

Estudio de la Capacidad Antagonista de Distintos Microhongos

Autor: Antonio Lucas Rumín

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Tutores: M^a Carmen Vargas García

Ignacio Flores Sánchez

Universidad de Almería

Almería, Septiembre 2013



TRABAJO FIN DE MÁSTER

El presente trabajo ha sido presentado por Antonio Lucas Rumín, correspondiente al Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria.

Fdo. **Antonio Lucas Rumín**

Fdo. **M^a Carmen Vargas García**

Fdo. **Ignacio Flores Sánchez**

Contenido

Resumen	3
1. Introducción	4
2. Materiales y métodos	9
a) Material Biológico	9
b) Medio de cultivo	10
c) Estudios de crecimiento y antagonismo	10
d) Análisis estadístico	11
3. Resultados y discusión	12
3.1. Selección del medio de cultivo	12
3.2. Estudio de antagonismo	15
4. Conclusiones	20
5. Bibliografía	21

Resumen

Actualmente, ante la creciente necesidad de buscar una alternativa al uso de fitosanitarios, surge el control biológico como una solución efectiva, ambientalmente más segura y económicamente viable para el control de plagas. Este Trabajo Fin de Máster se encuadra dentro de un estudio de control biológico, mediante el cual se ha estudiado la capacidad antagonista de dos especies de *Trichoderma* frente a dos especies fitopatógenas (*Fusarium oxysporum* y *Botrytis aclada*), que causan enfermedades en cultivos muy comunes. En primer lugar, se realizó un ensayo con el fin de seleccionar el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de las especies antagonistas, resultando mejor el medio PDA que el medio AEM. Posteriormente, sobre este medio PDA se evaluó la capacidad antagonista de las cuatros de cepas utilizadas en el experimento, demostrando así que las cepas de *Trichoderma harzarium* inhiben más el crecimiento de *Botrytis*, mientras que las de *Trichoderma viride* resultan más eficaces para reducir el grado de crecimiento de *Fusarium*. Otro experimento, indicó que si se establece primero la especie fitopatógena en el medio, se dificulta la acción antagonista de los agentes de control biológico.

1. Introducción

Se entiende por control biológico la reducción de las actividades productoras de enfermedades generadas por un parásito o un patógeno, mediante el uso de especies antagonistas capacitadas para sintetizar compuestos que influyen sobre el desarrollo de los organismos patógenos o alteran las condiciones en las que estos se desenvuelven (Van Driesche *et al*, 2007). Este fenómeno natural de regulación de procesos fitopatógenos se conoció en la década de los '70 como Manejo Integrado de Plagas (MIP) y pretendía disminuir o eliminar el uso de plaguicidas, reduciendo de esta manera el impacto al medio ambiente. Actualmente el control biológico es un componente muy importante y vital dentro de éste y se basa en que, en determinadas circunstancias, la densidad poblacional de las especies patógenas disminuye como consecuencia de la acción de enemigos naturales. La intensidad de dicha disminución está condicionada por los niveles en los que se encuentren cada uno de los protagonistas, ya que la relación se establece en términos de regulación y no de control. Por tanto, y en cierto sentido, el grado de eficacia del control biológico está relacionado con el balance entre la densidad de carga de las especies implicadas (Eilenberg *et al.*, 2001).

Existen tres técnicas generales de control biológico: importación (control biológico clásico), incremento y conservación. Cada una de estas técnicas se puede usar sola o en combinación en un programa de control biológico (Figura 1). En el control biológico clásico, los enemigos naturales son deliberadamente importados de una región a otra con el propósito de suprimir un fitopatógeno de origen exótico. La técnica de incremento, método de control biológico más extendido a nivel comercial en la actualidad, implica la producción masiva y colonización periódica de enemigos naturales. Finalmente, la conservación se puede considerar como una técnica indirecta, ya que se centra en la identificación de los factores que pueden limitar la efectividad de los enemigos naturales y su modificación dirigida, de manera que se favorezca la acción de dichas especies.

Grosso modo, se trata de minimizar influencias negativas y maximizar las positivas, generando de esta forma las condiciones adecuadas para una mejor actuación de los enemigos naturales.

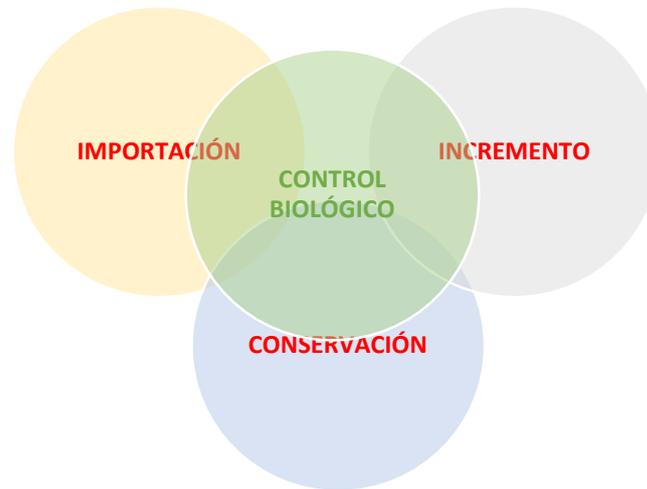


Figura 1. Representación gráfica de las principales técnicas de control biológico.

Desde un punto de vista ecológico y natural, la conservación de los enemigos naturales debiera ser la primera actuación a realizar a la hora de aplicar cualquier estrategia de control biológico; sin embargo, la importancia de esta práctica en los programas de control biológico es limitada y en términos económicos no es rentable (Pérez Consuegra, 2004).

Según French (1988), el control biológico posee ciertas ventajas entre las cuales se puede destacar el bajo efecto nocivo de los enemigos naturales hacia otros organismos, incluido el hombre, la baja probabilidad de promover con su acción la aparición de plagas secundarias o una relación coste/beneficio mayoritariamente favorable. Por otro lado, algunas de las limitaciones que tiene el control biológico son: falta de disponibilidad en la gran mayoría de los casos, mayor grado de susceptibilidad de los enemigos naturales a los fitosanitarios en relación a los organismos fitopatógenos y la escasa inversión económica en el sector. Por otra parte, en estrategias de introducción, también es necesario considerar los riesgos asociados a la introducción de agentes de control

biológico en un hábitat. Aunque tal acción suele ser ambientalmente segura, existen evidencias que indican que la ausencia de efectos negativos no es absoluta. La mayoría de los fracasos de control biológico se han debido a errores de planificación y pobre evaluación de los enemigos naturales antes de una introducción. En algunos casos, los errores han sido de tal magnitud que se ha llegado a provocar la extinción de especies. Actualmente se reconoce que en los programas de control biológico existen ciertos riesgos, como en cualquier otra estrategia de control.

En el mundo biológico hay una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que no se desarrolle la enfermedad. Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos y esta acción puede ser aprovechada por el hombre como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y hongos de los géneros *Fusarium*, *Gliocladium* y *Trichoderma* (Fernández, 2001). Este último género es el más utilizado para evitar la proliferación de fitopatógenos. El género *Trichoderma* se encuadra en el grupo de los ascomicetos, y pertenece al orden Hypocreales Mitospóricos, a la familia *Hypocreaceae*, caracterizada por presentar estructuras de tipo conidias hialinas uniceluladas con la capacidad de producir clamidosporas (esporas de pared gruesa), que le permiten sobrevivir en condiciones desfavorables, tales como estaciones secas o cálidas. Este hongo es ubicuo en suelo, hallándose en madera en descomposición y en material vegetal (Samuels, 2006). Las especies de *Trichoderma* son dominantes de la microbiota del suelo en una amplia variedad de hábitats, gracias a diversos mecanismos de acción, como una alta capacidad reproductiva o plasticidad ecológica, lo que le permite ejercer un efecto biorregulador óptimo (Infante *et al.*, 2009).

Los mecanismos mediante los cuales los agentes de control biológico, como *Trichoderma* spp., ejercen su acción reguladora son diversos. Muchos de ellos actúan de forma indirecta, promoviendo respuestas defensivas en la

planta de carácter fisiológico y bioquímico, que están relacionados con sistemas de resistencia. No obstante, las principales estrategias directas desarrolladas por las especies beneficiosas son micoparasitismo, competencia por nutrientes/espacio, y antibiosis.

Micoparasitismo

Se define como una simbiosis antagónica de distintos organismos, en la que intervienen diversas enzimas extracelulares, como celulasas y quitinasas, que degradan las paredes celulares del fitopatógeno. Es un mecanismo complejo que involucra varias etapas sucesivas. Se inicia con el crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, para concluir, en muchos casos, con la muerte del hongo fitopatógeno (Benítez *et al.*, 2004).

En función del efecto que ocasionan en la especie fitopatógena, se diferencian dos grupos principales de agentes de control biológico: los necrotróficos, que invaden y provocan muerte celular, y los biotróficos, que pueden nutrirse de las células de las especies fitopatógenas sin causar su muerte. La mayoría de los micoparasitos utilizados en invernaderos y pruebas de campo son necrotróficos, como *Trichoderma* spp. (Chet *et al.*, 1998). Los integrantes de este género, tras identificar el fitopatógeno, practican una apertura en la pared celular a través de la cual penetran para absorber sus nutrientes.

Competencia

Este mecanismo de antagonismo es de vital importancia y es definido por Baker (1987) como el comportamiento diferenciado de dos o más organismos frente a un mismo requerimiento, de manera que uno de los organismos reduce el espacio o los nutrientes disponibles. Ciertas características como la velocidad específica de crecimiento o desarrollo y ciertos factores externos como temperatura, humedad o pH afectan el resultado final. En suelos o hábitats muy ricos, la competencia por nutrientes no se muestra como un mecanismo de gran influencia.

Al igual que en el caso del micoparasitismo, diferentes especies de *Trichoderma* están adaptadas para colonizar de una manera muy eficaz los sustratos y sobrevivir en condiciones adversas, lo que les convierte en excelentes competidores. Un claro ejemplo es *Trichoderma harzianum*, que compite favorablemente con *Fusarium* spp. por nutrientes en la colonización de la rizosfera (Casimiro, 2001).

Antibiosis

Griffin (1995) definió antibiosis como "inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro", ya sea a través de la acción de enzimas hidrolíticas, de la síntesis de metabolitos secundarios volátiles, o de la conjunción de ambos factores. Algunas de las enzimas no solo intervienen en el proceso de penetración y lisis, sino que actúan también como antibióticos: Tal es el caso de la enzima endoquitinasa (Ech42) que produce *Trichoderma* y que causa hidrólisis en las paredes de *Botrytis cinerea*, además de inhibir la germinación de conidios y el crecimiento de tubos germinativos de varios hongos. El principal problema de este mecanismo es la posible aparición de cepas resistentes que inhiben esta acción. (Carsolio *et al.*, 2000).

El conocimiento de estos mecanismos previamente comentados, es fundamental desde el punto de vista práctico, debido a que permite una adecuada y mejor selección de aislados con mayor potencialidad para el control de diferentes fitopatógenos. Por lo tanto, el presente trabajo se plantea con el objetivo principal de establecer la capacidad de diversas especies de *Trichoderma* para actuar como agentes de control biológico. Dicho objetivo principal se desglosa en dos subobjetivos:

- 1.- Determinar el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de las especies de *Trichoderma*.
- 2.- Evaluar la capacidad antagónica de las especies de *Trichoderma* spp. en estudio frente a distintos tipos de fitopatógenos.

2. Materiales y métodos

a. Material Biológico

Las cepas usadas en el ensayo, tanto de microhongos antagonistas como de fitopatógenos, fueron facilitadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En total fueron dos cepas de *Trichoderma harzianum*, dos de *Trichoderma viride*, una de *Fusarium oxysporum* y otra de *Botrytis aclada* (Figura 2), todas ellas obtenidas a partir de suelos agrícolas localizados en Andalucía (Tabla 1).



Figura 2. Especies fitopatógenas empleadas en el estudio: *Fusarium oxysporum* (izquierda) y *Botrytis aclada* (derecha).

Tabla 1: Datos de procedencia y año de aislamiento de cada una de las cepas usadas.

	Clave	CECT	Procedencia	Año
Cepa 1 <i>T. harzianum</i>	<i>TH1</i>	20726	Huelva - Cultivo de fresas	2001
Cepa 2 <i>T. harzianum</i>	<i>TH2</i>	20731	Motril - Suelo de aguacate	2001
Cepa 3 <i>T. viride</i>	<i>TV1</i>	20511	Huelva - Cultivo de fresas	2001
Cepa 4 <i>T. viride</i>	<i>TV2</i>	20549	Sevilla - Corcho aislado	2005
Cepa 5 <i>F. oxysporum</i>	-	2866	Almería - Cultivo de tomate	1987
Cepa 6 <i>B. aclada</i>	-	2851	Almería - Cultivo de cebolla	1987

b. Medio de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron Agar Dextrosa-Patata (PDA) y Agar Extracto de Malta (AEM). El medio PDA se prepara a partir de dextrosa y patata blanca (*Solanum tuberosum*). Se caracteriza por su riqueza nutricional y por estimular la esporulación y la producción de pigmentos en ciertos dermatofitos. Su composición final por litro es: Extracto de patata 5,0 g; Dextrosa 20,0 g; Agar 15,0 g.

El medio AEM se prepara a partir de extracto de malta y agar, dando lugar a una base consistente y rica en péptidos, que favorece el desarrollo de microhongos filamentosos. Su composición final por litro es: Extracto de malta 20 g; Agar 20 g. Ambos medios fueron suministrados por la casa CONDALAB, dispuestos ya en placas de Petri elaboradas comercialmente.

c. Estudios de crecimiento y antagonismo

Todas las especies ensayadas de *Trichoderma* fueron sembradas en los dos medios de cultivo anteriormente descritos, PDA y AEM. La siembra se llevó a cabo depositando en el centro de la placa Petri discos de 6 mm procedentes de un cultivo adecuadamente crecido. La incubación a 25 °C se prolongó durante una semana. Diariamente se registró el desarrollo del micelio mediante la utilización de una regla estandarizada. Tras la finalización del periodo de incubación, se detallaron las características miceliales (forma, color, etc.) de cada uno de los hongos

El estudio de capacidad antagónica se llevó a cabo en medio PDA, sobre el cual se efectuaron enfrentamientos duales entre las cuatro cepas antagonistas y las dos fitopatógenas. Para ello, se dispusieron discos de 6 mm de cada una de las especies implicadas en el enfrentamiento en distintos hemisferios de la placa. En un primer ensayo, ambos discos se sembraron simultáneamente, mientras que en un segundo ensayo, transcurrieron 48 horas entre la disposición del fitopatógeno y la del antagonista. La incubación a 25 °C

se prolongó en ambos casos a lo largo de 7 días. Diariamente se tomaron medidas del desarrollo de cada una de las especies fúngicas.

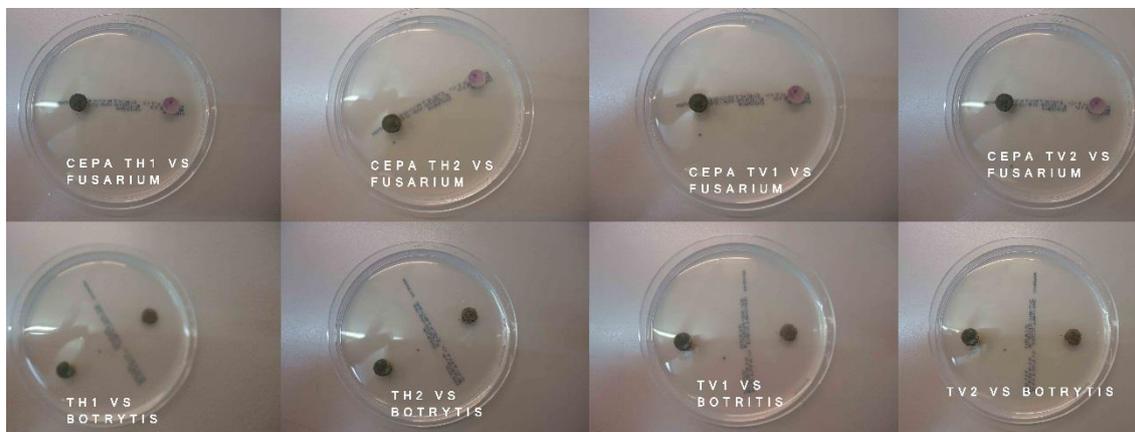


Figura 3. Enfrentamientos entre especies antagonistas y fitopatógenas.

Asimismo se realizó un control de *Fusarium* y *Botrytis* para observar su crecimiento durante los 7 días en placa, lo que permitió establecer el grado de inhibición propiciado por las especies antagonistas.

d. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos durante la fase experimental fueron estadísticamente analizados mediante la aplicación del programa Statgraphics Centurion versión 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, Estados Unidos). En todos los casos se analizó la influencia de los distintos factores ensayados mediante el Análisis Factorial de Varianza (ANOVA), y se comprobó la existencia de diferencias significativas individualmente para cada factor con la aplicación del Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (MDS). En todos los análisis se aplicó un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$).

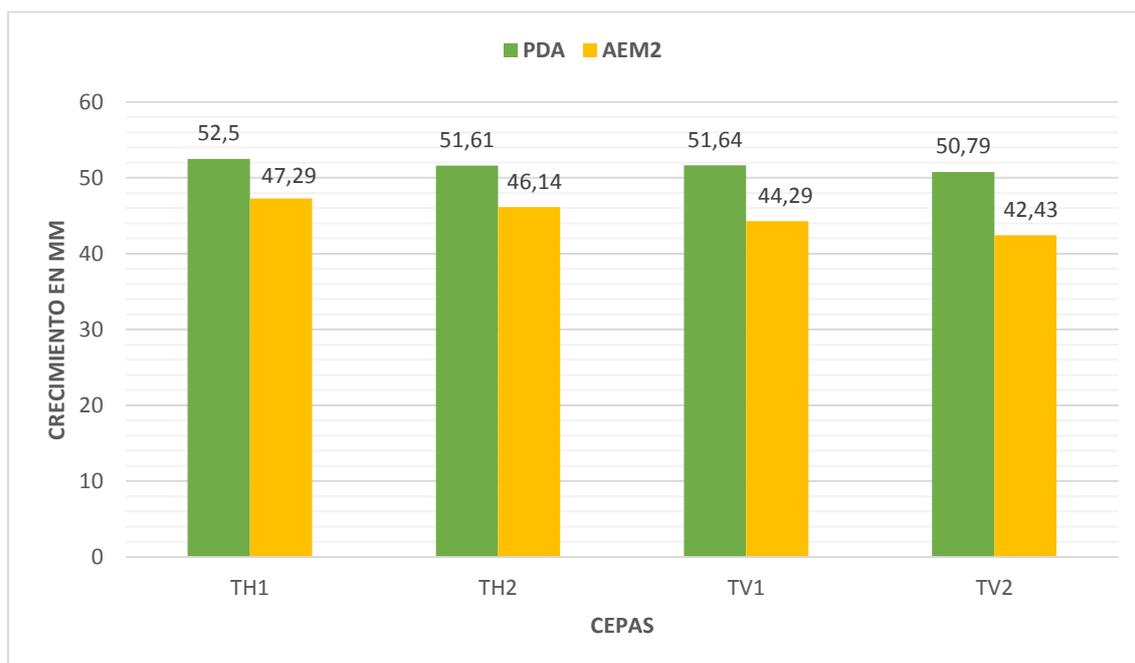
3. Resultados y discusión

A continuación se describen los resultados obtenidos a lo largo de la fase experimental del presente Trabajo Fin de Máster. En todos los casos, se comentan inicialmente los datos crudos, gráfica o tabularmente procesados, y a continuación se relaciona el análisis estadístico realizado, que incluye un estudio de la varianza, que informa sobre la influencia global de los diversos factores en estudio, y un test de rangos múltiples, que permite conocer grupos de homogeneidad para los distintos niveles incluidos en cada factor.

3.1. Selección del medio de cultivo

El primer ensayo realizado, correspondiente al primero de los objetivos planteados en el Trabajo, permitió seleccionar el medio de cultivo más adecuado para la realización de las siguientes fases experimentales. En la Figura 4 se muestran gráficamente los resultados de crecimiento medio de cada una de las cepas de estudio en medio PDA o AEM.

Figura 4. Crecimiento medio de todas las cepas en medios PDA y AEM.



Los datos reflejan la mayor adecuación del medio PDA a las demandas nutricionales de todas y cada una de las cepas empleadas como antagonistas en el presente trabajo. Resultados similares han sido descritos por Monzón y Rodríguez (2006), quienes atribuyen la idoneidad de dicho medio a la elevada concentración de carbohidratos presente. Tal característica favorece el desarrollo en detrimento del proceso de esporulación, al contrario de lo que sucede en el medio AEM.

Desde un punto de vista morfológico, las características de crecimiento en ambos medios fueron las esperadas, es decir, aparición de coloración verde, provocada por las formas esporuladas, y micelio rizado. De acuerdo a referenciado por Harman (2001), ambos rasgos son típicos de las especies pertenecientes al género *Trichoderma*. En la Figura 5 se puede apreciar el aspecto de las cuatro cepas estudiadas en distintos tiempos de desarrollo.

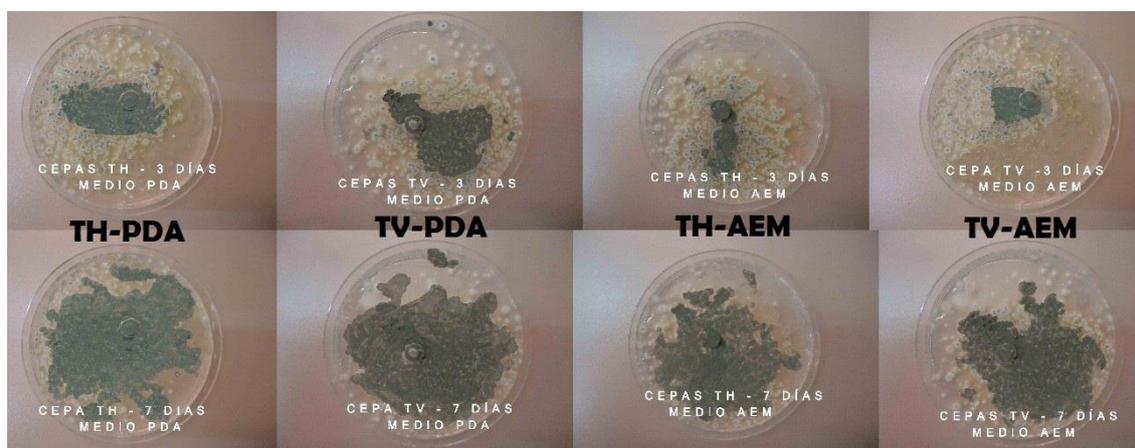


Figura 5. Comparativa del crecimiento de las cepas antagonistas en medios PDA y AEM en distintos días.

La selección del medio PDA como más adecuada para la realización de las siguientes fases experimentales fue ratificada por el análisis estadístico aplicado (Tablas 2 y 3). De forma global, los dos factores en estudio, medio y tiempo, ejercieron influencia significativa sobre la variable crecimiento, tal y como pone de manifiesto el análisis de varianza.

Tabla 2. Influencia de los factores en estudio sobre el crecimiento de las cepas antagonistas según el análisis de varianza ($P < 0.05$).

Cepa	Factor	S. Cuadrados	GL	Cuadrado de la media	F	P
TH1	<i>Medio</i>	190.321	1	190.321	121.99	0.0000
	<i>Tiempo</i>	15740.4	6	2623.4	1681.51	0.0000
TH2	<i>Medio</i>	209.009	1	209.009	143.99	0.0000
	<i>Tiempo</i>	15907.5	6	2651.25	1826.44	0.0000
TV1	<i>Medio</i>	378.893	1	378.893	184.25	0.0000
	<i>Tiempo</i>	15490.2	6	2581.7	1255.45	0.0000
TV2	<i>Medio</i>	488.893	1	488.893	175.03	0.0000
	<i>Tiempo</i>	14768.2	6	2461.36	881.19	0.0000

El análisis detallado de los niveles estudiados para cada factor se llevó a cabo mediante un test de rangos múltiples. Los resultados arrojados por dicho análisis demuestran la dominancia del medio PDA sobre el medio AEM en lo que respecta al factor Medio, así como el establecimiento de grupos homogéneos diferenciados para cada uno de los niveles estudiados en el caso del factor Tiempo. Dichos grupos coinciden de forma absoluta con la ordenación cronológica de los diversos muestreos llevados a cabo, de manera que el valor medio inferior para las cuatro cepas fue el correspondiente a T1 y el superior a T7.

Tabla 3. Test de rangos múltiples para la variable Crecimiento en función de los factores Medio y Tiempo ($P < 0.05$).

Cepa	Factor	Media LS	Grupos homogéneos
TH1	<i>Medio</i>		
	AEM	47.286	X
	PDA	52.500	X
	<i>Tiempo</i>		
	T1	9.750	X
	T2	24.125	X
	T3	42.375	X
	T4	56.125	X
	T5	66.750	X
	T6	72.500	X
T7	77.625	X	

Tabla 3. Continuación

Cepa	Factor	Media LS	Grupos homogéneos
TH2	<i>Medio</i>		
	AEM	46.143	X
	PDA	51.607	X
	<i>Tiempo</i>		
	T1	8.750	X
	T2	22.375	X
	T3	42.000	X
	T4	54.625	X
	T5	66.000	X
	T6	72.000	X
	T7	76.375	X
TV1	<i>Medio</i>		
	AEM	44.286	X
	PDA	51.643	X
	<i>Tiempo</i>		
	T1	8.500	X
	T2	21.375	X
	T3	41.500	X
	T4	54.000	X
	T5	64.375	X
	T6	71.125	X
	T7	74.875	X
TV2	<i>Medio</i>		
	AEM	42.429	X
	PDA	50.786	X
	<i>Tiempo</i>		
	T1	8.125	X
	T2	21.125	X
	T3	39.625	X
	T4	52.250	X
	T5	62.625	X
	T6	69.000	X
	T7	73.500	X

3.2. Estudio de antagonismo

Una vez seleccionado el medio más adecuado para el crecimiento de las cepas antagonistas, se procedió a evaluar la capacidad antagonista de diversas especies de *Trichoderma* frente a fitopatógenos de la importancia de *Fusarium* y *Botrytis*.

El primero de los ensayos realizados propició el enfrentamiento de ambos microorganismos, fitopatógeno y antagonista, en igualdad de condiciones en lo que respecta al grado de desarrollo inicial. Los resultados generados se recogen en la Figura 6. En ella se puede observar como los niveles de crecimiento de ambos fitopatógenos fueron claramente inferiores en presencia de cualquiera de las especies utilizadas como antagonistas.

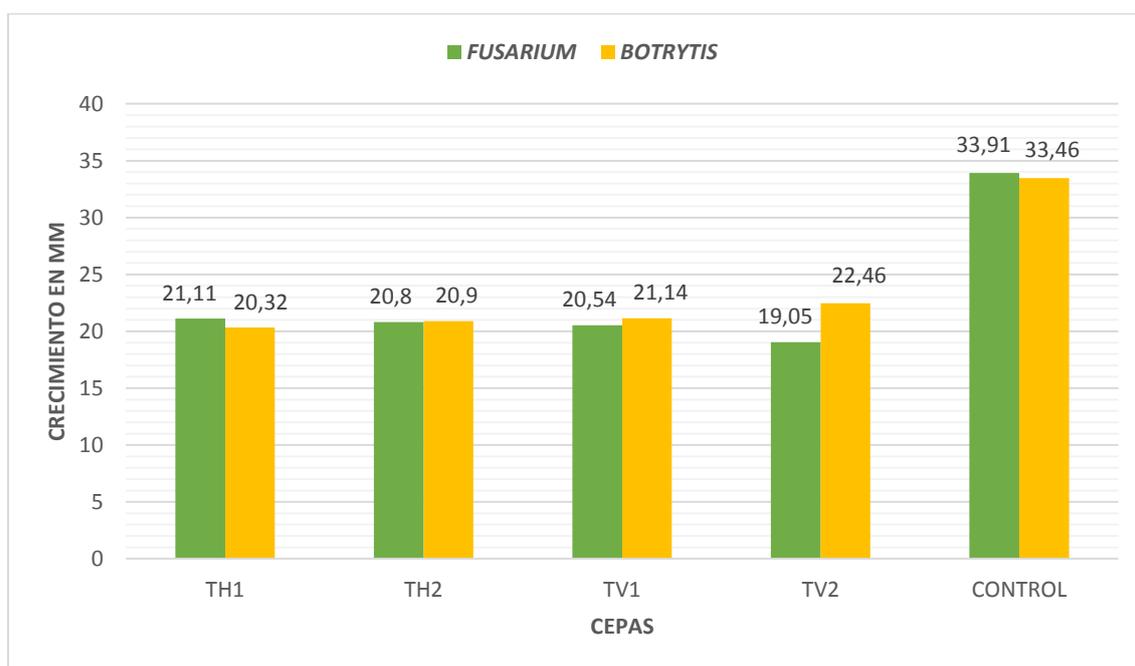


Figura 6. Crecimiento medio de las cepas fitopatógenas (*Fusarium* y *Botrytis*) en presencia de las diversas cepas antagonistas.

Aunque el grado de disminución causado fue considerable en todos los casos, se observó una mayor eficacia de las cepas de *Trichoderma harzanium* frente a *Botrytis*, mientras que *Fusarium* se vio más afectado por la presencia de *Trichoderma viride*. Si bien los resultados aquí descritos no alcanzan los niveles referenciados por Cruz (2003) o Zhang *et al.* (2005) con los mismos microorganismos antagonistas, si confirman su capacidad para actuar como agentes de control biológico, ya sea de forma individual o combinada, tal y como sugiere Betalleluz (2003), en sus recomendaciones sobre el control preventivo.

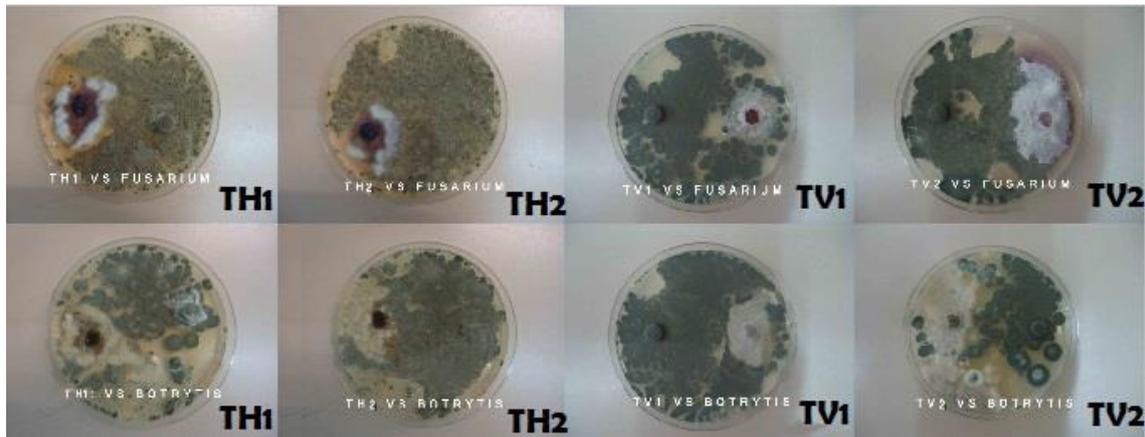


Figura 7. Comparativa del crecimiento de *Fusarium* y *Botrytis* enfrentadas a las cepas antagonistas.

En un segundo ensayo, se estudió la capacidad antagonista de dos de las cepas de *Trichoderma*, TH1 y TV1, frente a fitopatógenos ya crecidos durante 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8

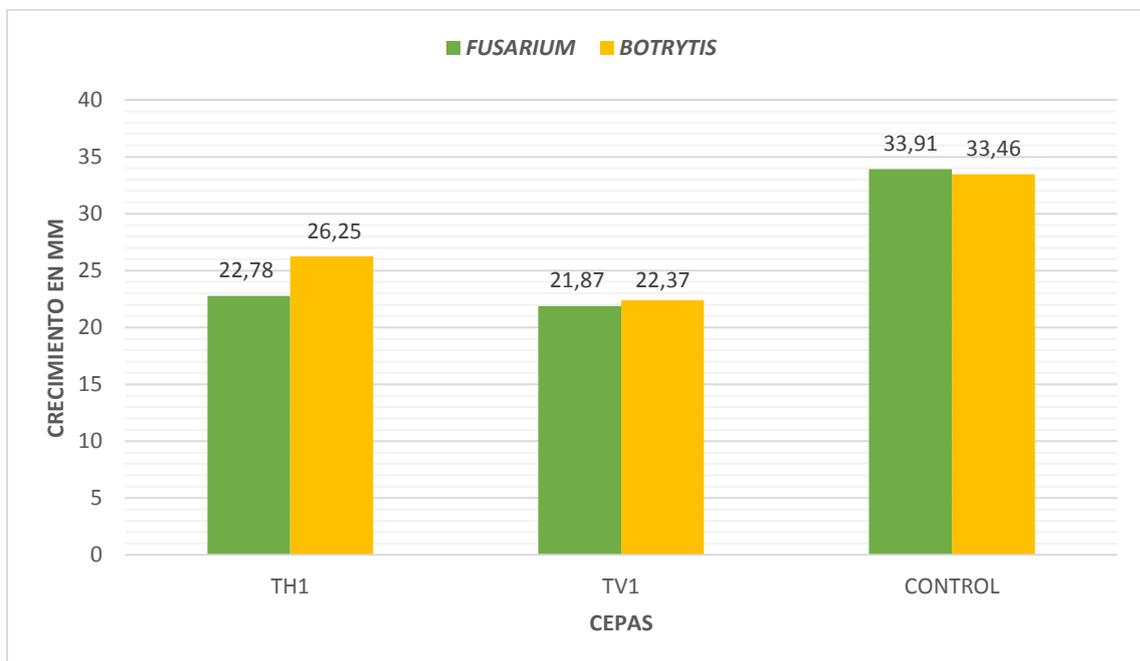


Figura 8. Crecimiento medio de las cepas fitopatógenas (*Fusarium* y *Botrytis*) enfrentadas a las cepas antagonistas tras 48 h de desarrollo.

Tal y como era de esperar, y como se ha descrito previamente (Suttong y Peng, 1993), el grado de reducción del crecimiento de los fitopatógenos fue menor, si bien se observaron diferencias entre los dos antagonistas. Así, tanto *Fusarium* como *Botrytis* mostraron un mayor grado de afectación por la acción de *Trichoderma viride*, hasta el punto de que los niveles de desarrollo en este caso fueron sólo ligeramente superiores a los detectados en el ensayo inicial.



Figura 9. Comparativa del crecimiento de *Fusarium* y *Botrytis* enfrentadas a las cepas antagonistas TH1 y TV1 tras 48 h de desarrollo.

La interpretación de los datos obtenidos se completó, al igual que en el caso del primer objetivo, con el estudio estadístico. Desde una perspectiva global, los tres factores analizados (cepa antagonista, tipo de experimento y tiempo) ejercieron influencia significativa sobre la variable en estudio, el grado de desarrollo de las especies fitopatógenas (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de los factores en estudio sobre el crecimiento de las especies fitopatógenas según el análisis de varianza ($P < 0.05$).

Cepa	Factor	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado de la media	F	P
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Antagonista</i>	6033.57	4	1508.39	27.27	0.0000
	<i>Experimento</i>	1306.31	1	1306.31	23.62	0.0000
	<i>Tiempo</i>	3046.48	6	507.747	9.18	0.0000
<i>Botrytis aclada</i>	<i>Antagonista</i>	1764.59	4	441.146	20.62	0.0000
	<i>Experimento</i>	434.571	1	434.571	20.32	0.0000
	<i>Tiempo</i>	14509.53	6	751.588	35.13	0.0000

El desglose de la influencia en función del nivel específico de cada uno de los factores analizados confirmó lo observado por el estudio de los datos crudos (Tabla 5). Así, y en lo que respecta a la identidad de la cepa antagonista

más eficiente, las variaciones existentes entre ellas no permitió el establecimiento de grupos de homogeneidad diferenciados. Tal hecho sólo fue posible entre en control y las cepas antagonistas. No obstante, los valores medios apuntan a un mejor control de las cepas de *Trichoderma viride* sobre *Fusarium* y de las de *Trichoderma harzianum* sobre *Botrytis*.

En el caso del factor Tipo de experimento, las diferencias generadas por ambos tipos de ensayo si dieron lugar a la creación de dos grupos de homogeneidad distintos, siendo el grado de desarrollo de ambos fitopatógenos significativamente inferior en los casos en los que sembraron simultáneamente con las especies antagonistas.

Finalmente, y en lo que respecta al factor Tiempo, las diferencias más acentuadas coincidieron con la primera mitad del ensayo, fase en la que si se pudieron establecer distintos grupos de homogeneidad, especialmente en el caso de *Botrytis*. Este resultado aconsejaría reducir el tiempo de duración del ensayo, dado que a partir del cuarto día, la respuesta del hongo fitopatógeno no varía de forma significativa.

Tabla 5. Test de rangos múltiples para la variable Crecimiento en función de los factores Antagonista, Experimento y Tiempo ($P < 0.05$).

Cepa	Factor	Media LS	Grupos homogéneos
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Antagonista</i>		
	TH1	21.1071	X
	TH2	20.8036	X
	TV1	20.5357	X
	TV2	19.0536	X
	CONTROL	33.9107	X
	<i>Experimento</i>		
	T0	20.9929	X
	T48	25.1714	X
	<i>Tiempo</i>		
	T1	6.9745	X
	T2	12.5578	XX
	T3	17.3078	XX
	T4	20.3912	XX
	T5	21.0023	XX
	T6	21.5856	X
	T7	22.2245	X

Tabla 5. Continuación

Cepa	Factor	Media LS	Grupos homogéneos
<i>Botrytis aclada</i>	<i>Antagonista</i>		
	TH1	20.3214	X
	TH2	20.8929	X
	TV1	21.1429	X
	TV2	22.4643	X
	CONTROL	33.4643	X
	<i>Experimento</i>		
	T0	20.6714	X
	T48	26.2429	X
	<i>Tiempo</i>		
	T1	10.0082	X
	T2	17.1867	X
	T3	23.2939	X
	T4	27.2582	X
	T5	28.0439	X
	T6	28.7939	X
	T7	29.6153	X

4. Conclusiones

1. Las características del medio PDA (Agar Dextrosa Patata) lo convierten, en comparación al medio AEM (Agar Extracto de Malta), en el más adecuado para el desarrollo de especies antagonistas pertenecientes al género *Trichoderma*.
2. *Trichoderma* agrupa un número importante de cepas con capacidad para actuar como agentes de control biológico frente a diversos microorganismos fitopatógenos de carácter fúngico.
3. El control de *Botrytis aclada* es ejercido con mayor eficacia por cepas de *Trichoderma harzianum*, mientras que las de *Trichoderma viride* resultan más eficaces para reducir el grado de crecimiento de *Fusarium oxysporum*.
4. El establecimiento previo de la especie fitopatógena dificulta la acción antagonista de los agentes de control biológico, por lo que la aplicación de estas especies probablemente resulte más eficaz como acción preventiva que paliativa.

5. Bibliografía

BAKER, R. (1987). Mycoparasitism: Ecology and physiology. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 9,370-379.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. Y CODÓN, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7, 249-260.

BETALLELUZ, V. M. (2003). *Control microbiológico de Phytophthora infestans en el tomate a través de hongos antagonistas bajo condiciones controladas*. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Peru.

CARSOLIO, C., GUTIERREZ, A. y JIMENEZ, B. (2000). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Proceeding of the National Academy of Science*. 91, 10903-10907.

CASIMIRO, A. (2001). *Cepas nativas de Trichoderma spp. euascomycetes: hypocreales, su antibiosis y micoparasitismo sobre fusarium subglutinans y f. oxysporum (hyphomycetes:hyphales)*. Universidad de Colima, México.

CHET, I., INBAR, J. y HADAR, I. (1998). Fungal antagonists and mycoparasites. *Environmental and Microbial Relationships*. 1, 165-184.

CRUZ, M. (2003). ¿Qué es exactamente la *Botrytis*?. *Chile Agrícola*. (Vol. 18). 185, 42-45.

EILENBERG, J., HAJEK, A.E., y LOMER, C. (2001): Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46, 387-400.

GRIFFIN, L. (1995). Battling the Blight. *In Goldenseal*. 21, 9-17.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*. 62, 1-20.

FRENCH, K. R. (1987). Expected stock returns and volatility. *Journal of Financial Economics*. 19, 3-29.

- HARMAN, G. E. (2001). *Trichoderma* spp. Including *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. *Deuteromycetes, moniliales*. 45, 22-29.
- INFANTE, D., MARTINEZ, B., GONZALEZ, N. y REYES, Y. (2009). Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección vegetal*. 24, 14-21.
- MONZÓN, A. y RODRIGUEZ, J, L. (2006). *Infecciones causadas por el género Fusarium*. Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.
- ORDÓNEZ, V.H. (2000). Producción de enzimas microbianas y sus aplicaciones en la industria. *Microbiología Industrial*. 25, 67-71.
- PÉREZ, N. (2004). *Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR*. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Cuba.
- SAMUELS, G.J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathol*. 96, 195-206.
- SIVAN, A. y CHET, I. (1989). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*. 79, 198-203.
- SUTTON, J. Y PENG, G. (1993). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*. 83, 615-621.
- VAN DRIESCHE, R.G., HODDLE, M.S. y CENTER, T.D. (2007). *Control de plagas y malezas por enemigos naturales*. USDA-USFS, Washington.
- ZHANG C., DRUZININA I., KUBICK C.P. XU y T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a north to southern distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiol*. 251, 251-257.