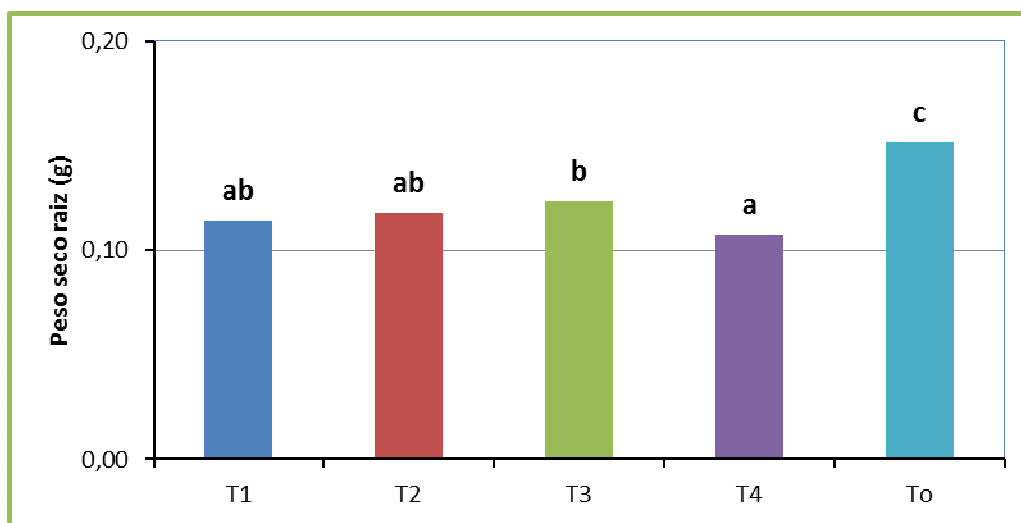


Figura 14: Peso seco medio de la raíz de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

En los resultados obtenidos (Figura 13) en este parámetro estudiado existen diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), entre todos los tratamientos, y el testigo que ha tenido el mayor valor de peso seco. Esto podría indicar que las cepas de *Trichoderma* disminuyen el peso seco de la raíz.

Por regla general, todos los tratamientos tienen pesos secos de las raíces parecidos a diferencia de T4 y T3.

4.2.5. Peso seco parte aérea.

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en peso seco en la parte aérea.

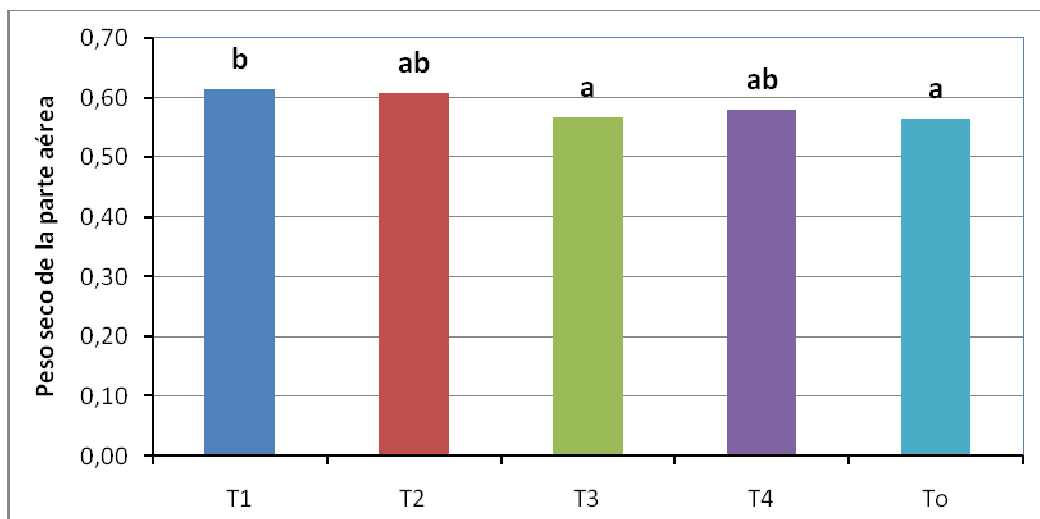


Figura 15: Peso seco medio de la parte aérea de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Tras los resultados obtenidos en la (Figura 14) tan sólo podemos resaltar que el peso seco de la parte aérea de T1 fue superior al testigo. El resto de tratamientos se asemejan bastante al valor del testigo, con estos resultados a pesar de que haya diferencias significativas según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), no podemos concluir que T1 pueda ser un resultado significativo ya que se aproximan al resultado de T2 y T4.

4.2.6. Peso seco tallo.

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el peso seco del tallo.

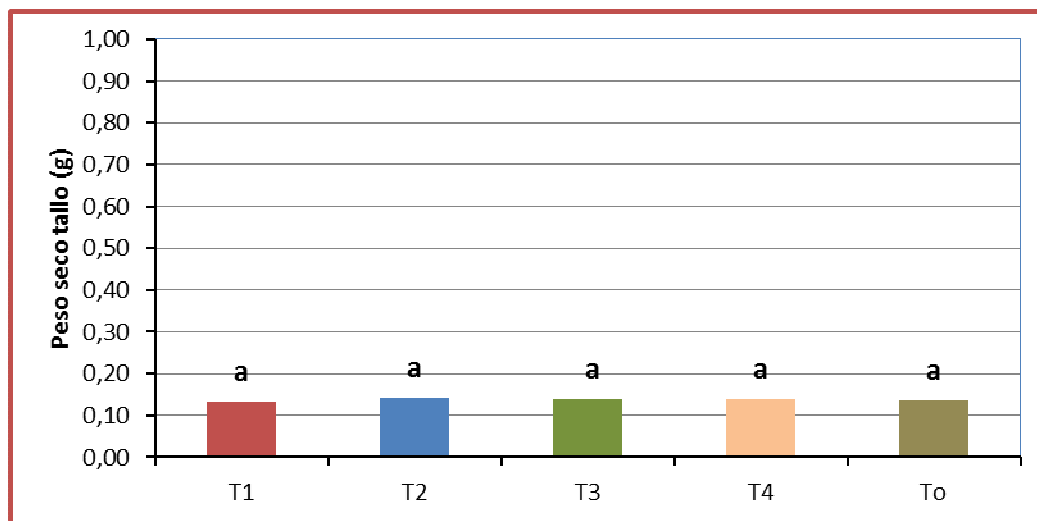


Figura 16: Peso seco medio de los tallos de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

En los resultados obtenidos (Figura 15) tampoco existen diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), al igual que en el calibre podemos afirmar que todos los tratamientos, incluido el testigo, tienen un comportamiento similar.

4.2.7. Peso seco hoja.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el peso seco de la hoja.

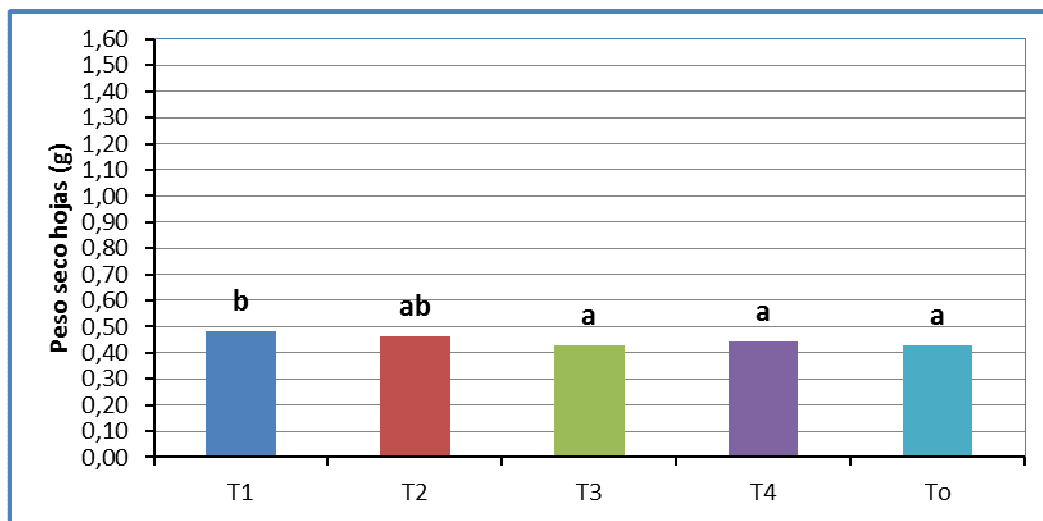


Figura 17: Peso seco medio de las hojas de las plantas de melón (g), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Los resultados obtenidos (Figura 16), podemos observar que el valor más alto es el del tratamiento T1, cabe destacar que los valores superan los del testigo a pesar de que éste tuviera un mayor número de hojas.

Como podemos ver en el gráfico sí que existen diferencias significativas según (Kruskal-Wallis, LSD 99%) entre los tratamientos T3, T4 y el testigo, respecto a T1.

4.2.8. Peso seco total

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el peso seco total de la planta.

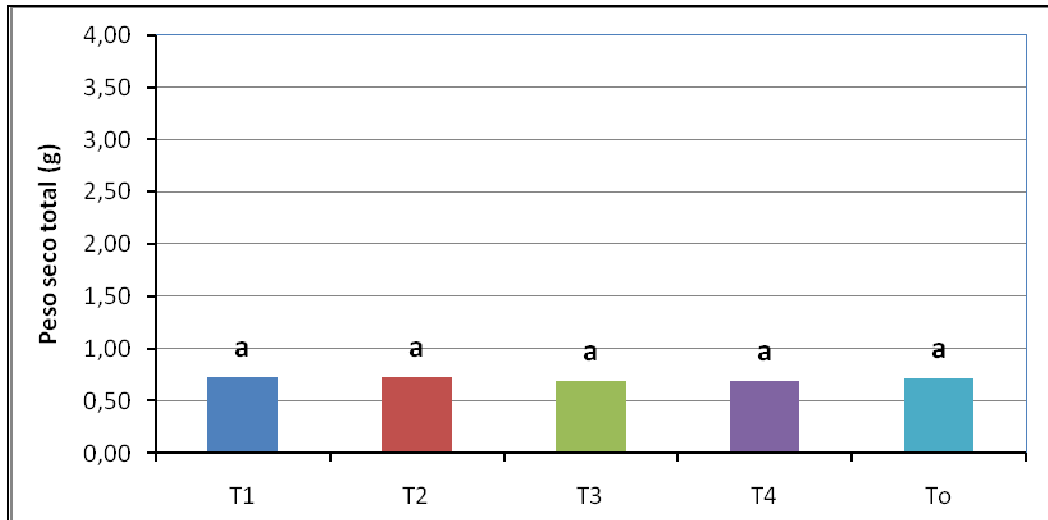


Figura 18: Peso seco total de las plantas de melón (mm), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (ANOVA, LSD 95%).

En los resultados obtenidos (Figura 17) tampoco existen diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), al igual que en el calibre y en el peso seco del tallo, por lo tanto, podemos afirmar que todos los tratamientos, incluido el testigo, tienen un comportamiento similar.

4.2.9. Área foliar

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el desarrollo del área foliar.

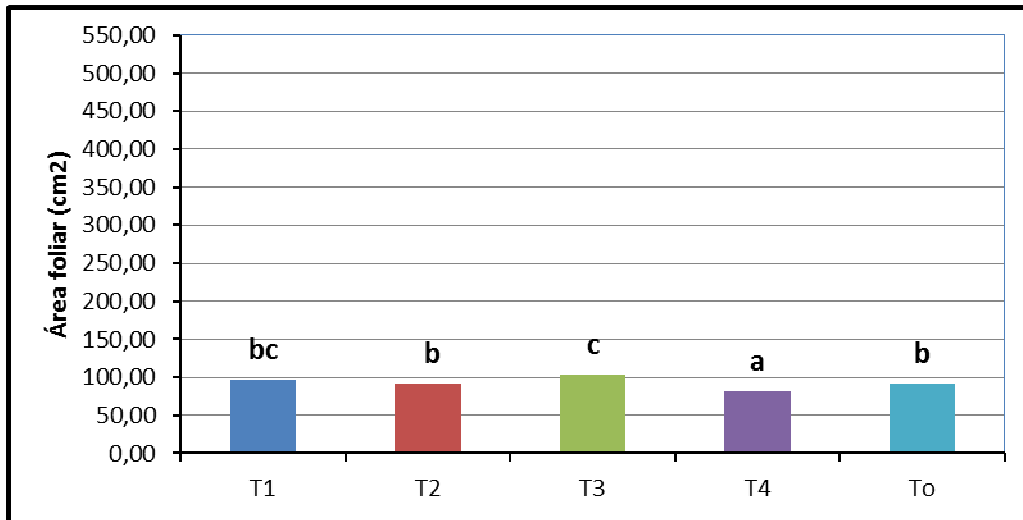


Figura 19: Área foliar media de las plantas de melón (cm²), inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

En los resultados obtenidos (Figura 18) podemos ver que el área foliar del tratamiento T3 supera al resto de los demás. Este resultado obtiene un valor significativo respecto al testigo, demostrando que dicho tratamiento provoca un aumento foliar importante. En este parámetro también existen grandes diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), sobre todo en el tratamiento T3.

4.2.10. Índice de esbeltez de Schmidt-Vogt (IE) (Schmidt- Vogt, 1980).

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el índice de esbeltez de Schmidt-Vogt.

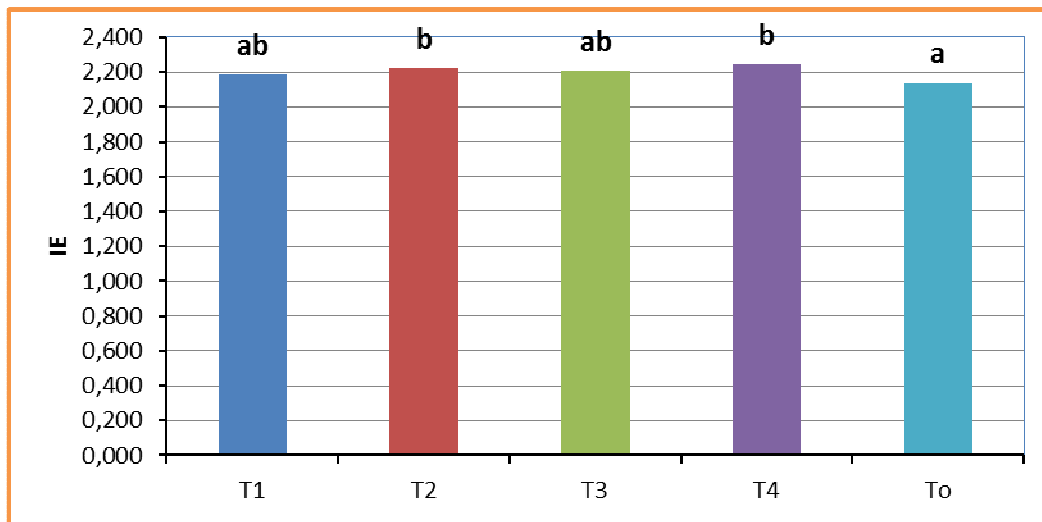


Figura 20: Índice de esbeltez (IE) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

El índice de Esbeltez relaciona la resistencia de la planta con la capacidad fotosintética de la misma. Valores altos de este índice serán indicativos de una planta más robusta y con menos probabilidad de daño de algún tipo en el trasplante (Toral, 1997).

En los resultados obtenidos (Figura 19) no existen grandes diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), aunque cabe diferenciar que los valores de todos los tratamientos son mayores que los valores del testigo a diferencia del tratamiento T4 que son prácticamente iguales, teniendo así estos menos probabilidad de daño a la hora de su trasplante.

4.2.11. Índice tallo raíz (ITR) (Iverson, 1984)

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el índice tallo de raíz.

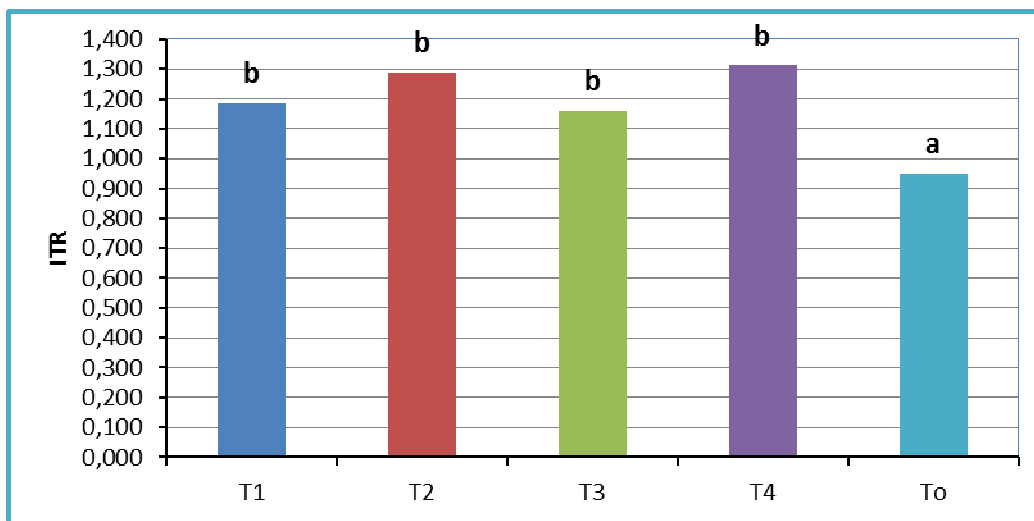


Figura 21: Índice de tallo raíz (ITR) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

El Índice tallo raíz indica que la mejor calidad de una planta se obtiene cuando la parte aérea es relativamente pequeña y la raíz es grande, lo que puede garantizar una mayor supervivencia ya que se evita que la transpiración exceda la capacidad de absorción (May, 1984). Según esto podemos decir que los mejores valores de calidad para el (ITR), son valores bajos, que en este caso se alcanzan en el tratamiento T2 a diferencia del testigo que es el que peor ITR ha obtenido.

En los resultados obtenidos (Figura 20) si que existen diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%), en lo cuales, nos demuestran que los tratamientos han sido negativos ya que todos superan el ITR del testigo.

4.2.12. Índice de calidad de Dickson (QI) (Dickson *et al.*, 1960)

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el índice de calidad de Dickson.

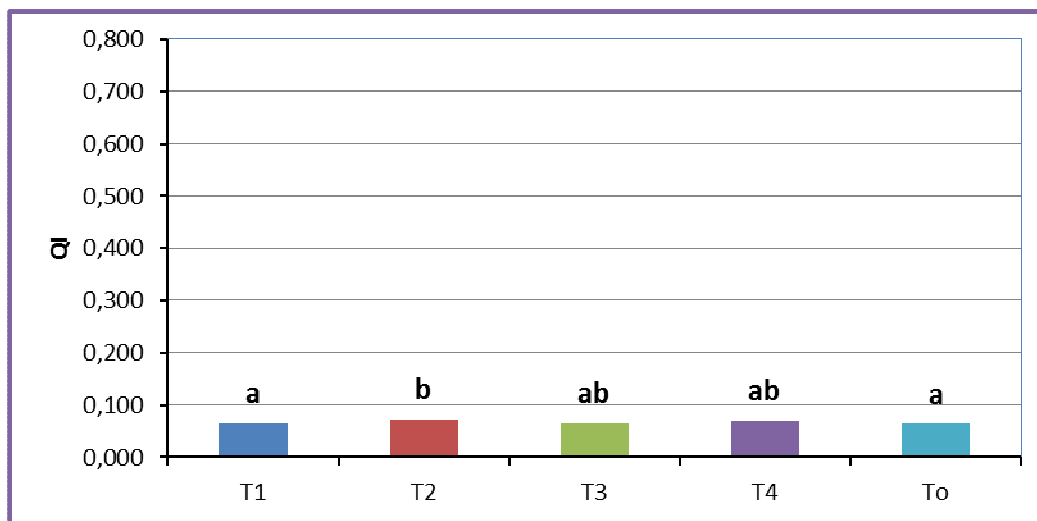


Figura 22: Índice de calidad de Dickson (QI) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Los resultados obtenidos (Figura 21), en el caso de este parámetro es que combina la información de los dos índices de Esbeltez y el índice de tallo y raíz y los ajusta por el efecto del tamaño de la planta, por lo que un aumento en el índice representa a plantas de mejor calidad, lo cual implica que, por una parte, el desarrollo de la planta es grande y que, al mismo tiempo, las fracciones aérea y radical están equilibradas (Oliet, 2000).

Como podemos observar en la figura 21 tan solo existen diferencias significativas estadísticamente según Kruskal-Wallis, LSD 99%, entre el testigo y el T1 respecto al T2, el cuál demuestra mejorar la calidad respecto al testigo.

4.2.13. Área foliar específica (AFE)

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el desarrollo del área foliar específica.

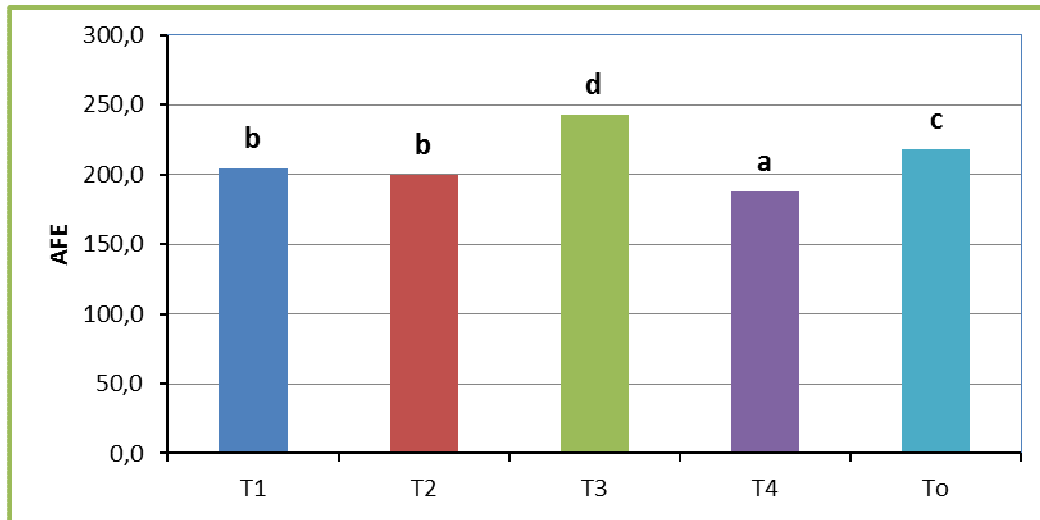


Figura 23: Área foliar específica (AFE) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

El área foliar específica (AFE), es el cociente que relaciona el área foliar con el peso seco de las hojas. Se recomienda que el área foliar específica (AFE) sea lo más pequeña posible, ya que así las plantas será más resistentes a la hora de su trasplante.

Podemos observar (Figura 22) que hay diferencias significativas estadísticamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%) entre T1, T2 y T4, respecto al testigo, lo cual supone una resistencia mayor en aquellas plantas a las cuales se les aplique dichos tratamientos.

4.2.14. Cociente de área foliar (CAF)

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en el cociente de área foliar.

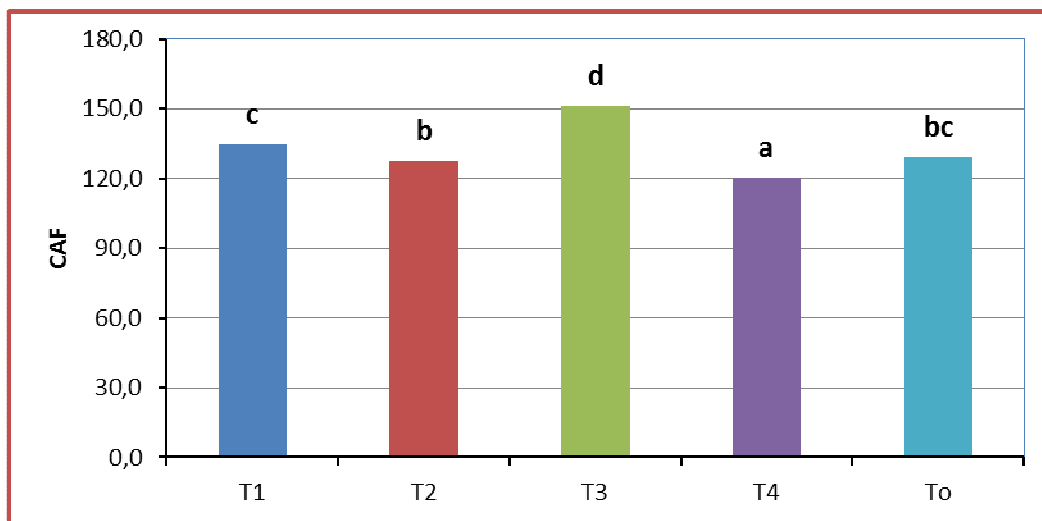


Figura 24: Cociente de área foliar (CAF) de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (ANOVA LSD 95%).

El Coeficiente de área foliar (CAF), se define como el cociente que relaciona el área foliar con el peso seco total de las plántulas. En este caso pasa prácticamente lo mismo que con el área foliar específica por lo que interesa que los valores sean bajos.

Según los resultados podemos observar que el T4 reduce significativamente según (Kruskal-Wallis, LSD 99%) el CAF respecto al testigo, demostrando tener mayor resistencia que el mismo. En los demás tratamientos se observa una pérdida de resistencia respecto al control.

4.2.15. Índice de calidad hortícola al pre-trasplante

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de *Trichoderma* en sustrato y su efecto en calidad hortícola al pre-trasplante.

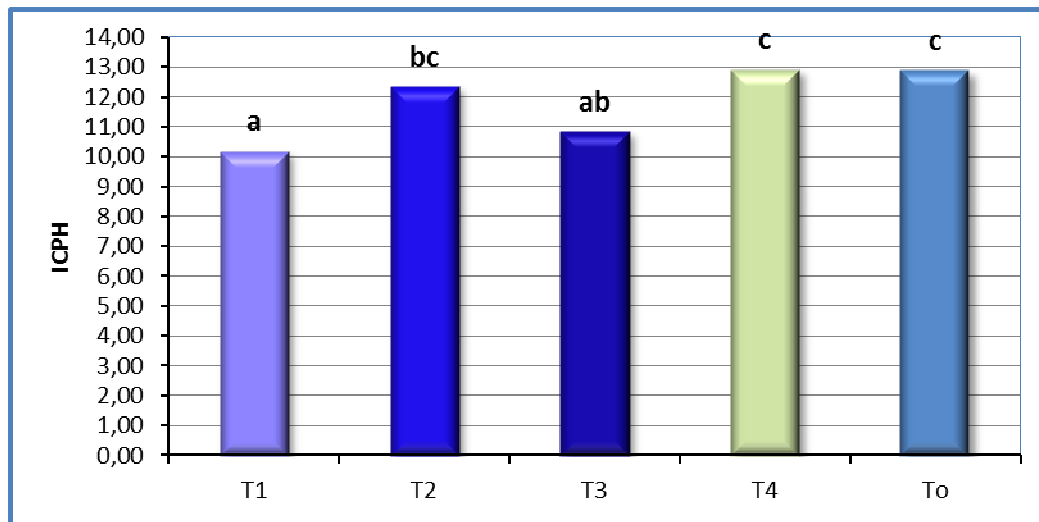





Figura 25: Índice propuesto en el trabajo (ICHP); Índice de calidad hortícola al pre-trasplante de las plantas de melón, inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma spp.* Se compara con un tratamiento testigo (To). (Kruskal-Wallis, LSD 99%).

Las diferencias significativas estadísticamente se realizaron mediante (Kruskal-Wallis, LSD 99%). Los resultados dan a conocer que el T4 y el testigo tienen la mejor calidad pre-trasplante y son significativos con respecto a T3 y T1, por tanto, tan solo T4 se equipara a la calidad del testigo.

4.3 Comparación de *Trichoderma aggressivum* en sustrato con *Trichoderma aggressivum* aplicado en riego.

En la tabla (5), se muestran el conjunto de parámetros evaluados en el ensayo, para cada uno de los tratamientos con sus valores correspondientes. Con la finalidad de hacer más cómoda y rápida su consulta en caso necesario, se ha establecido un vínculo de tres colores, indicativos de las diferencias significativas que puedan existir en comparación al testigo. Así pues, el color naranja representa el valor del testigo, cada tratamiento efectuado que presente éste color significa que está muy próximo a él, no existiendo por tanto diferencias significativas. Por el contrario, el color verde nos indica en general un resultado positivo, es decir, existirán diferencias significativas en comparación al testigo de referencia. Por último, el color rojo indicará que por lo general (ya que en el caso del parámetro índice tallo-raíz (ITR) los mejores valores son los más bajos) resultados negativos, valores que se alejan de nuestro testigo sin mostrar diferencias de interés.

En la tabla (6), se muestra el conjunto de parámetros que Rodríguez 2013, evaluó en su ensayo, de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego en plántulas de melón.

-  Valor superior al testigo de referencia (To), con diferencias significativas.
-  Valor igual o muy próximo al testigo de referencia (To), sin diferencias significativas.
-  Valor lejano respecto al testigo de referencia (To), las diferencias significativas dependerán del tipo de parámetro.

Parámetro/ Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T0
Longitud tallo (cm)	5,66 cd	5,01 ab	5,30 bc	4,84 a	5,87 d
Número de hojas	3,45 a	3,75 bc	3,78 c	3,53 ab	3,70 bc
Diámetro (mm)	5,60 a	5,55 a	5,58 a	5,56 a	5,51 a
Peso seco raíz	0,11 ab	0,12 ab	0,12 b	0,11 a	0,15 c
Peso seco tallo	0,13 a	0,14 a	0,14 a	0,14 a	0,14 a
Peso seco hojas	0,48 b	0,47 ab	0,43 a	0,44 a	0,43 a
Área foliar	97,14 bc	92,05 b	104,15 c	82,32 a	92,05 b
IE	2,183 ab	2,220 b	2,205 ab	2,241 b	2,133 a
QI	0,065 a	0,072 b	0,066 ab	0,070 ab	0,064 a
AFE	204,7 b	199,7 b	243,3 b	187,5 a	218,0 c
CAF	134,7 c	127,5 b	151,1 d	120,4 a	129,0 bc
ICPH	10,17 a	12,35 bc	10,85 ab	12,92 c	12,89 c

Tabla 5: Resultados obtenidos. Valores de cada parámetro con sus tratamientos.

Los resultados obtenidos por Rodríguez (2013) quién aplicó *Trichoderma aggressivum* en riego son los siguientes:

Parámetro/ Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T0
Longitud tallo (cm)	5,60 a	6,32 bc	6,70 cd	5,91 ab	5,92 ab
Número de hojas	3,75 abc	3,83 bc	3,85 c	3,87 c	3,70 abc
Diámetro (mm)	5,60 ab	5,48 ab	6,00 c	5,51 ab	5,53 ab
Peso seco raíz	0,15 ab	0,16 bc	0,18 d	0,17 c	0,15 ab
Peso seco tallo	0,14 ab	0,15 bc	0,16 cd	0,14 a	0,14 a
Peso seco hojas	0,43 b	0,40 ab	0,41 ab	0,43 b	0,43 b
Área foliar	96,20 a	95,69 a	94,42 a	96,51 a	92,05 a
IE	2,19 cd	2,09 b	2,25 d	2,13 bc	2,14 bc
QI	0,38 cd	0,35 bc	0,37 cd	0,39 d	0,37 cd
AFE	218 a	224 ab	238 cd	230 bc	221 ab
CAF	129 ab	134 bc	133 bc	125 a	130 ab
ICPH	9,85 c	8,57 b	9,69 c	9,82 c	9,62 bc

Tabla 6: Resultados obtenidos por tras la aplicación de *T. aggressivum* en riego.

Comparando ambos cuadros, se puede observar que los resultados de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, tiene una longitud de tallo superior a los aplicados en *Trichoderma aggressivum* aplicada en sustrato, ya que demuestra que los tratamientos T2 y T3, superan significativamente a los del T0, lo cual no ocurre en este proyecto, inclusive ocurre lo contrario, dado que el T2, T3 y T4 disminuyen significativamente el valor del testigo. Por lo tanto la aplicación en riego de *Trichoderma aggressivum* agranda la longitud del tallo, en las plántulas de melón. El número de hojas en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, T3 y T4 superaron a T0, en el proyecto actual ninguno de los tratamientos fue mayor. Hablando sobre el diámetro podemos observar que T3 supero a T0, en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, mientras que en *Trichoderma aggressivum* aplicada en sustrato los valores son similares estadísticamente, entre los tratamientos y el testigo.

Si tenemos en cuenta el peso seco, empezando por el peso seco de la raíz, en el presente proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en sustrato, los 4 tratamientos obtienen valores significativos menores que el testigo, en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, T3 y T4 mejoraron significativamente respecto al testigo.

El peso seco del tallo, en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en sustrato los tratamientos dieron un valor similar al del testigo, en cambio, en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego el testigo fue superado por los tratamientos T2 y T3. El peso seco en hojas, en mi proyecto el resultado obtenido fue que solo el T1 obtuvo un valor superior al T0, mientras en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego ninguno de los tratamientos supero a T0.

Para terminar con la comparación entre los datos obtenidos en nuestro ensayo con respecto a los datos obtenidos en el ensayo de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, vamos a pasar a comparar los índices de calidad, empezando por el área foliar específica (AFE), que como recordamos anteriormente, los mejores valores para este índice son valores bajos, aquí observamos que los valores de todos los tratamientos, en mi proyecto mejora los tratamientos respecto a T0. En el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, todos los tratamientos obtuvieron datos similares significativamente. Sobre el coeficiente de área foliar (CAF), que al igual que el AFE, los mejores valores son los valores bajos, se observa en mi proyecto que solo T4 mejoro a T0, sin embargo en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, obtuvo valores similares al testigo.

El índice de calidad hortícola pre-trasplante en el proyecto actual empeoró todos los tratamientos a T0, en el proyecto de *Trichoderma aggressivum* aplicada en riego, obtuvo valores significativamente similares al T0.

5. Conclusiones

1.- La aplicación de *Trichoderma aggressivum* es beneficiosa para la planta. La aplicación en riego mejora, en casi todos los parámetros estudiados. La aplicación en riego según la comparación entre ambos proyectos es más beneficiosa que en sustrato.

2.- Existen diferencias en la aplicación de los diferentes aislados, en el efecto sobre las plantas. La elección del mejor aislado está condicionada por otros factores.

6. Bibliografía

- **Abbot L. y Robson A.**, 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 35:121-150.
- **Ahmad J. y Baker R.**, 1987. *Rhizosphere* competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182.189.
- **Allen M.**, 1991. *The Ecology of Mycorrhizae*. M.F. Allen Ed. Cambridge University Press.
- **Allen M.**, 1992. Mycorrhizal functioning an Integrative Plant-Fungal Process. Chapman y Hall, New York. pp. 534.
- **Altomare C., Norvell W., Björkman T. y Harman G.**, 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol* 65: 1926-2933.
- **Arora D., Elander R. y Mukerji K.**, 1992. *Handbook of applied Mycology: Fungal Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp. 4: 697.
- **Augé R.**, 2001. Water relation, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- **Azcón-Aguilar C. y Barea J.**, 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: Significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68: 1-24.
- **Barea J., Azcón R. y Azcón C.**, 1991. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing systems. *Methods in microbiology*. Academic Press. 24: 391-346.
- **Barea J.**, 1998. Biología de la rífosfera. *Investigación y Ciencia (Scientific American)* 256: 74-81.
- **Barnett H. y Hunter B.**, 1982. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Thirdedition. Burgess publishing. Mineapolis, Minesota. USA 241 pp.
- **Bauer T.**, 2001. *Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia Rhizobiaceae*.
- **Benítez T., Rincón A., Limón M. y Codón A.**, 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *Internacional Microbiology*. 7: 249-260.
- **Bhattacharya P. y Chaudhuri S.**, 1993. Biofertilizer: Opening a new horizon. *Yohana* 37(9): 12-31.
- **Bisby G.**, 1939. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Transactions of the British Mycological Society* 23: 149-168.

- **Bissett J., 1991.** A revision of the genus *Trichoderma*. spp., Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357-2372.
- **Bissett J., 1992.** *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 639-641.
- **Björkman T., Blanchard L. y Harman G., 1998.** Growth Enhancement of *shrunkn-2 (sh2)* Sweet Corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of Environmental Stress. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(1): 35-40.
- **Borowicz V.A., 2001.** Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? *Ecology* 82 (11): 3057-3068.
- **Bowen G. y Rovira A., 1999.** The rizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66: 1-102.
- **Buchert J., Oksanen T., Pere J., Siika-aho M., Suurnäkki A. y Viikari L., 1998.** Application of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. En *Trichoderma & Gliocladium*. Harman G. y Kubicek C. (eds). London: Taylor Francis.
- **Burdman S., Vedder D., German M., Itzigsohn R., Kigel J., Jurkevitch E. y Okon Y., 1998.** Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In C. Elmerick, A.Kondorsi, y W. E. Newton. Eds. *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*: 609-612.
- **Camargo H., 2005.** Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani enarroz* (Orizasatriva), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista *Trichoderma harzianum*.
- **Cantón, J. M., Galera, I., Martínez, A. 2003.** El cultivo protegido del melón. Técnicas de producción en cultivos protegidos. Camacho, F. (Coor). I. Cajamar Almería; 589-648.
- **Castle A, Speranzini D, Rghei N, Alm G, Rinker D, Bissett J. 1998.** Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology*.64:133-137.
- **Chang Y., Baker R., Kleifeld O. y Chet I., 1986.** Increasead growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant disease* 70: 145- 148; 76: 60-65.
- **Chang ST. 1999.** World production of cultivated and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. In China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 291-300.

- **Chen X., Romaine C., Ospina-Giraldo M. y Royse D.,** 1999. A polymerase chain reaction-based test for the identification of *Trichoderma harzianum* biotypes 2 and 4, responsible for the worldwide green mould epidemic in cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiol Biotechnol.* 51: 572-578.
- **Clift AD, Shamshad A.** 2009. Modelling mites, moulds and mushroom yields in the Australian Mushroom Industry. In: *Proceedings of the 18th World IMACS / MODSIM Congress, Cairns, Australia, 13-17 July*, 491-497.
- **Compagnoni A.,** 1997. Cambiando le regole Europee per l'agricoltura biologica. *L'Informatore Agrario* 53 (31): 60-61.
- **Costa, J., Catalá, S.** 1997. El melón bajo condiciones de salinidad. En: *Melón* Coor. Por Namesny, A. Ediciones de Horticultura. 107-110.
- **Covasevic F., Echeverría H. y Andreoli Y.,** 1995. Micorriación vesículo-arbuscular espontánea en trigo en función de la disponibilidad de fósforo. *Ciencia del Suelo* 13:47- 51.
- **Coyne M.,** 1999. *Soil Microbiology: An exploratory approach.* DelmarPublishers. pp. 462
- **Dell'Amico J., Torrecillas A., Rodríguez P., Morte A. y Sánchez-Blanco M.,** 2002. Water and growth parameter responses to tomato plants associated with arbuscular mycorrhizae during drought and recovery. *Journal of Agricultural Sciences* 138: 387- 393.
- **Díaz J.,** 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.
- **Dickson A, AL Leaf, IE Hosner.** 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *Forest Chronicle* 36: 10-13.
- **Doyle O.** 1991. *Trichoderma* green mould update. *Irish Mushroom Review*; 3:13-17.
- **Donoso E, G. Lobos y N. Rojas.** 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque* 29 81):52-57.
- **Elo S., Maunuksela L., Salkinoja- Salonen M., Smolander A. y Átela K.,** 2000. Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting properties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 143-152.
- **Esposito E. y da Silva M.,** 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critical Reviews in Microbiology* 24: 89-98.

- **Faggioli V., Freytes G. y Galarza C.,** 2008. Las micorrizas en trigo y su relación con la absorción de fósforo del suelo. Publicación Técnica INTA EEA Marcos Juárez.
- **Fernández F.,** 1999. Manejo de las asociaciones micorrízico-arbusculares (MA) sobre la producción de posturas de cafetos (*C. arabica* L.) en algunos tipos de suelos. Tesis de Doctorado, INCA, La Habana, 118 pp.
- **Fernández L.,** 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas 62: 96-100.
- **Ferraris G., Couretot L. y Díaz Zorita M.,** 2008. Respuesta de trigo a tratamientos con *Azospirillum sp.* según niveles tecnológicos. VII Congreso. Nacional de Trigo. V Simposio Invernal de Cereales de siembra otoño - Invernal. I Encuentro del Mercosur.
- **Fletcher JT.** 1990. *Trichoderma* and *Penicillium* diseases of *Agaricus bisporus*. A literature review for the Horticultural Development Council. London: ADAS.
- **Fuentes-Ramírez L. y Caballero- Mellado J.,** 2005. Bacterial biofertilizers. En Siddiquiz A (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Holanda. pp. 143-172.
- **Gams W. y Bissett J.,** 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. En *Trichoderma & Gliocladium*. Harman G. y Kubicek C. (eds). London, pp. 101-127.
- **García F., Picone L. y Berardo A.,** 2006. Fósforo. pp. 99-121. En: H.E.Echeverría y F.O. García (eds.) *Fertilidad de Suelos y Fertilización de cultivos*. Editorial INTA, Buenos Aires, Argentina. 521p.
- **García-Morras JA, Oliván R.** 1999. *Problemática actual de Trichoderma Pers.*In: 2. *Jornadas Técnicas del Champiñón y Otros Hongos Comestibles en Castilla-La Mancha, Casasimarro, Cuenca (España), 4-5 Nov 1997*, DPC PPE, Cuenca, Spain,131-140.
- **Geels FJ, van de Geijin, Rutjens A.** Pests and diseases. In: van Griensven LJLD, ed. *The cultivation of mushrooms*. Md: Interlingua, East Grinstead, Sussex, England; 1988: 361-422.
- **Geels FP.** 1997. Rondetafel-bijeenkomst over *Trichoderma Champignoncultuur*. 41: 13.
- **Giambanco, H. (1997).** Manejo pos-cosecha del melón. En: melones. Ed. Horticultura. Reus. pp. 165-174.

- **Glick B.**, 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- **González Chavira, M.M.; Torres Pacheco, I. Y guzmán Maldonado, H.**, 2002. Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. Tampico: Proceeding of the 16th Internacional Peppers.
- **González-Vizcaíno A., Carmona M., Bago A., Cano C., García J., Pozo M., Segundo E.**, 2007. Potencial biofertilizante de micorrizas arbusculares en cultivo ecológico en invernaderos. En: <http://www.agroecologia.net/>
- **González G.**, 2009. Uso de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, Inoculantes en el cultivo de Maíz (RizofosLiq).
- **Goszczyńska, T. Sefrontein, J. J. Sefrontein**, 2000. Introduction to practical phytobacteriology.
- **Guét G.**, 1997. Agricultura biológica mediterránea. *L'Informatore Agrario* 53(45): 85
- **Harman G. y Kubicek C.** (eds). London, pp. 101-127.
- **Harley J. y Smith S.**, 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York.
- **Harman G.**, 2003. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). (Consultado: 25 julio 2013). En:<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>
- **Harman G., Howell C., Viterbo A., Chet I. y Lorito M.**, 2004. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2:43-56.
- **Harman G., Taylor A. y Stasz T.**, 1989. Combinig effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Dis* 73: 631-637.
- **Harrier L. y Watson C.**, 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy*. 20: 185-225.
- **Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vagvolgyi C, Kredics L.** Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*. 2007 ; 97: 532-537.
- **Hermosa MR, Grondona I, Monte E.** 1999. Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from commercial mushroom compost in Spain. *Plant Disease*. 83: 591.

- **Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, Garcia-Acha I.** 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1890-1898.
- **Honrubia M., Torres P., Díaz G. y Cano A.,** 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Proyecto LUCDEME VIII. Monografía n° 54 ICONA.
- **Hubbard, N.L.; Pharr, D.M. (1990).** Sucrose metabolism in ripening Muskmelon Fruit as affected by leaf area. *J. Amer. Soc. Sci.*, 115.pp. 798-802.
- **Iverson RD. 1984.** Planting stock selection: Meeting biological needs and operational realities. *In* Duryea ML, TD Landis eds. Forest nursery manual. Oregon State University. Corvallis, USA. p. 261-266.
- **Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. y Barea J.,** 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of soils* 37: 1-16.
- **Kennedy A. y Smith K.,** 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170: 75-86.
- **Klopper J., Lifshitz R., y Zablotowicz R.,** 1989. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Tibtech* 7: 39-44.
- **Kubicek C. y Harman G.,** 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*.
- **Kuhls K., Lieckfeldt E., Samuels G., Kovacs W., Meyer W., Petrini O., Gams W., Borner T. y Kubicek C.,** 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7755-7760.
- **Kumar S., Shender R. y Grover M.,** 2006. Interaction Among Beneficial Microorganisms. *En* Mukerji KG, Manoharachary C, Sigh J (Eds.) *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer. Berlín, Alemania. pp. 121-132.
- **Leweis J. y Papavizas G.,** 1984. *Chlamydo-spore* formation by *Trichoderma* spp. Innatural substrates. *Can J Microbiol* 30: 1-7.
- **Lieckfeldt E., Kuhls K., Muthumeenakshi S.,** 1998. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and therteleomorphs. *In* *Trichoderma & Gliocladium*.
- **Lindsey D. y Baker R.,** 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57: 1262-1263.

- **Linderman R.**, 2000. Effects of mycorrhizas on plant tolerant to diseases, pp. 345-366. En: Arbuscular Mycorrhizas: physiology and function. Eds.: Y. Kapulnick and D.D. Douds Jr. Kluwer Academic Press.
- **Lorito M.**, 2006. La biología molecular de las interacciones entre *Trichoderma*, hongos fitopatógenos y plantas: oportunidades para desarrollar nuevos métodos de control de enfermedades.
- **Lo C. T, E. Nelson and G. Harman.** 1997. Improved biological efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by using spray applications. *Plant Disease* 81(10):1132-1138.
- **Mamon M.L, Savoie J.-M, Olivier J.-M.** 2000. Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia* 92: 233–240.
- **Maroto. J. V.** 1983. Horticultura herbácea especial. Ediciones mundi-prensa.
- **Maroto. J. V.** 1997. Horticultura herbácea especial. Ediciones mundi-prensa.
- **Martínez V.,** 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. XIII Congreso Científico del INCA. Programa y resúmenes. La Habana.
- **Martínez C. y Ramírez F.,** 2000. Lombricultura y Agricultura Sustentable. 1ra. Edición, México D.F. 236 pp.
- **Mayea S.,** 1995. Los biofertilizantes y su acción fitopatógena. Memorias del III Encuentro Nacional Científico Técnico de Bioplaguicidas y EXPOCREE. INISAV, Ciudad de La Habana, p. 41.
- **Mamoun ML, Lapicco R, Savoie J-M, Olivier JM.** 2000.Green mould disease in France: *Trichoderma harzianum* Th2 and other species causing damages on mushroom farms. *Mushroom Science.* 15: 625-632.
- **Mayea S., Carone Margarita, Novo R., Boado I., Silveira E., Soria M., Morales Y. y Valiño A.,** 1998. Microbiología Agropecuaria. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana. pp 156-178.
- **McCollim, T.J. et al.** (1998). Soluble Sugar Accumulation and Activity or Related Enzymes during Muskmelon Fruit development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104. pp. 100- 101.
- **Mejía G.,** 1995. Agricultura para la vida: movimientos alternativos frente a la agricultura química. Cali, Colombia: Feriva, 252.
- **Morris E, Doyle O, Clancy KJ.** 1995. A profile of *Trichoderma* species. I—Mushroom compost production. *Mushroom Science.*14 :611-618.

- **Morte A., Lovisolo C. y Schubert A.,** 2000. Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal associations *Helianthemum almeriense-Tefezioclaveryi*. *Mycorriza* 10 (3): 115-119.
- **Morte A., Díaz G., Rodríguez P., Alarcón J. y Sánchez-Blanco M.,** 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* 44 (2): 263-267.
- **Morte A. y Honrubia M.,** 2002. Growth response of *Phoenix canariensis* Hort. Et Chabaud to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Palms* 46: 76-80.
- **Motomura.,** 1994. Formation of alcohol substances in muskmelon: variation among cultivars and with maturity. *Science Horticulturae* 58: 343-350.
- **Mumpuni A, Sharma HSS, Brown AE.** 1998. Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 5053-5056.
- **Muthumeenakshi S, Mills PR, Brown AE, Seaby DA.** 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonising mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*. 140:769-777.
- **Muthumeenakshi S, Brown AE, Mills PR.** 1998. Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and the British Isles. *Mycological Research*. 102: 385-390.
- **Namesny.A.** 1999. Post-recolección de hortalizas. Ediciones de horticultura: 37-40.
- **Ospina-Giraldo MD, Royse DJ, Thon MR, Chen X, Romaine CP.** 1998. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world-wide sources. *Mycologia*. 90: 76-81.
- **Papavizas G.,** 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology* 23: 23-54.
- **Parets S.,** 2002. Evaluación agronómica de la coinoculación de micorrizas arbusculares, *Rhizobium phaseolii* *Trichoderma harzianum* en el cultivo de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis en opción al grado de Máster en Ciencias Agrícolas, Universidad Agraria de La Habana.
- **Peterson R., Massicotte H. y Melville L.,** 2004. Arbuscular mycorrhizas. En: *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC-CNRC. Research Press. Ottawa. Canada. Chap.3: 57-79.

- **Pozo M. y Azcón-Aguilar C.,** 2007. Unravelling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Op Plant Biol* 10: 393-398.
- **Rehner S. y Samuels G.,** 1994. Taxonomy and Phylogeny of *Gliocladium* analyzed from nuclear subunitribosomal DNA sequences. *Mycol Res* 98: 625-634.
- **Riegel D. y Nielsen G.,** 1996. *Trichoderma* spp. As plant growth stimulants. CRC. *Critical reviews in biotechnology* 7 (2): 97-106.
- **Rifai M.,** 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Res Mycol.* 116: 1-56.
- **Rinker DL.** Disease management strategies for *Trichoderma* mould. *Mushroom World.* 1993;4:3-5.
- **Rinker DL, Alm G, Castle AJ, Rghei N.** 1998. Not all green is *Trichoderma* green mould. *Mushroom World.* 8:47-50.
- **Rodelas M.,** 2001. Interacción *Rhizobium-Azospirillum* y *Rhizobium-Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en *Vicia faba*.
- **Rodríguez H. y Fraga R.,** 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech-nol. Adv.* 17: 319-339.
- **Rodríguez. I.,** 1990. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana.
- **Romaine CP, Chen X, Ospina-Giraldo MD, Royse DJ.** 1999. Phylogenetic analysis of *Trichoderma* spp. associated with green mould on *Agaricus bisporus* using a sequence in tubulin gene 1. In: Broderick A. ed. *Mushroom Biology and Mushroom Products, Proceedings of the 3rd International Conference, Sydney, Australia (CD-ROM).* 116-124.
- **Romaine CP, Chen X, Ospina-Giraldo MD, Royse DJ.** 2001. Molecular genetics and pathogenicity of biocontrol and mushroom *Trichoderma*. *IOBC WPRS Bulletin.* 24(3):333-336.
- **Rosen D., Edelman M., Galun E. y Danon D.,** 1974. Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*. Structural changes in mitochondria and other spores constituents during conidium maturation and germination. *J Gen Microbiol* 83: 31-49.
- **Royse DJ, Ospina-Giraldo MD, Chen X, Romaine CP.** 2001. Phylogenetic analyses of *Trichoderma harzianum* associated with mushroom culture or used for biological control of plant pathogens. *IOBC WPRS Bulletin.* 24(3):341-344.

- **Samuels G.J, Dodd S.L, Gams W, Castlebury L.A, Petrini O.** 2002. *Trichoderma* species associated with the green mould epidemic of commercial grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146–170.
- **Seaby DA.** 1987. Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species. *Mushroom Journal*. 179:355-361.
- **Seaby DA.** 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*. 45: 905-912
- **Schalamuk S., Velásquez S., Chidichimo H. y Cabello M.,** 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* 1: 22-28.
- **Sharma HSS, Kilpatrick M, Ward F, Lyons G, Burns L.** 1999. Colonisation of phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:572-578.
- **Sinden J, Hauser E.** 1953. Nature and control of three mildew diseases of mushrooms in America. *Mushroom Science*. 2: 177- 180.
- **Smith S. y Read D.,** 1997. *Mycological Symbiosis*. 2nd edn. Academic Press London.
- **Sobieralski K, Siwulski M, Frużyńska-Joźwiak D, Gorski R.** 2009. Impact of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Th2 on the yielding of *Agaricus bisporus*. *Phytopathologia* 53: 5–10.
- **Staunton L.** 1987. *Trichoderma* green mould in mushroom compost. *The Mushroom Journal*. 179:362-363.
- **Spillmann A.** 2002. What’s killing the mushrooms of Pennsylvania? (A mushroom mystery). *Agricultural Research*. December: 14-15.
- **Stefanova M., Leiva A., Larriganaga L. y Coronado M.,** 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*. 16: 509-516.
- **Stefanova Nalinova, M.,** 1996. Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. Como antagonista de hongos fitopatógenos. La Habana: Instituto de Sanidad Vegetal.
- **Tejeda T., Soto F. y Guerrero G.,** 1998. Utilización de algunas variantes de infección micorrízica como alternativa nutricionales en obtención de posturas de cafeto mediante vías orgánicas. *Cultivos Tropicales (La Habana)* 19 (1): 28-32.

- **Thompson J.**, 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: B.A. Stewart, *Advances in Soil Sciences*. New York, Springer-Verlag, I: 1-40.
- **Trappe J.**, 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 15: 203-222.
- **Vessey J.**, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- **Weller D. y Thomashow L.**, 1993. Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 306-311.
- **Wilbur A.**, 1983 Food Quality Assurance.
- **Williams J, Clarkson JM, Mills PR, Cooper RM.** 2003. Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:4192-4199.
- **Windham M., Elad Y. y Baker R.**, 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-521.
- **Yedidia I, A. Srivastva, Y. Kapulnik and I. Chet.** 2001. Effect de *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235:235-242.
- **Zimand G., Elad Y. y Chet I.**, 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1225-1260.