



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
POSTGRADO DE AGRONOMIA

**CARACTERIZACION Y EVALUACION DE AISLADOS DE *Trichoderma spp.*
PARA EL CONTROL DE LA PUDRICION BASAL DE LA LECHUGA CAUSADA
POR *Rhizoctonia spp.*, EN LA ZONA AGRÍCOLA DE TIMOTES, ESTADO
MÉRIDA.**

AUTOR: Ing. CARMEN YASMIN DOMINGUEZ BALLESTEROS

TUTOR: Dr. ASDRUBAL ARCIA

MARACAY, JUNIO 2012

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de Magister Scientiarum en Agronomía, orientación Protección Vegetal.

Dr, Asdrubal Arcia
Tutor

DEDICATORIA:

A Dios Todo Poderoso,
a mis padres Javier y Miriam
y mis hermanas, Yohana,
Yuleima y Yessica.

Los amo.

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios todo poderoso, por permitirme la vida y junto a ello lograr las metas trazadas.

A mis padres Javier Domínguez y Miriam Ballesteros, por su amor y por su apoyo incondicional y financiero. Siempre estuvieron allí cuando los necesite.

A mis adoradas hermanas Yohana, Yuleima y Yessica, gracias por su apoyo, amor y amistad. Que todos mis triunfos sean un gran ejemplo para ustedes.

Al Dr. Asdrubal Arcia, por su confianza, por su apoyo, amistad y cariño. Por permitir descubrirme como investigadora, como persona y como profesional.

A Teida Hurtado, por su gran apoyo y por sus conocimientos impartidos.

A Juan Aguilar por el apoyo brindado en Timotes.

Al Laboratorio de Expertabiol y al Postgrado de agronomía por permitirme formarme como profesional.

Y a todos aquellos amigos compañeros que me apoyaron durante la maestría.

A todos mil gracias!!!

CARACTERIZACION Y EVALUACION DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE LA PUDRICION BASAL DE LA LECHUGA CAUSADA POR *Rhizoctonia* spp, EN LA ZONA AGRÍCOLA DE TIMOTES, ESTADO MÉRIDA.

RESUMEN

La pudrición basal es una enfermedad causada por el hongo *Rhizoctonia* spp., la cual, afecta el cultivo de lechuga en la zona de Timotes y en otras partes del mundo. Se caracteriza por presentar pudrición en la base de la planta, el control es difícil debido a que el patógeno sobrevive en esclerocios por mucho tiempo, en el suelo. Sin embargo, el control biológico es una alternativa viable. *Trichoderma*, ha sido el biocontrolador mas estudiado para dicho patógeno, obteniendo resultados favorables. El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de EXPERTABIOL, en la Universidad Central de Venezuela. Se utilizaron 18 aislados de *Trichoderma* y uno de *Rhizoctonia* obtenidos de los suelos y de plantas enfermas respectivamente, de Timotes, estado Mérida. Se caracterizaron y evaluaron *in vitro* los aislados de *Trichoderma* y *Rhizoctonia*, se encontró que el agente causal de la pudrición basal de la lechuga, es *Rhizoctonia* spp.; también se, observó; micoparasitismo por penetración, enrollamiento, lisis, vacuolacion y crecimiento paralelo de las hifas de *Trichoderma* sobre el patógeno. La inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* se observó en 65% con el aislado T068. Todos los aislados de *Trichoderma* produjeron metabolitos volátiles y no volátiles logrando inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia* en 64 y 71 % respectivamente. Casi todos los aislados de *Trichoderma* presentaron grado competencia 4, haciéndolos promisorio para el control de *Rhizoctonia*. También se observó que *Trichoderma* es afectado por el crecimiento del patógeno, ya que se noto que algunos aislados disminuían su crecimiento y su potencial frente a *Rhizoctonia*. Se recomienda el uso de los aislados T068, T065, T063 y T059 para posteriores investigaciones, ya que fueron los mejores resultados en diferentes pruebas, y también prepararlos como biopreparados para el control de *Rhizoctonia*.

Palabras claves: pudrición basal, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, micoparasitismo, metabolitos.

CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ISOLATED *Trichoderma* spp. CONTROL OF BOTTOM ROT OF LETTUCE CAUSED BY *Rhizoctonia* spp, ZONE AGRICULTURAL TIMOTES, MERIDA.

ABSTRACT

Bottom rot is caused by the fungus *Rhizoctonia* spp. and is a disease of lettuce in the area Timotes in different parts of the world, is characterized by rotting at the base of the plant, control is difficult because the pathogen remains in sclerotia for long. But biological control is an alternative. *Trichoderma*, biocontrol is the most studied for this pathogen, favorable results. The project was conducted in the laboratory of EXPERTABIOL, Central University of Venezuela. We used 18 isolates of *Trichoderma* and one of *Rhizoctonia* obtained from soil and infected plants respectively Timotes. Were described and evaluated in vitro isolates of *Trichoderma* and *Rhizoctonia* was found that the causal agent of basal rot is *Rhizoctonia* spp. Also noted; mycoparasitism by; penetration, rolling, lysis, vacuolation and parallel growth of hyphae *Trichoderma* on the pathogen. Inhibition of growth of *Rhizoctonia* was observed in 65% with the isolate T068. All isolates were *Trichoderma* volatile and nonvolatile metabolites inhibit the growth achieved in 64 of *Rhizoctonia* and 71% respectively. Almost all isolates of *Trichoderma* presented grade 4 competition, making them promising for control of *Rhizoctonia*. Also observed that *Trichoderma* is affected by the growth of the pathogen, as it was noted that some isolates decreased their growth and their potential against *Rhizoctonia*. The use of isolates T068, T065, T063 and T059 for further investigation, as were those who gave the best results in different tests, and prepare them as bio-preparations for control of *Rhizoctonia*.

Key words: Bottom rot, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, mycoparasitism, metabolites.

CONTENIDO

	Pagina
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo General.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
III. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	18
3.1 <i>Trichoderma</i> spp. COMO ANTAGONISTA	18
3.1.1 Características.....	18
3.1.2 <i>Trichoderma</i> sp. como controlador de <i>Rhizoctonia</i> spp	21
3.2 <i>Pudrición basal de la lechuga causada por Rhizoctonia</i> spp.....	21
3.2.1 Síntomas de la enfermedad.....	23
3.2.2 Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad.....	24
3.2.3 Patogénesis de la enfermedad.....	24
3.2.4 Control.....	25
3.3 <i>La lechuga</i>	26
IV MATERIALES Y METODOS.....	30
4.1 <i>Aislamiento de Rhizoctonia</i> sp proveniente de tejido vegetal de lechuga.....	30
4.2 Identificación de <i>Rhizoctonia</i>	30
4.2.1 Crecimiento y caracterización hifal y morfológica.....	30

4.3 Prueba de patogenicidad de <i>Rhizoctonia solani</i>	31
4.3.1. Pruebas en hojas.....	31
4.3.2 Pruebas en plantas.....	31
4.4 Caracterización de aislados de <i>Trichoderma</i>	32
4.4.1 Aislados de <i>Trichoderma</i> estudiados.....	32
4.4.2 Caracterización.....	33
4.4.2.1 Caracterización macroscópica.....	33
4.4.2.2 Caracterización microscópica.....	33
4.5 Evaluación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Rhizoctonia</i> spp.....	34
4.5.1 Velocidad de crecimiento.....	34
4.5.2 Capacidad de esporulación.....	34
4.5.3 Prueba de enfrentamiento.....	35
4.5.3.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> spp. (PIC).....	35
4.5.4 Prueba de competencia.....	35
4.5.5 Prueba de antibiosis.....	36
4.5.5.1 Efecto de metabolitos volátiles.....	36
4.5.5.2 Efecto de metabolitos no volátil.....	36
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1 Aislamiento e identificación de <i>Rhizoctonia</i> sp.....	38
5.2 Prueba de patogenicidad de <i>Rhizoctonia solani</i>	39
5.2.1 Pruebas en hojas.....	39
5.2.2 Pruebas en plántas.....	41
5.3 Caracterización de aislados de <i>Trichoderma</i>	42
5.4 Evaluación <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Rhizoctonia</i> spp.....	47

5.4.1	<i>Velocidad de crecimiento</i>	47
5.4.2	Capacidad de esporulación.....	49
5.4.3	Pruebas de enfrentamiento.....	50
	5.4.3.1 <i>Interacción hifal</i>	50
	5.4.3.2 <i>Evaluación macroscópica</i>	53
5.4.4	<i>Pruebas de competencia</i>	56
	5.4.4.1 <i>Inhibición del crecimiento de Rhizoctonia frente a Trichoderma</i>	58
	5.4.4.2 <i>Crecimiento de Trichoderma frente a Rhizoctonia</i>	59
5.4.5	Pruebas de antibiosis.....	60
	5.4.5.1 <i>Efecto de metabolitos volátiles</i>	60
	5.4.5.2 <i>Efecto de metabolitos no volátiles</i>	63
VI	CONCLUSIONES.....	66
VII	RECOMENDACIONES.....	68
VIII	BIBLIOGRAFÍA.....	69
IX	ANEXOS.....	80

INDICE DE CUADROS

CUADRO	Página
1. Composición nutritiva de la lechuga (por 100 g de parte comestible).....	27
2. Plagas y enfermedades de la lechuga.....	29
3. Aislados de <i>Trichoderma</i> a evaluar en la investigación.....	33
4. Escala para medir competencia de <i>Trichoderma</i>	36
5. Características macro y microscópicas de 18 aislados de <i>Trichoderma</i> sp.....	42
6. Velocidad de crecimiento de los 19 aislados de <i>Trichoderma</i>	51
7. Capacidad de esporulación de los aislados de <i>Trichoderma</i>	49
8. Interacción entre las hifas de <i>Trichoderma</i> spp y <i>R. solani</i>	48
9. Cambios y alteraciones en el micelio y medio de cultivo en los enfrentamientos de <i>Trichoderma</i> y <i>Rhizoctonia</i>	54
10. Días de contacto, sobrecrecimiento y esporulación de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Rhizoctonia</i>	55
11. Capacidad competitiva de los aislados de <i>Trichoderma</i> con <i>Rhizoctonia</i>	57
12. Inhibición de crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> por efecto de <i>Trichoderma</i>	59
13. Inhibición del crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> por efecto de metabolitos volátiles producidos por <i>Trichoderma</i>	62
14. Prueba de medias para la inhibición de crecimiento de <i>Rhizoctonia</i> por efecto de metabolitos no volátiles producidos por <i>Trichoderma</i>	64

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Plantas con síntomas de pudrición basal.....	30
2. Pruebas en hojas	31
3. Pruebas en plántulas. A. Plántulas inoculadas. B. Disco de <i>Rhizoctonia</i>	32
4. Microcultivos de <i>Trichoderma</i>	34
5. Características de la colonia de <i>Rhizoctonia</i> . A. Colonia joven y B. Colonia madura.....	38
6. Esclerocios de <i>Rhizoctonia</i> . A. Formación de los esclerocios y B. Esclerocios maduros.....	38
7. Constricción del micelio y ángulo recto en las hifas de <i>Rhizoctonia</i> . A. Hifas hialinas jóvenes. B. Hifas marrón claras maduras.....	39
8. A y B. Hojas de lechuga inoculada con discos de micelio de <i>Rhizoctonia</i> . C. Lechuga testigo.....	40
9. A y B. Síntomas en hojas de lechuga americana y romana. C. Lechuga sana (testigo).....	40
10. A. <i>Rhizoctonia</i> en medio de cultivo. B. Micelio de <i>Rhizoctonia</i> (aislados de las hojas inoculadas).....	40
11. Síntomas en plantas de lechuga causadas por <i>Rhizoctonia</i> . A. Primeros síntomas a los 15 DDI. B. Crecimiento del micelio en el tallo de la planta. C. Comparación de plantas inoculadas con plantas testigos.....	41
12. A. <i>Rhizoctonia</i> en medio de cultivo. B. Micelio de <i>Rhizoctonia</i> aislados de plantas inoculadas con <i>Rhizoctonia</i>	41
13. Caracterización macroscópica de los aislados de <i>Trichoderma</i>	46

14. Características microscópicas de los diferentes aislados de Trichoderma. A, B, C y D. Conidióforos y fiálides. E, F, G y H. Conidios. I, J, K y L. Clamidosporas.....	47
15. A y B. Esporulación abundante (T057 y T060); C y D. Esporulación muy abundante (T001 y T067).....	49
16. Interacción hifal por enrollamiento de las hifas de Trichoderma sobre Rhizoctonia. A. T066; B. T067; C. T068.....	51
17. Interacción hifal por penetración de hifas de Trichoderma en hifas de Rhizoctonia. A. T001; B. T059; C. T062; D. T068	52
18. Interacción hifal por crecimiento paralelo de las hifas de Rhizoctonia y Trichoderma. A. Aislado T019 y B. Aislado T063.....	52
19. Interacción hifal por lisis a las hifas de Rhizoctonia por efecto de Trichoderma. A. T054; B. T056; C. T057; D. T063.....	52
20. Evaluación macroscópica. Cambio de color en la zona de contacto entre las hifas de Trichoderma y Rhizoctonia.....	56
21. Evaluación macroscópica. A. No esporulación sobre el patógeno. B. Esporulación sobre el patógeno.....	56
22. Tipos de capacidad competitiva de los aislados de Trichoderma sobre Rhizoctonia. A. 4; B. 3; C. 2; D. 1; E. 0.....	56
23. Tipos de capacidad competitiva de los aislados de Trichoderma sobre Rhizoctonia. A. 4; B. 3; C. 2; D. 1; E. 0.....	58
24. Porcentaje de inhibición de crecimiento de Rhizoctonia frente a Trichoderma. A. Aislado T068 (65.1%); B. Aislado T057 (37.8) y C. Aislado de Rhizoctonia (testigo)...	59
25. Crecimiento de Trichoderma en cultivos duales y solo.....	60
26. Porcentaje de inhibición de crecimiento de Rhizoctonia por el efecto de metabolitos volátiles de Trichoderma. A. Aislado T064 (64.1%), B. Aislado T057	

(25.6%) y C. Testigo de Rhizoctonia.....	62
27. Hifas de Rhizoctonia afectadas por los metabolitos volátiles producidos por Trichoderma.....	62
28. Crecimiento de Trichoderma en presencia de Rhizocotnia y solo.....	63
29. Efecto inhibitorio del crecimiento de Rhizoctonia mediante metabolitos no volátiles producidos por Trichoderma. A. Efecto de metabolitos producidos por el aislado T063, B. Efecto de metabolitos producidos por el aislado T019 y C. Crecimiento del testigo de Rhizoctonia.....	64
30. Hifas de Rhizoctonia afectadas por los metabolitos no volátiles producidos por Trichoderma.....	64

I. INTRODUCCION

La pudrición basal causada por el hongo patogénico *Rhizoctonia spp.* es una enfermedad que afecta la lechuga, este hongo es un patógeno de suelo importante a nivel mundial, ya que se puede encontrar en casi todos los tipos de suelo incluso en suelos vírgenes y afecta a una gran variedad de cultivos hortícolas.

En la zona de Timotes del Estado Mérida, esta enfermedad ocasiona severos daños en el cultivo de la lechuga, comúnmente produce pudrición de la base que comienza con manchas marrones en los folíolos de las hojas y de allí a penetra en la planta (Aguilar y Arcia, 2009, Kuepper *et al.*, 2004; Pernezny y Raid, 2006 y Agronews, 2006).

En la actualidad existen medidas utilizadas para el control de dicha enfermedad, como lo son el uso de productos químicos y prácticas culturales. Sin embargo el control mediante estas medidas se puede ver restringido por problemas económicos y ecológicos, además el uso excesivo de fungicidas puede causar resistencia por parte del patógeno.

Trichoderma es un microorganismo muy estudiado como agente biocontrolador de fitopatógenos y se encuentra presente en casi todos los suelos, especialmente en los que contienen abundante materia orgánica, lo que lo hace un excelente sustituto para disminuir el uso de productos químicos en el control de enfermedades producidas por hongos de suelo.

El uso de *Trichoderma* ha sido estudiado en los últimos años por varios investigadores y se han realizados muchos trabajos, para probar la capacidad antagónica del género *Trichoderma* sobre patógenos de suelo especialmente sobre *Rhizoctonia* (Acevedo, 1995; Beltrán y Graces, 2000; Benhamaou y Chet., 1993; Elad *et al.*, 1983; Perez *et al.*, 2005; Strashonow *et al.*, 1985; Soares, 2000; Michel, 2001 y Ochoa, 2002).

Todos los aislados de *Trichoderma* no presentan la misma capacidad antagónica sobre hongos patógenos de plantas, ya que esta habilidad depende de la especificidad de cada aislado, por ello se hace necesario que en el presente trabajo se caractericen y evalúen diferentes aislados de *Trichoderma* provenientes de suelos de la zona agrícola de Timotes, estado Mérida, para ser usadas como posibles controladores de la pudrición basal de la lechuga producida por *Rhizoctonia spp.*

II. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y evaluar aislados de *Trichoderma* spp. para el control de la pudrición basal de la lechuga causada por *Rhizoctonia* spp, en la zona agrícola de Timotes, estado Mérida.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar aislados de *Trichoderma*.
- Aislar, caracterizar e identificar el agente causal de la pudrición basal de la lechuga
- Realizar pruebas de patogenicidad con el aislamiento de *Rhizoctonia* obtenido desde plantas de lechuga enfermas.
- Evaluar el efecto *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* spp.

III. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFICA

3.1 *Trichoderma* spp. COMO ANTAGONISTA

Trichoderma es un hongo que se encuentra libre en el suelo y es altamente interactivo con la raíz de las plantas, se caracteriza por un comportamiento saprofito o parásito. Diferentes aislados de *Trichoderma* han sido reconocidos como agentes de control biológico de diferentes enfermedades de las plantas. El éxito de *Trichoderma* se debe a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizosfera, eficiencia en la productividad de los cultivos e inducción de los mecanismos de defensa de las plantas. (Ranasingh et al., 2006 y Benitez et al., 2004).

Trichoderma se ubica dentro del Reino Fungi, División Mycota, Sub división Eumycota, Clase Deuteromycetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae, Género *Trichoderma*, con unas 27 especies conocidas, entre ellas se tiene: *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. polysporum*, *T. reesei*, *T. virens*, *T. longibrachatum*, *T. parceromosum*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. lignorum* y *T. citroviride*. (Villegas, 2002)

Según Index Fungorum (2006), *Trichoderma* es el anamófo de *Hypocrea*: Reino: Fungi; Phylum: Ascomycota; Clase: Ascomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Hypocreaceae, Genero: *Hypocrea*

3.1.1 Características

El género *Trichoderma* se caracteriza por presentar conidióforos hialinos muy ramificados no verticilados, individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoide, nacidos en pequeños racimos terminales, los conidios son globosos o subglobosos, elipsoidales u oblongo, menores de 5µm de largo y ancho, de color verde oscuro profundo cercano a gris pasando a verde y verde amarillo. Los conidióforos no son bien definidos y los conidios tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas, los agregados formados de hifas entrelazadas producen fiálides. Presentan clamidosporas las cuales pueden ser globosas o subglobosas, terminales o intercalares, de color verde y menores a 15µm de diámetro. La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa, el micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino (Barnett y Hunter, citados por Michel, 2001 y Samuels, 1996). La

mayoría de las especies se reproducen por esporas asexuales, ya que no presentan reproducción sexual. En algunos casos se conoce la fase sexual, pero dentro de éstas no se encuentran especies que se consideren como controladores biológicos (Harman, 2000).

La capacidad antagónica de *Trichoderma*, está basada probablemente por su estilo saprofítico, sin embargo se han descrito diferentes mecanismos de biocontrol, que lo hacen un candidato especial para el control de hongos patógenos de suelo, ya que los ataca y se nutre de ellos. *Trichoderma* ha evolucionado y tiene nuevos mecanismos de biocontrol y hay varios genes involucrados en el proceso. Algunos de los mecanismos son: micoparasitismo, hiperparasitismo, antagonismo por antibiosis, competencia por nutrientes, solubilización y segregación de sustancias inorgánicas, inducción de resistencia (Harman, 2000; Benítez *et al.*, 2004).

El biocontrol por **competencia**, consiste como su nombre lo indica, en competir por sustrato y nutrientes, este proceso ocurre cuando dos o más organismos requieren un mismo recurso, la competencia fundamentalmente se produce por recursos esenciales tales como carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico, *Trichoderma* tiene una capacidad superior de movilizar y extraer nutrientes del suelo comparado con otros microorganismos (Harman, 2000; Howell *et al.*, 2000; Benitez *et. al.* (2004). Harman *et al.* (2008) describen que la habilidad presentada por *Trichoderma* como controlador de enfermedades en las plantas, se atribuye, básicamente a la habilidad que posee para competir con los patógenos en el suelo, más que en su habilidad por controlar dichos patógenos.

La **antibiosis**, es la inhibición o destrucción de un organismo por un producto metabólico de otro (Cook y Baker, 1983) y ocurre durante la interacción de compuestos de bajo peso molecular o producción de antibióticos por *Trichoderma* que inhibe el crecimiento de otros microorganismos. La mayoría de las especies de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de otros hongos, tales como viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide (Benitez *et al.*, 2004; Howell *et al.*, 2000). Gliotoxin producido por *T. virens*, afecta el crecimiento micelial de *R. solani* y Gloviridin inhibe el crecimiento de *Pythium*, *Phytophthora*, pero no sobre *R. solani* (Howell *et al.*, 2003).

Dentro de los metabolitos producidos por *Trichoderma* el 6PAP (6-amil- α -pirona) es el más conocido y estudiado, esto debido a su potente actividad anti fúngica. La habilidad de las cepas para producirlo es muy variada entre ellas, aun entre cepas de la misma especie (Cutler *et al.*; Conney y Lauren, citados por Michel, 2001). Este metabolito ha demostrado ser

muy eficiente contra hongos como: *Armillaria*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *R. solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersicom*, en estos dos últimos logró 69.6% y 31.7% de inhibición respectivamente (Scarselletti y Faull, 1994).

El **hiperparasitismo**, es el mecanismo más frecuente ejercido por *Trichoderma*, en el cual su micelio crece y se desarrolla dentro de las hifas del patógeno, desintegrando su protoplasma e impidiendo su desarrollo y reproducción (Elad et al., 1983; Benhamaou y Chet, 1993). De igual forma, el **micoparasitismo**, es un mecanismo muy frecuente, ya que la hifas de *Trichoderma* atacan directamente al otro hongo, es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluyendo reconocimiento, ataque, penetración y muerte (Benítez et al, 2004 y Bruce at al., citados por Michel, 2001). *Trichoderma* puede ejercer un biocontrol directo por parasitismo en un rango de hongos. El modelo de inducción difiere de una especie de *Trichoderma* a otra. El micoparasitismo involucra cambios morfológicos en *Trichoderma*, ya que tiene que formar estructuras llamadas apresorios, las cuales penetran en el hospedero y contienen alta concentración de solutos osmóticos como glicerol. *Trichoderma* ataca los carbohidratos de la pared celular de los patógenos (Benítez et al., 2004).

En *R. solani* ocurre generalmente un enrollamiento muy denso, el cual aparece envolviendo apretadamente las hifas de dicho hongo, después de cuatro días, *Trichoderma* se multiplica abundantemente y el enrollamiento persiste y se observa deformaciones, tales como unas aparentes arrugas en las células de la superficie del hospedero, así como deformaciones y pérdidas de turgencia de las hifas del patógeno. (Belanger et al., citado por Ochoa, 2002).

Trichoderma no sólo actúa directo sobre el patógeno, sino que también produce un efecto en las plantas sin causar daño a la misma, produciendo un efecto de **inducción de resistencia**, en la cual, protege a las plantas contra patógenos de la raíz, este mecanismo es atribuido al efecto que gana al invadir patógenos. Sin embargo, estos hongos de raíz también simulan mecanismos de defensa en las plantas. Las cepas de *Trichoderma* añaden protección a la rizosfera de las plantas contra numerosas clases de patógenos, incluyendo enfermedades virales o por bacterias. *Trichoderma* produce un mecanismo de resistencia similar a la respuesta de hipersensibilidad, resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida en plantas (Benítez et al., 2004).

3.1.2 *Trichoderma* sp. como controlador de *Rhizoctonia* spp.

El control de *Rhizoctonia* se ha basado en el uso de productos químicos, sin embargo desde hace varios años el uso de *Trichoderma* ha sido efectivo para el control de dicho patógeno. El biocontrol por parte de *Trichoderma* ha sido demostrado por su capacidad competitiva frente a agentes causales de pudriciones radicales y marchitamientos como *Rhizoctonia* y *Sclerotinia* sp. en arroz, flores, papa y frutales. Beltrán y Garcés (2000), evaluaron el potencial biocontrolador de diez cepas nativas del hongo *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* en el cultivo de papa; aunque no se logró disminuir la incidencia de la enfermedad, los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados permitieron reducir el daño en las plantas, observando mayor vigor, tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical. Sin embargo, Soares y Full (2000), encontraron la reducción del 79% del crecimiento micelial y 89% de la viabilidad de los esclerocios de *Rhizoctonia*, mediante la producción de metabolitos tóxicos, de igual forma observaron que *Trichoderma* penetró de forma mecánica y posteriormente destruyó las hifas. Rincón *et al.* (1992), observaron un control del 55% de *Rhizoctonia* con la cepa T-1644, en semilleros de arroz. Evaluaron, micoparasitismo, competencia *in vitro* y extractos de metabolitos. Por otra parte, Pérez *et al.* (2005), evaluaron la efectividad *in vitro* de *T. harzianum* para el biocontrol de *R. solani* y *Pyricularia grisea* en arroz, donde demostraron la alta actividad hiperparásita del patógeno y la competitividad de *Trichoderma* sobre estos patógenos; de igual forma Reyes *et al.* (2008), encontraron que el 100 % de los aislamientos evaluados presentaban una alta capacidad antagónica sobre *Rhizoctonia*, con diferentes tipos de interacción hifal, tales como lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración. Dal *et al.* (1997), estudiaron el efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos del suelo, observando que *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia minor* no fueron afectados, mientras que *Alternaria citri* fue la única especie cuyo desarrollo fue estimulado. En cuanto a crecimiento y coloración micelial, *R. solani* y *A. citri* conservaron su coloración pero se vio afectado su crecimiento. Sin embargo, *Sclerotium rolfsii* y *S. minor* no formaron esclerocios.

3.2 Pudrición basal de la lechuga causada por *Rhizoctonia* spp.

Rhizoctonia sp. causa serias pérdidas económicas a nivel mundial, tal es el caso del estado de Arizona en E.U.A. y algunos países Europeos (Kerns *et al.*, 1999). Es un hongo muy destructivo y posee una distribución muy amplia, probablemente se encuentren todo el mundo

(Rankin, 1986), se ha aislado desde suelos cultivados hasta en suelos vírgenes. Estos son algunos de los países donde se encuentra distribuido el patógeno: Australia, Barbados, Bolivia, Brasil, Canadá, Colombia, Costa de Marfil, Costa Rica, Cuba, China, Estados Unidos, Etiopía, Filipinas, Guyana, Honduras, India, Indonesia, Irán, Israel, Jamaica, Japón, Kenya, Madagascar, Malasia: Malasia, Martinica, Mauricio, Mozambique, Nigeria, Nueva Guinea, Perú, Puerto Rico, Reino Unido, Corea, República Dominicana, Ruanda, San Cristóbal y Nievis, Tanzania, Trinidad y Tobago, Venezuela, Vietnam, Zaire, Zambia, Zimbawe. (ICA, s.f.). Müller (1941), encontró que *Rhizoctonia solani* es causante de una de las enfermedades mas importantes en algunas zonas hortícolas de Venezuela productoras de lechuga. Aguilar y Arcia, (2009), encontraron que las plantas de lechuga producidas en la zona de Timotes del estado Mérida, se encontraban afectadas por dicho patógeno.

El hongo *Rhizoctonia* es un Teleomorfo, fase asexual del *Thanatephorus* (Allen et al., 1998) y pertenece a la Sub división Basidiomycota, Clase Hymenomycetes, Orden Aphyllophorales y del Género *Thanatephorus*. Este hongo era considerado como estéril ya que durante muchos años se creyó que era incapaz de producir algún tipo de espora, ya fuera sexual o asexual. Actualmente se sabe que alguna de las especies de este género produce esporas sexuales (basidiocarpos) y otros asexuales (conidios) (Allen et al., 1998; Agrios, 1995).

Los basidios presentan forma de barril y se forman sobre una capa membranosa de micelio y tienen cuatro esquinas, las cuales llevan una basidiospora de forma ovoide y los conidios se distinguen principalmente por sus características vegetativas, el micelio es hialino en su etapa juvenil pero se torna amarillo o de color café claro cuando madura, tiene ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto al micelio principal y esta característica es casi el único medio morfológico para identificar a *Rhizoctonia*, algunas especies producen esclerocios de color café o negros (Agrios, 1995).

Pocas veces *Rhizoctonia* produce su estado perfecto o sexual en la naturaleza y cuando lo hace se puede presentar como un aspecto de mildiu fino que se desarrolla sobre el suelo y los tallos infectados que se encuentren por arriba de la superficie del suelo (Agrios, 1995). En algunas ocasiones en condiciones especiales el hongo produce ramilletes de células cortas, anchas, de forma oval o triangular que pueden confundirse con esclerocios, éstas funcionan como clamidosporas (Agrios, 1995).

Una de las características importantes que presenta es la habilidad para fusionar sus hifas (anastomosis); Sneh et al., (1991) describen que existen tres tipos de fusión: **Fusión**

perfecta, la cual incluye una completa fusión de la pared celular y el citoplasma en el sitio de fusión y ocurre en aislamientos comunes. **Fusión imperfecta**; ocurre entre aislamientos diferentes y usualmente resulta una plasmolisis. **Fusión contacto**; en la que se observa contacto entre hifas sin ocurrir lisis de la pared celular en el sitio de contacto, sin embargo; no se considera anastomosis.

Los grupos de anastomosis (AG) se diferencian; morfológica y fisiológicamente en rangos e hospederos, por requerimientos nutricionales, por características bioquímicas, moleculares y secuencias de ADN, habiéndose descrito y caracterizado al menos 14 AG, los cuales son; AG-1, AG-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-8, AG-9, AG-10, AG-11, AG-12 y AG-13, AG-BI. AG-BI es un grupo reciente y se cree que puede ser un sub-grupo de AG-2 (Carling *et al.* 2002(a); Carling *et al.* 2002(b) y Yildiz y Timur, 2002).

Los grupos AG-3, AG-4, AG-5, AG-7 están relacionados con solanáceas especialmente causando daños en papa, sin embargo, AG-3, AG-4 son los más patogénicos (Rousell y Crosnier, 1999). AG-8 afecta a la cebada y AG-9 fue señalado causando daños en las raíces de lechuga y zanahoria (Rousell y Crosnier, 1999). AG-2 afecta a la remolacha azucarera (Stojisin *et al.*, 2007). AG-1, AG-2 Y AG-4, se han encontrado afectando caraota (Gutiérrez *et al.*, 2006).

3.2.1 Síntomas de la enfermedad.

Los primeros síntomas se observan en la vena central de las hojas donde se desarrollan pequeñas áreas necróticas, húmedas, hundidas de color marrón al final de la vena. Las hojas afectadas se ven marchitas, amarillas y al final mueren, el patógeno progresa hacia el interior de la planta formando lesiones que pueden ser superficiales o algunas más profundas que se extienden hacia la parte central de tallo o de la raíz pudriéndolos y provocando la caída completa de la planta (Pernezny y Raid, 2005; Allen *et al.*, 1998; Agronews, 2006; Agrios, 1995).

Las plantas más afectadas son las que se encuentran en plena maduración ya que las hojas de la base se encuentran en contacto con el suelo y los esclerocios se pueden observar de color marrón en las axilas de las hojas (Agronews, 2006; Inglis *et al.*, 2000).

Es frecuente que en los tejidos afectados se encuentren bacterias que producen putrefacción viscosa que puede causar lesiones adicionales; también se puede encontrar un área

profunda llena de las partes secas de la planta mezclados con los esclerocios y micelio del hongo (Kerns *et al.*, 1999, Inglis *et al.*, 2000; Agrios, 1995).

Síntomas de la enfermedad en otras especies vegetales

En **papa**, las plantas enfermas presentan el follaje como roseta y desarrollan tubérculos aéreos, las hojas presentan clorosis marginal, color morado a púrpura y se doblan hacia el haz, los tallos, estolones y raíces presentan lesiones tipo cáncer. Los tubérculos se observan deformes, agrietados y con esclerocios en la superficie. (Cedeño, *et al.*, 2001; Agrios, 1995).

En **caroata** produce la pudrición radical y es una de las enfermedades más comunes en este cultivo, se presentan manchas cóncavas pardo-rojizo de varias formas y tamaño (Gutiérrez *et al.*, 2006).

En el **arroz** y otros **cereales**, produce grandes lesiones irregulares en las que su parte central es de color paja y sus bordes amplios pardos rojizos (Agrios, 1995).

El damping off ocurre en varias plantas tales como en **café** y **alfalfa**. Cuando el ataque es temprano la plántula no emerge ya que el hongo causa daño al embrión. En el cafeto cuando el ataque ocurre en la chapola y en la alfalfa en la etapa de plántula, el tallo presenta una pequeña mancha oscura, húmeda y hundida y los síntomas progresan hasta producir el volcamiento y la muerte de la plántula (Castro y Rivillas, 2005; Cedeño *et al.*, 2001).

3.2.2 Efectos del ambiente sobre el desarrollo de la enfermedad

Los suelos secos favorecen al patógeno permitiéndole que se mantenga por más tiempo y haciendo así más severa la enfermedad (Agrios, 1995), al igual cuando se presenta baja humedad y bajo condiciones calientes o de verano (Valenzuela, s.f.). A temperaturas de 25°C a 30°C los síntomas se manifiestan en un mes y de 20°C a 25°C se manifiestan en 3 a 4 meses y la enfermedad es más grave en los períodos en que la temperatura media del día está por encima de 20°C y el mínimo diario por encima de 10 °C (Kerns *et al.*, 1999; y Caletine, 2001).

3.2.3 Patogénesis de la enfermedad

Rhizoctonia sp. es un parásito facultativo que puede sobrevivir saprofiticamente por largos periodos de tiempo y se mantiene como micelio estéril o esclerocios en la materia orgánica, suelo, semilla o plantas hospederas; una vez que se encuentra presente en el suelo se

establece y permanece por períodos de tiempo indefinido (Agrios, 1995; Allen y Lenne, 1998). Su propagación puede ser por el agua de lluvia y de riego, así como por los órganos de propagación infectados (Agrios, 1995 y Rankin, 1986). Penetra a la hoja de la lechuga directamente por los estomas y el desarrollo de la enfermedad y de los síntomas está influenciado por la temperatura del suelo. (Kerns *et. al.*, 1999; y Caletine, 2000).

3.2.4 Control

El control de la enfermedad es muy difícil debido a la duración que puede llegar a tener el patógeno en el suelo (Allen y Lenne, 1998), este depende mucho de la semilla y del suelo, para ello se necesitan semillas libres del hongo y suelos bien desinfectados (Agrios, 1995). Para el control de dicha enfermedad existen diferentes métodos: Control **químico**, para ello se dispone de fungicidas eficaces, sin embargo; dicloran y ferbam son aplicados en aspersión sobre el suelo antes de la siembra y de una a dos veces sobre la plántula después de la emergencia (Agrios, 1995). Kerns *et al.*, (1999) y Agnew (2000), recomiendan los fungicidas usados en alfalfa tales como Iprodione y Vinclozolin, estos deben ser aplicados justo después de la siembra o en el trasplante para reducir al máximo la actividad del patógeno. El control **físico** es recomendado en semilleros o en cultivos bajo invernadero, el cual consiste en esterilizar el suelo mediante la aplicación de vapor o de algún compuesto químico recomendado para este tipo de esterilización (Agrios, 1995). En el control **biológico** *Trichoderma* es el agente controlador más efectivo para *R. solani* así como para *Sclerotium rolfsii* (Elad *et al.* citado por Strashnow *et al.*, 1985) y múltiples investigaciones se han realizado sobre este tema, al igual que las **bacterias antagonistas**, que han sido utilizadas en investigaciones para el control de dicho patógeno como es el caso del de *Bacillus subtilis* (Fiddaman y Rossall, 1995). Algunas otras bacterias como *Pseudomonas fluorescens* han sido estudiadas para determinar su poder antagonista en el control de *R. solani* en lechuga y papa, donde se pudo observar que el desarrollo del patógeno se logró reprimir en 52% en el caso de la lechuga y en la papa redujo 37%. (Grosch *et al.*, 2005). Bautista *et al.* (2007), evaluaron la capacidad de diferentes aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*, para el biocontrol de *R. solani* en papas nativas (*Solanum phureja*), encontrando que esta bacteria puede ser una alternativa para el control de dicha enfermedad.

El control **cultural** depende estrictamente de la limpieza del cultivo. Almodóvar (1998), recomienda la eliminación de los restos de cosecha y de los residuos de plantas afectadas de los surcos. El arado profundo del terreno es otra práctica recomendada ya que a su vez

remueve los restos de cosecha y los esclerocios del patógeno (Pernezny y Raid, 2005) y mejorar los canales de drenaje (Agrios, 1995). Otra alternativa dentro del control o manejo cultural de la enfermedad es la rotación de cultivos para reducir la población del patógeno en el suelo (Valenzuela, s.f.) La siembra debe hacerse a una distancia entre surcos de 0.50 m y 0.20 entre plantas, de modo que la planta tenga una buena aireación de la superficie del suelo y de la planta (Agrios, 1995).

3.3 LA LECHUGA

La lechuga (*Lactuca sativa* L) es la hortaliza más utilizada para la preparación de ensaladas y siempre se ha considerado como una planta de propiedades tranquilizantes y su alto contenido en vitaminas la hace una planta muy importante en la dieta moderna (Mallar, 1978 y Maroto, 2000). En el cuadro 1 se observa su valor nutritivo. Esta planta pertenece al Reino Plantae; Familia Asteracea; Género *Lactuca* y Especie: *sativa*.

Se cree que la lechuga es originaria de las costas del sur y sureste del Mar Mediterráneo, desde Egipto hasta Asia Menor. Los egipcios la comenzaron a usar hace unos 2400 años y posiblemente para extraer aceites de la semilla y para forraje. De Egipto paso a Grecia y a Roma, rápidamente se difundió por toda Europa y llego a América en 1494, a dos años del primer viaje de Colon a este continente (Mallar, 1978).

Existe una teoría sobre el origen de la lechuga, la cual sostiene que la lechuga cultivada se originó de *Lactuca serriola*, con la cual se cruza fácilmente y da híbridos altamente fértiles; el polimorfismo de *L. sativa* debería ser entonces el resultado de mutaciones que se fueron acumulando por selección natural (Mallar, 1978).

Lindquist, citado por Mallar (1978), confirma que esta teoría es cierta cuando se trata de caracteres controlados por genes recesivos y que constituyen una ventaja en las formas cultivadas, pero que es más difícil cuando se tratan de caracteres controlados por genes dominantes y que constituyen una ventaja para el cultivo, sin embargo concluye que es mas acertada la teoría de que la lechuga tuvo su origen por hibridación entre diferentes especies y por evolución de estas líneas.

Cuadro 1. Composición nutritiva de la lechuga (por 100 g de parte comestible)

Composición	Hojas Crispas	Hojas Lisas	Romanas
Agua (%)	95	96	94
Proteínas (g)	0,8	1,2	1,6
Grasa (g)	0,1	0,2	0,2
Hidratos de carbono totales (g)	2,3	1,2	2,1
Calcio (mg)	13	40	68
Hierro (mg)	1,5	1,1	1,1
Magnesio (mg)	7	16	6
Fósforo (mg)	25	31	45
Potasio (mg)	100	270	400
Sodio (mg)	5	10	9
Vitamina A (UI)	300	1.200	2.600
Vitamina B ₁ (UI)	0,07	0,07	0,10
Vitamina B ₂ (UI)	0,03	0,07	
Vitamina B ₅ (UI)	0,30	0,40	0,50
Vitamina C (UI)	5	9	24
Valor energético (cal)	13	14	18

Fuente Maroto, 2000

La planta de lechuga posee un sistema radical profundo de unos 30 centímetros, la raíz es pivotante con numerosas raíces laterales, tallo muy corto, casi acaule y lleva una roseta de hojas que pueden ser redondeadas, lanceoladas o casi espatuladas y de diferente color según los cultivares (Mallar, 1978; Maroto, 2000). La consistencia de las mismas puede ser correosa o blanda y el borde del limbo puede ser liso, ondulado o aserrado (Maroto, 2000). El tallo floral, se forma una vez pasada la madurez comercial, puede llegar a medir 1 a 1,20 m en algunos cultivares. La lechuga normalmente es autógama, debido a que la estructura de la flor facilita la autofecundación. Cuando ocurre un cruzamiento se debe a los insectos, ya que el polen es muy pesado para ser llevado por el viento, el fruto es un aquenio de color marrón oscuro casi negro, marrón claro, gris amarillento o blanco grisáceo, mide unos milímetros de longitud (Mallar, 1978).

Este cultivo se desarrolla muy bien en un clima templado fresco y húmedo, según Knott, citado por Mallar (1978), las temperaturas óptimas para obtener un buen crecimiento y calidad oscilan entre 7° y 24°C, sin embargo la temperatura óptima es de 15-18°C.

Temperaturas altas producen un sabor amargo a las hojas y floración prematura (McGillivray citado por Mallar, 1978; Maroto, 2000). En cuanto a suelos, prefiere suelos francos que no retengan excesiva humedad, con abundante contenido de materia orgánica (Maroto, 2000). Resiste contenidos medios de salinidad, el pH óptimo es 6-6.5 (Mallar, 1978). La respuesta al fotoperiodo es distinta en cada variedad y en general éstas florecen con días neutros o días largos. Se desarrollan bien en diversos tipos de suelo, sin embargo, prefiere los francos que no retengan excesiva humedad, con abundante contenido de materia orgánica (Maroto, 2000). Resiste contenidos medios de salinidad, el pH óptimo es 6-6.5 (Mallar, 1978).

La lechuga tradicionalmente se siembra en semilleros y se realiza al voleo, usando aproximadamente 1 g de semilla/m². Como el tamaño de la semilla es tan pequeño suele cubrirse con una delgada capa de tierra de modo de no enterrar mas 5 mm la semilla (Maroto, 2000). Sin embargo en la zona de Timotes, los agricultores realizan la siembra en bandejas y luego realizan el trasplante, este es un proceso más económico y seguro, ya que se usa sustrato esterilizado y aplicación de Trichoderma. Luego se realiza el trasplante, según Maroto (2000), señala que se realiza cuando las plantas tiene de 5-7 hojas, que suele ser entre los 30-40 días después de la siembra. Se realiza a raíz desnuda, en surcos separados por distancias de 0.50 m entre si y dejando 0.25 a 0.30 m entre plantas. La fertilización depende del suelo entre otros y juega un papel importante en el cultivo, Scaglia et al, (2004) recomiendan una fertilización de tipo medio para una hectárea: 80 a 100 kg/ha de N; 35 kg/ha de P₂O₅ y 150 a 200 kg/ha de K₂O, El N se debe fraccionar en 3 o 4 aportaciones de similar cantidad.

Mallar (1978) y Maroto (2000), describen diferentes plagas y enfermedades (Cuadro 2).

Cuadro 2. Plagas y enfermedades de la lechuga

NOMBRE CIENTÍFICO		NOMBRE COMÚN
PLAGA	<i>Frankliniella paucispinosa.</i>	Trips del tomate y de la lechuga
	<i>Amphorophora cosmopolitans.</i>	Pulgón de la lechuga.
	<i>Agrotis sp. y peridroma saucia.</i>	Gusanos cortadores.
	<i>Acromyrmex sp.</i>	Hormigas.
ENFERMEDADES	<i>Bremia lactucae</i>	<i>Mildiu de la lechuga</i>
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Pudrición blanda en la base de la planta.</i>
	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Plantas enanas</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pudrición del cuello de la raíz</i>
	<i>Xanthomonas campestris y Pseudomonas cichorii</i>	Bacteriosis
	<i>Albugo candida</i>	Roya blanca (Pineda <i>et al.</i> , 2005)
VIRUS	LMV	Virus del mosaico de la lechuga.
	CMV	Virus del mosaico del pepino
	VNGL	Virus de las nervaduras gruesas de la lechuga
	TSWV	Virus del bronceado del tomate

IV. MATERIALES Y METODOS

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de la estación Experimental EXPERTA, Facultad de Agronomía; Universidad Central de Venezuela. Maracay- Estado Aragua. Se usó material biológico de la zona de Timotes.

***Aislamiento de Rhizoctonia sp* proveniente de tejido vegetal de lechugas.**

Los aislados se obtuvieron de plantas de lechuga que presentaban síntomas de la enfermedad procedentes de la zona de Timotes (Figura 1). El material enfermo se lavó con agua corriente, luego se lavo con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, luego se lavó el exceso de hipoclorito con agua destilada esterilizada (ADE) y luego se retiro la humedad con papel absorbente esterilizado. Se procedió a cortar trozos de material enfermo de 5mm y fueron sembrados en placas de petri con medio de Papa-Dextrosa-Agar acidificado con acido láctico (PDAA). Las cápsulas fueron incubadas a temperatura de $\pm 24C$.

Las colonias que presentaron características típicas de *Rhizoctonia* fueron reaisladas a placas nuevas con medio PDAA para obtener cultivos puros y proceder a caracterizar, identificar, realizar las pruebas de patogenicidad y las respectivas pruebas con *Trichoderma*.



Figura 1. Plantas con síntomas de pudrición basal.

4.2 Identificación de *Rhizoctonia*

Se realizó mediante la metodología descrita por Perdomo *et al.*, (2007), y la descrita por Cedeño *et al.*, (2001) con algunas modificaciones.

Se realizó con base a su crecimiento, caracterización hifal y morfológica. Los cultivos se conservaron bajo refrigeración (4°C) en tubos de ensayo con PDA inclinado.

Crecimiento y caracterización hifal y morfológica.

El aislamiento se cultivó en cápsulas de petri con PDA y se incubaron bajo condiciones de laboratorio. Se midió el crecimiento micelial en cm a las 48 horas. Se caracterizó durante 4 semanas, tomando en cuenta el color de la colonia, características del micelio, maduración, color y tamaño de los esclerocios.

4.3 Prueba de patogenicidad de *Rhizoctonia solani*

4.3.1 Pruebas en hojas.

Las pruebas se realizaron por la metodología empleada por Perdomo *et al.*, (2007), con algunas modificaciones. Sin embargo hay que tener en cuenta que ellos la realizaron en hojas de maíz. Para dicha prueba se utilizaron hojas sanas de dos variedades de lechuga romana y americana, estas hojas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, luego se lavaron con ADE. Las hojas fueron puestas sobre bandejas de anime y papel absorbente, a cada hoja se le colocó dos discos de 5mm de diámetro que contenían micelio de *Rhizoctonia*. Cada bandeja con las hojas inoculadas fueron tapadas con bolsas para crear una cámara húmeda y se colocaron en condiciones de laboratorio ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) (Figura 2). Se realizaron evaluaciones diarias por 20 días, para observar síntomas.

Las hojas que presentaron síntomas fueron llevadas a cámara de aislamiento para posteriormente realizar el aislamiento en cápsulas de PDAA, para poder obtener nuevamente el patógeno y así comprobar que el aislado de *Rhizoctonia* es patogénico.



Figura 2. Pruebas en hojas.

4.3.2. Pruebas en plántulas.

Se realizó mediante la modificación de la metodología utilizada por Mesa-Moller *et al.*, (2007). Los aislados evaluados se desarrollaron en PDA durante 3 días. Se utilizaron 20

plantas de 30 días de edad, luego fueron trasplantadas a vasos plásticos con sustrato esterilizado. Se colocaron discos de 5 mm que contenían micelio de *Rhizoctonia* en la base del tallo de 15 plantas, y para el testigo se procedió de la misma manera, colocando un disco con medio PDAA en la base del tallo, luego se llevaron a cámara húmeda (Figura 3).

Las plantas inoculadas se mantuvieron en el laboratorio de Expertabiol a una temperatura de 18°C durante 5 semanas lapso en el que se presentaron los síntomas; transcurrido este tiempo las plantas que presentaron síntomas fueron llevadas a la cámara de siembra para proceder nuevamente con el aislamiento y comprobar así que el aislado obtenido de *Rhizoctonia* es patogénico en las plantas de lechuga y por lo tanto el agente causal de la pudrición basal.



Figura 3. Pruebas en plántulas. A. Plántulas inoculadas. B. Disco de *Rhizoctonia*.

4.4 Caracterización de aislados de *Trichoderma*

4.4.1. Aislados de *Trichoderma* evaluados.

Se estudiaron 19 aislados de *Trichoderma*, tomados de la colección del Laboratorio EXPERTABIOL, estos aislados son nativos de suelos de Timotes, estado Mérida y un aislado comercial conocido como Tricobiol® (Cuadro 3).

Cuadro 3. Aislados de *Trichoderma* a evaluar en la investigación.

Código	Tratamiento	Procedencia
T001	1	Tricobiol ®
T019	2	Timotes
T053	3	Timotes
T054	4	Timotes
T055	5	Timotes
T056	6	Timotes
T057	7	Timotes
T058	8	Timotes
T059	9	Timotes
T060	10	Timotes
T061	11	Timotes
T062	12	Timotes
T063	13	Timotes
T064	14	Timotes
T065	15	Timotes
T066	16	Timotes
T067	17	Timotes
T068	18	Timotes
T069	19	Timotes

4.4.2 Caracterización.

4.4.2.1 Caracterización macroscópica.

Cada aislado fue sembrado en cápsulas de petri con PDAA, y se incubaron bajo condiciones de laboratorio ($\pm 24^{\circ}\text{C}$), se evaluaron a los 3 y 6 días tomando en cuenta color de la colonia, formación de anillos concéntricos, exudados, pústulas y color por el envés de las placas.

4.4.2.2 Caracterización microscópica.

Se realizaron microcultivos de cada aislado que procedían de cultivos de 48 hr de edad, se evaluaron a los 3 y 6 días, donde se observó tipo de conidióforo, fiálides, conidio y clamidosporas. Los microcultivos consistieron en placas de petri, las cuales contenían un triángulo hecho de plástico junto con un porta objeto y dos cubre objetos, todo fue

esterilizado. Luego se procedió a colocar un disco de 5 mm de diámetro del cultivo de *Trichoderma* sobre cada extremo del porta objeto y luego se le colocó los cubre objetos a cada disco, posteriormente se le aplicó ADE en el fondo de la placa, para así crear un ambiente húmedo y darle mejores condiciones de desarrollo a *Trichoderma*. Allí se dejaron por 3 y 6 días para su posterior caracterización (Figura 4).

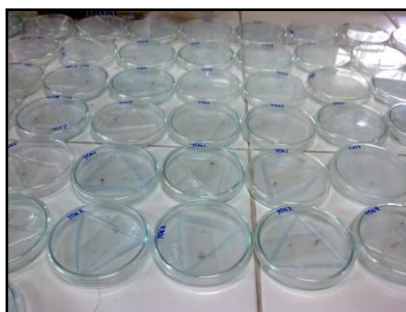


Figura 4. Microcultivos de *Trichoderma*

4.5. Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* spp.

4.5.1 Velocidad de crecimiento.

Para esta prueba se procedió a sembrar discos de PDA con micelio de *Trichoderma* bajo condiciones de laboratorio, estos discos fueron colocados en un extremo de las cápsulas de petri con PDA, y se llevó un registro de la velocidad de crecimiento de cada aislado, las evaluaciones se realizaron cada 24 horas. Se empleó un diseño factorial con 4 repeticiones, 19 tratamientos y el factor día.

4.5.2 Capacidad de esporulación.

Se utilizó la metodología descrita por Michel (2001), la cual consistió en sembrar discos de 5mm de diámetro de *Trichoderma* que procedían del borde de cultivos de 3 días, fueron colocados en el centro de las placas con PDA. Se realizó una evaluación a los 12 días de incubación y se estimó de forma visual la capacidad de esporulación. Tomando en cuenta la siguiente clasificación; muy abundante si cubría toda la superficie del medio, abundante si cubría el 50% del medio y escasa cuando cubría menos del 10% de la superficie.

4.5.3 Prueba de enfrentamiento.

Para observar el tipo de interacción que se presenta entre el patógeno y el antagonista se, utilizó la metodología descrita por Acevedo (1995).

Se colocó en cápsulas de petri con PDA un disco de 5 mm de diámetro, que contenía micelio de *Rhizoctonia* en un extremo de la cápsula y en el otro extremo un disco de igual tamaño, que contenía micelio de *Trichoderma* spp, en el posible punto de interacción se colocó una tira de papel celofán (6 cm x 2 cm); previamente esterilizado en agua destilada hirviendo, que se retiró a los 15 días después que las colonias hicieron contacto se colocó en un portaobjeto, se fijaron con esmalte para uñas y se observó al microscopio la interacción entre los dos hongos. Las cápsulas se incubaron bajo condiciones de laboratorio. Se empleó un diseño factorial con 4 repeticiones, 19 tratamientos y el factor día.

4.5.3.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* spp. (PIC)

Se midió el crecimiento de la colonia del patógeno enfrentado con *Trichoderma* y del patógeno solo por día y luego se introdujo en la formula descrita por Shafiquzzaman *et al.*, 2009:

$$PIC = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

PIC = Porcentaje de inhibición de crecimiento.

R1= Crecimiento de *Rhizoctonia* en ausencia de *Trichoderma*.

R2 = Crecimiento de *Rhizoctonia* en presencia de *Trichoderma*.

4.5.4. Prueba de competencia

Esta prueba se realizó siguiendo la metodología descrita por Rincón *et al.* (1992), la cual consistió en colocar un disco de 5mm de agar que contenía micelio del patógeno y otro disco de igual tamaño de *Trichoderma*, para observar su capacidad competitiva se utilizó la escala descrita por Elias y Arcos citados por Rincón *et al.* (1992) (cuadro 4).

Cuadro 4. Escala para medir competencia de *Trichoderma*.

Grado	Capacidad competitiva
0	Ninguna invasión a la colonia del patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del patógeno y esporulación sobre ella

4.5.5. Prueba de antibiosis.

4.5.5.1. Efecto de metabolitos volátiles.

Para dicha prueba se utilizó, con algunas modificaciones la metodología descrita por Dal *et al.* (1997).

Los microorganismos utilizados fueron sembrados en medio de PDAA, y se dejaron crecer bajo condiciones de laboratorio, hasta que las colonias cubrieron el 50% de las placas. Para observar el efecto biológico de las sustancias volátiles producidas por *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* se procedió a sembrar un disco de 5mm de agar que contenía micelio del patógeno en el centro de la cápsula de petri que contenía PDAA y en otra cápsula se procedió a sembrar un disco de 5 mm de agar con micelio de *Trichoderma*. Seguidamente las cápsulas fueron conectadas una con la otra y cubiertas con cinta plástica para evitar que se escapen los gases. Luego se incubaron en una estufa a 25°C por 10 días. A los 3,5 y 7 días se midió el diámetro de las colonias del patógeno, se registró si hubo o no inhibición, y se tomó nota de cualquier variación micelial en el color, aspecto y/o formación de estructuras reproductivas. Se empleó un diseño factorial con 4 repeticiones, 19 tratamientos y el factor día.

4.5.5.2 Efecto de metabolitos no volátiles

Se realizó mediante la metodología descrita por Escobar *et al.* (2004). Se colocó una circunferencia de papel celofán previamente esterilizado en agua hirviendo en el centro de la placa de petri con medio PDA y sobre el papel se sembró un disco de 5mm de diámetro de *Trichoderma* y se incubó bajo condiciones de laboratorio por 48 horas antes que el micelio

llegará al borde del papel. Luego fue retirado y en su lugar se sembró un disco de 5mm de diámetro de *Rhizoctonia*, el testigo se realizó sembrando el patógeno sobre la presencia del papel celofán sin antagonista, todo se incubó bajo condiciones de laboratorio y se evaluó a los 6 DDI, midiendo el crecimiento del patógeno y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento. Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con 4 repeticiones y 19 tratamientos.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Aislamiento e identificación de *Rhizoctonia* sp.

El aislado de *Rhizoctonia* obtenido se caracterizó por presentar una colonia blanca al inicio que posteriormente fue cambiando a marrón claro hasta llegar a marrón oscuro a los 15DDI, durante el inicio del crecimiento de la colonia se formaron anillos concéntricos que tendían a desaparecer después del quinto día (Figura 5), además se observó la formación de los esclerocios después de los 20DI, de forma dispersa en el medio de cultivo, observándose como una formación de masas de color café muy claro que se iban oscureciendo hasta observarse los esclerocios, los cuales eran de color marrón oscuro, lisos y de formas irregulares, comúnmente redondos de 1 a 9 mm de diámetro y con frecuencia agrupados, rodeados de un exudados de color marrón claro (que también se observó sobre esclerocios individuales) (Figura 6). La tasa de crecimiento fue evaluada diariamente, observándose un crecimiento promedio de 0,9 a 1,2 cm/día, cubriendo completamente la cápsula entre el día 7 y 8 DDI.

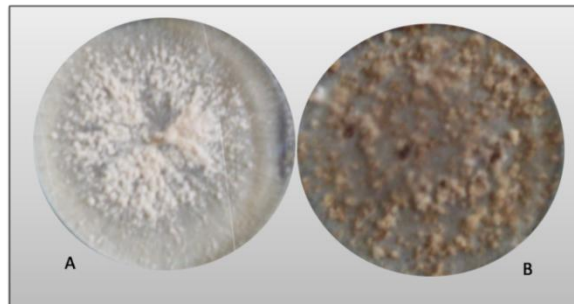


Figura 5. Características de la colonia de *Rhizoctonia*. A. Colonia joven y B. Colonia madura.

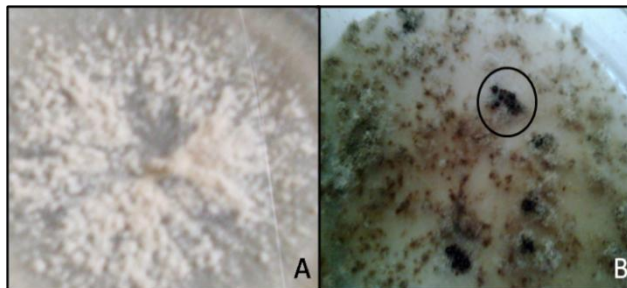


Figura 6. Esclerocios de *Rhizoctonia*. A. Formación de los esclerocios y B. Esclerocios maduros.

Se evaluaron las características microscópicas, donde se observaron hifas jóvenes hialinas, que luego fueron cambiando a un amarillo claro y las maduras de color marrón, presentaron hifas formando un ángulo recto, con una constricción en el inicio de la ramificación y un septo

inmediatamente después, el grosor de las hifas fue de 7 a 10,5 μm (Figura 7). Las características observadas corresponden a las descritas en la literatura para *Rhizoctonia solani* (Sneh et al., 1991, Rincon et al., 1992; Agrios, 1995, Carling et al, 2002(b)).

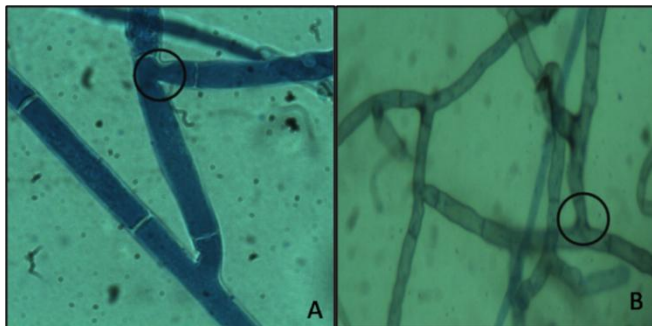


Figura 7. Constricción del micelio y ángulo recto en las hifas de *Rhizoctonia*. A. Hifas hialinas jóvenes. B. Hifas marrón claras maduras

Yang et al. (2006) identificaron diferentes aislados de *Rhizoctonia* y observaron que los aislados presentaron un cambio de coloración de marrón claro a marrón oscuro y formando esclerocios después de los 14DDI. Gutiérrez et al. (2006) observaron en 3 aislados de *Rhizoctonia* diferencias significativas en cuanto a la tasa de crecimiento, obteniendo crecimiento de 8,2 y 5,6 cm a los 4 DDI. También se evaluó la formación de esclerocios, la cual se produjo a los 15 DDI, observando esclerocios de color marrón de forma dispersa y el tamaño osciló entre 0,3 y 9 mm de diámetro. Perdomo et al., (2007) observaron que las hifas de los aislados evaluados presentaban ángulos rectos y constricciones en el punto de origen de la ramificación desde la hifa principal. Las hifas presentaron un grosor entre 8 y 12,5 μm , además se observó cambio de coloración en el micelio desde blanco hasta marrón, formación de esclerocios con formas irregulares, de diferentes tamaños y de color marrón, también se visualizó un exudado de color ámbar sobre los esclerocios.

5.2 Prueba de patogenicidad de *Rhizoctonia solani*.

5.2.1 Prueba en hojas

Las observaciones se realizaron diariamente. Se pudo visualizar síntomas similares en las dos variedades de lechuga inoculadas. Al segundo día se observó un cambio en la coloración de las zonas cercanas al punto de inoculación, formando un aro de color marrón algo más claro en la romana que en la americana, pero similar a la coloración que se observa en las plantas afectadas en campo, este aro se formó alrededor del punto de

inoculación (Figura 8). Posteriormente se observó el crecimiento del mismo sobre toda la superficie de las hojas causando un deterioro casi completo de cada hoja a los 8 DDI (Figura 9). De las hojas infectadas se aisló nuevamente a *Rhizoctonia*, comprobándose que el aislado es patógeno en las dos variedades de lechuga (Figura 10). Perdomo *et al.* (2007), observaron síntomas a las 12 horas después de la inoculación con diferentes aislados de *Rhizoctonia* sobre trozos de hojas de maíz. Martínez (2006) observó síntomas producidos por *Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum* a los 3 días, además el crecimiento del micelio sobre las hojas de lechuga, cubriendo casi completamente la hoja inoculada, también se observó producción de esclerocios.

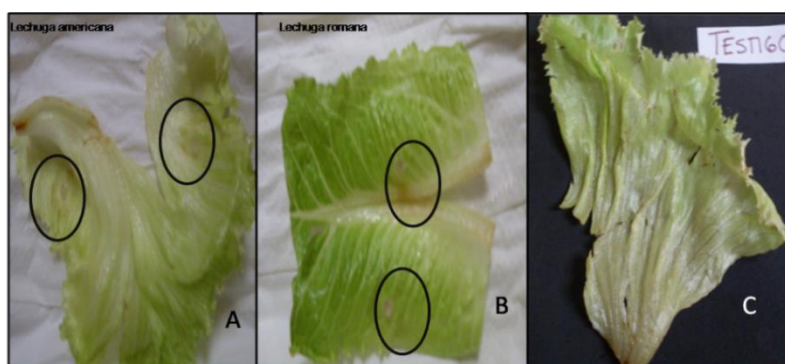


Figura 8. A y B. Hojas de lechuga inoculada con discos de micelio de *Rhizoctonia*. C. Lechuga testigo

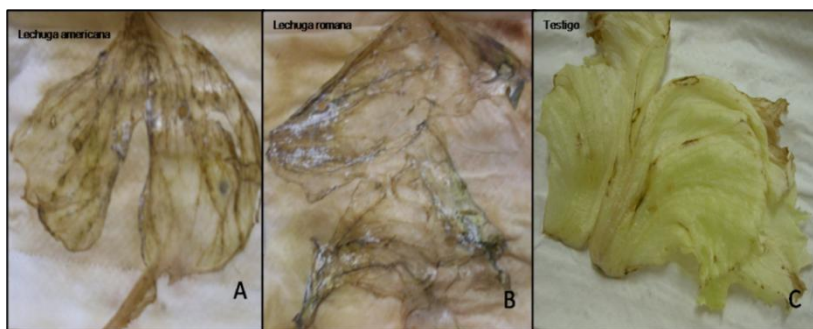


Figura 9. A y B. Síntomas en hojas de lechuga americana y romana. C. Lechuga sana (testigo)

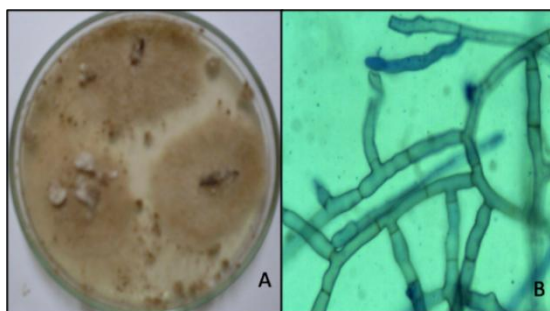


Figura 10 A. *Rhizoctonia* en medio de cultivo. B. Micelio de *Rhizoctonia* (aislados de las hojas inoculadas).

5.2.2 Prueba en plantas

Se realizaron evaluaciones diarias por 20 días consecutivos para observar cada cambio ocurrido en las plantas que fueron inoculadas. Los síntomas se comenzaron a hacer evidentes a los 10 DDI, las plantas comenzaron a mostrar un marchitamiento leve y una coloración amarillenta, se observó el micelio creciendo sobre el tallo de la planta, las plantas afectadas murieron entre los 25 y 30 DDI (Figura 11). En esta prueba solo se utilizaron plantas de la variedad “Americana”, las plantas afectadas se llevaron a la cámara de aislamiento y se sembraron tejidos de la planta donde se observaban síntomas en PDA, luego se realizaron impresiones en cinta para observar el patógeno obtenido (Figura 12). Mediante esta prueba y la anterior que se realizó en hojas se pudo comprobar que el aislado de *Rhizoctonia* evaluado es patogénico en plantas de lechuga.

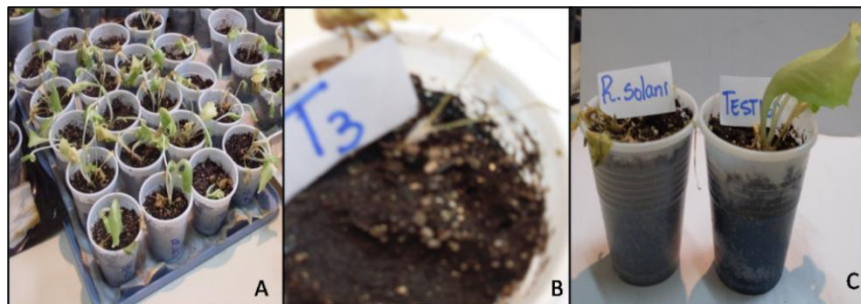


Figura 11. Síntomas en plantas de lechuga causadas por *Rhizoctonia*. A. Primeros síntomas a los 15 DDI. B. Crecimiento del micelio en el tallo de la planta. C. Comparación de plantas inoculadas con plantas testigos.

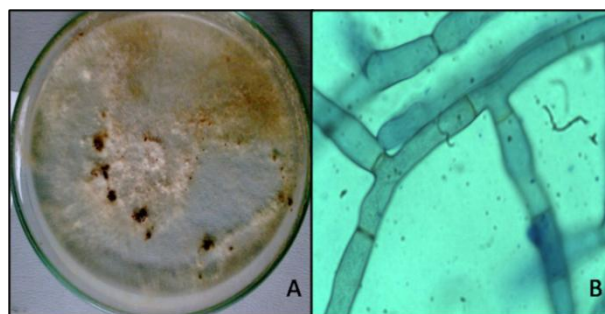


Figura 12. A. *Rhizoctonia* en medio de cultivo. B. Micelio de *Rhizoctonia* aislados de plantas inoculadas con *Rhizoctonia*.

5.3 Caracterización de aislados de Trichoderma

Caracterización macro y microscópica.

Las características se evaluaron a los 3 y 6 días después de la siembra, los 18 aislamientos presentaron características correspondientes al género Trichoderma (Cuadro 5) (Figura 13y 14).

Cuadro 5. Características macro y microscópicas de 18 aislados de Trichoderma sp.

TRAT	AISLADO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICCROSCÓPICAS
2	T019	Colonia de crecimiento moderado, micelio blanco y algodonoso, forma pústulas y exudados de color verde olivo.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos, subglobosos hacia elipsoidales. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas, subglobosas y periformes.
3	T053	Colonia de crecimiento rápido, micelio de color blanco y algodonoso, forma anillos con una distancia promedio de 6mm entre anillos, forma pústulas y exudados verde oscuro.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro y lisos, globosos, subglobosos y elipsoidales. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas, subglobosas.
4	T054	Colonia de crecimiento lento, micelio blanco algodonoso, formación de pústulas y exudados de color verde oscuro.	Conidióforo alargado, fiálides langeniformes de 1-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y subglobosas.
5	T055	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco algodonoso, forma anillos con una distancia promedio de 10mm entre anillos,	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-4 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales

		formación de pústulas y exudados verde olivo.	e intercalares, globosas a subglobosas.
6	T056	Colonia de crecimiento moderado, micelio blanco ralo, forma anillos concéntricos con distancia promedio de 9mm entre ellos.	Conidióforo alargado, fiálides langeniformes de 1-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales y solitarias, globosas a subglobosas.
7	T057	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco algodonoso, formación de anillos concéntricos con distancia promedio entre anillos de 10mm, formación de exudados transparentes.	Conidióforo alargado, fiálides langeniformes de 2-4 y 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas a subglobosas y periformes.
8	T058	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco ralo, forma anillos con distancia promedio de 9mm entre anillos.	Conidióforo alargado, fiálides langeniformes de 2-4 por verticilo, presencia de fiálides intercalares. Conidios verde oscuro, lisos, globosos, elipsoidales y ovoides. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas a subglobosa y periformes.
9	T059	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco algodonoso, formación de anillos concéntricos, distancia promedio entre anillos de 12 mm, forma exudados transparentes.	Conidióforo alargado, fiálides langeniformes de 2-4 , 2-3 y de 2-5 por verticilo, presencia de fiálides intercalares. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y ovoides. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y subglobosas.
10	T060	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aereo, forma anillos concéntricos con una distancia promedio de 13mm, forma pústulas y	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y

		agregados de conidios, exudados transparentes.	periformes.
11	T061	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos con distancia promedio de 13 mm, forma pustulas y agregados de conidios, exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y periformes.
12	T062	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos concéntricos con una distancia de 10mm, forma pústulas y agregados de conidios y exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y periformes.
13	T063	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos con distancia de 9mm, presenta pústulas y forma agregados de conidios.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y periformes.
14	T064	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos con una distancia de 17mm. Presenta pústulas y formación de agregados de conidios, exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales e intercalares, globosas y periformes.
15	T065	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, formación de anillos con distancia de 18mm, forma pústulas, agregados de conidios y exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y ovoides. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas, subglobosas y periformes

16	T066	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos con una distancia de 12mm, presencia de agregados de conidios y pústulas, exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas, subglobosas y periformes
17	T067	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco ralo, no forma pústulas ni agregados de conidios.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 y de 2-5 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos. Clamidosporas hialinas, terminales, globosas y poco frecuentes.
18	T068	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos concéntricos con distancia de 14mm, forma pústulas y agregados de conidios, exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos a subglobosos y elipsoidales. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas, subglobosas y periformes
19	T069	Colonia de crecimiento rápido, micelio blanco aéreo, forma anillos concéntricos con distancia de 9mm, forma pústulas y agregados de conidios, exudados transparentes.	Conidióforo intrincado, fiálides langeniformes de 2-3 y 2-4 por verticilo. Conidios verde oscuro, lisos, globosos y elipsoidales. Clamidosporas hialinas, terminales, solitarias e intercalares, globosas, subglobosas y periformes

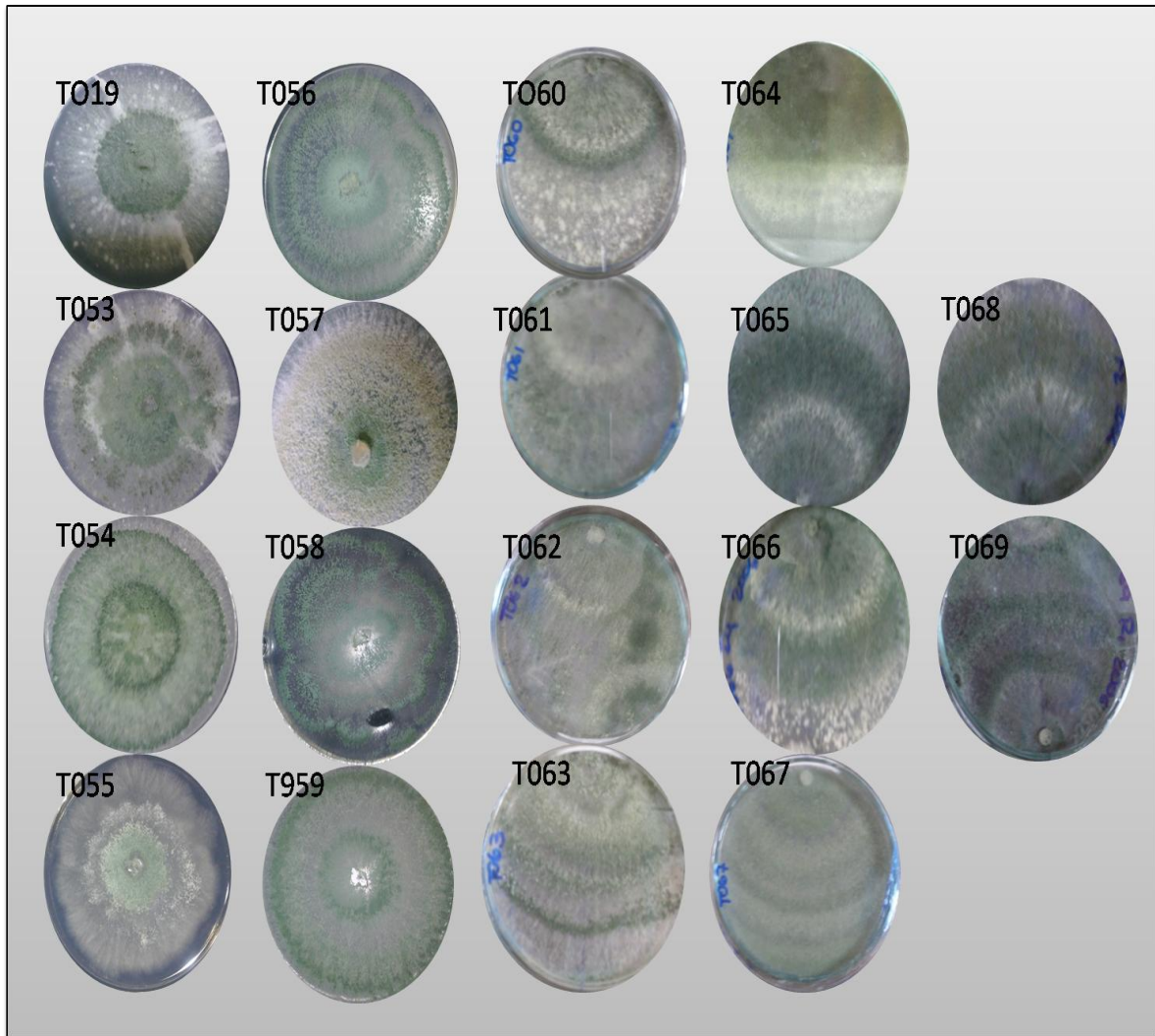


Figura 13. Caracterización macroscópica de los aislados de Trichoderma

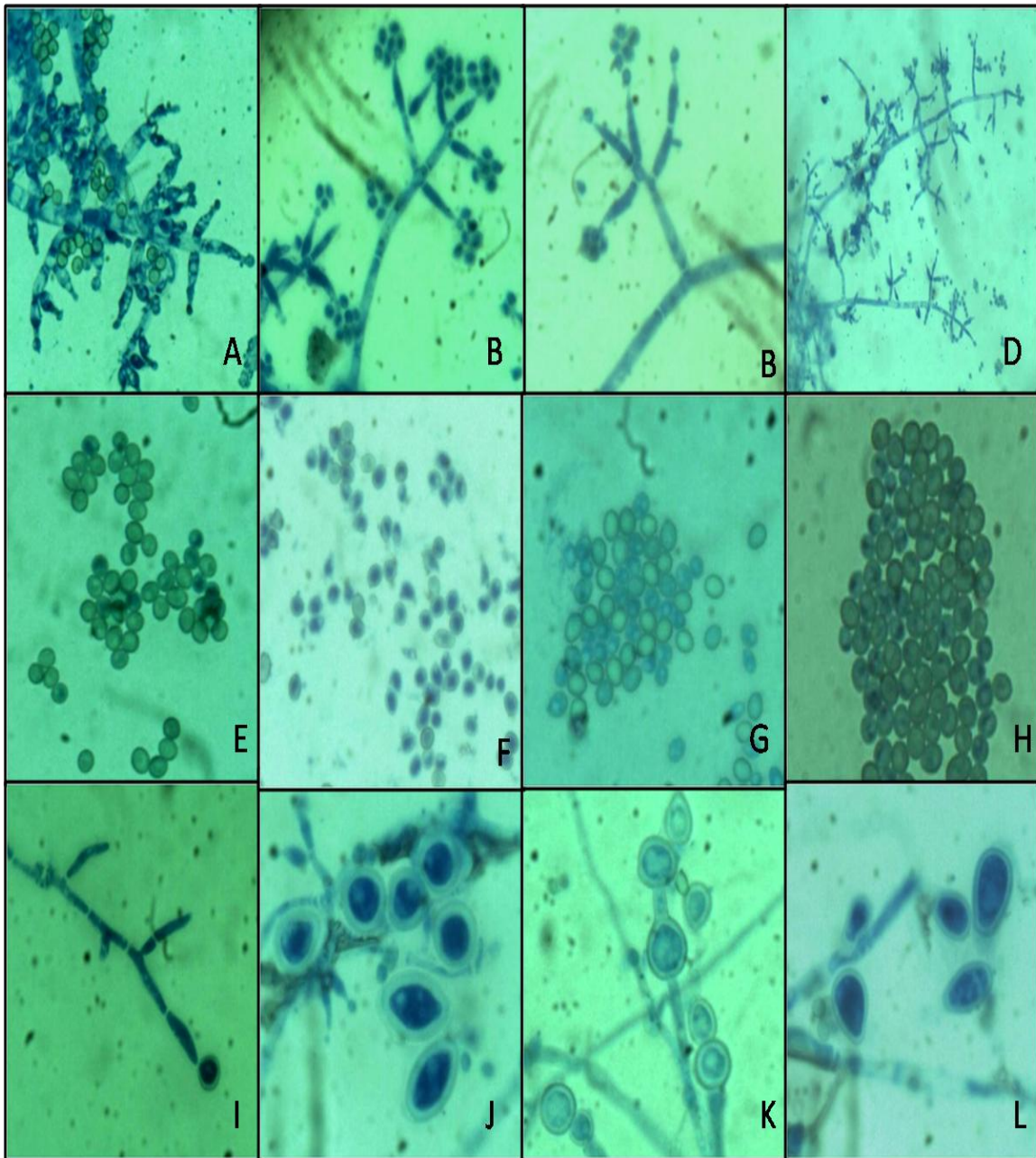


Figura 14. Características microscópicas de los diferentes aislados de *Trichoderma*. A, B, C y D. Conidióforos y fiálides. E, F, G y H. Conidios. I, J, K y L. Clamidosporas

5.4 Evaluación *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* spp.

5.4.1 Velocidad de crecimiento.

Los 19 aislamientos de *Trichoderma* se evaluaron durante una semana para observar su velocidad de crecimiento. Se empleó un diseño factorial con 19 tratamientos, cuatro

repeticiones y un factor día, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p = 0.0000$; CV10.78) y para determinar los mejores tratamientos se aplicó la prueba de medias de Tukey, con un nivel de confianza de 99%, la cual muestra que hay cinco grupos homogéneos y que estos dentro de ellos no presentan diferencias significativas (Cuadro 6). El mejor aislado fue T055 el cual creció 7.5771cm en el promedio de 7 días de evaluación seguido de T069 con 7.3396 cm y T019 con 7.3021 cm; a diferencia de los aislados T061 y T066 que crecieron 6.2229 cm y 6.0396cm respectivamente. Rosero (2008) encontró diferencias estadísticamente significativas entre 4 aislados de *Trichoderma*, donde *T. koningii* tuvo la mayor velocidad de crecimiento en comparación con los demás aislados. Cúndom *et al.*, (2003a) observaron diferencias en la velocidad de crecimiento de los 9 aislados de *Trichoderma* evaluados, observando que los aislados 1, 3, 6 y 7 fueron los que tuvieron mayor velocidad e crecimiento. La velocidad de crecimiento de cada aislado de *Trichoderma* depende de cada especie e incluso se sabe que hay diferencias entre aislados de la misma especie, mostrando esto la variabilidad antagónica de cada aislado. Cook y Baker (1983) señalan que la velocidad de crecimiento en los aislados de *Trichoderma* es un motivo para la utilización de estos como antagonistas.

Cuadro 6. Velocidad de crecimiento de los 19 aislados de *Trichoderma*.

TRAT	VDC	TRAT	VDC
T055	7.5771 a	T058	6.9312 abcd*
T069	7.3396 ab	T060	6.7458 abcde
T019	7.3021 ab	T067	6.7229 bcde
T001	7.2188 abc	T054	6.7062 bcde
T068	7.1625 abc	T053	6.5875 bcde
T057	7.1500 abc	T062	6.5000 bcde
T066	7.1188 abc	T063	6.3917 cde
T065	7.1021 abc	T061	6.2229 de
T064	7.0229 abcd	T056	6.0396 e
T059	6.9937 abcd		

*Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.01)

5.4.2 Capacidad de esporulación

Se sembraron discos de *Trichoderma* en placas con PDA y se evaluaron a los 12 días de incubación y se estimó de forma visual su capacidad de esporulación (Cuadro 7). Se utilizaron 19 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. La mayoría de los aislados presentaron una capacidad de esporulación muy abundante a excepción de los aislados T057, T060 y T064 (Figura 15). Michel, (2001) evaluó la capacidad de esporulación (CE) de 27 aislados de *Trichoderma*, donde observó un solo aislado con capacidad de esporulación muy abundante, veintitrés aislados con abundante y CE tres con escasa CE.

Cuadro 7. Capacidad de esporulación de los aislados de *Trichoderma*

Trat.	CDE	Trat.	CDE
T001	MA	T061	MA
T019	MA	T062	MA
T053	MA	T063	MA
T054	MA	T064	A
T055	MA	T065	MA
T056	MA	T066	MA
T057	A	T067	MA
T058	MA	T068	MA
T059	MA	T069	MA
T060	A		

MA= MUY ABUNDANTE 100% DE ESPORULACION SOBRE EL MEDIO
A= ABUNDANTE 50% DE ESPORULACION SOBRE EL MEDIO

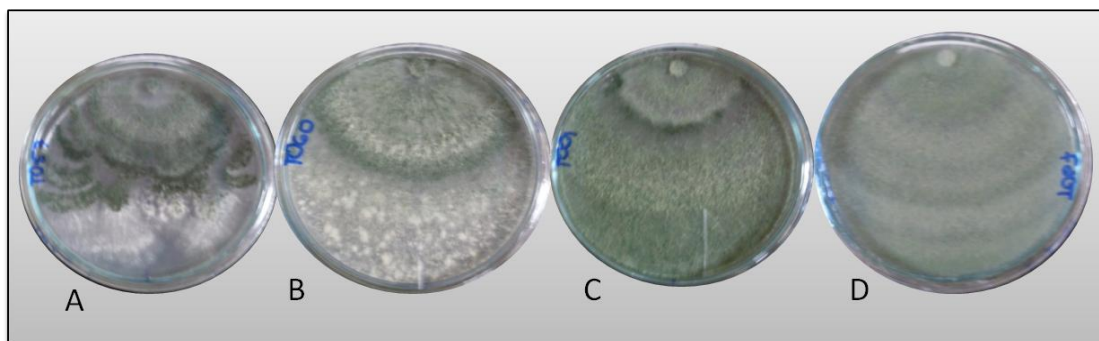


Fig. 15. A y B. Esporulación abundante (T057 y T060); C y D. Esporulación muy abundante (T001 y T067).

5.4.3. Pruebas de enfrentamiento

5.4.3.1 Interacción hifal

Se observaron diferentes interacciones en todos los aislados *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* siendo las más comunes en la mayoría de los aislados, lisis y penetración. El crecimiento paralelo y el enrollamiento se presentaron solo en algunos aislados (Cuadro 8). El enrollamiento en las hijas de *Rhizoctonia* ocurrió en los aislados T066, T067 y T068, donde las hifas de *Trichoderma* se adhieren y se enrollan a *Rhizoctonia* ocurriendo un estrangulamiento de las hifas y su posterior muerte (Figura 16). La penetración se observó por el crecimiento de *Trichoderma* dentro de las hifas de *Rhizoctonia* en 10 de los aislados estudiados (Figura 17). En el crecimiento paralelo se observaron el crecimiento conjunto de las dos hifas sin ninguna alteración aparente (Figura 18). En cuanto a lisis se encontró que de los 19 aislados 14 presentaron esta interacción, donde se observó una desintegración y rompimiento de las hifas de *Rhizoctonia*, esta característica se presenta por la secreción de metabolitos por parte de *Trichoderma* (Figura 19). La mayoría de los aislados presentaron 1 y 2 tipo de interacción hifal. Los aislados T058, T068 y T067 presentaron 3 tipos. Diferentes investigadores han encontrado las distintas interacciones mencionadas anteriormente. Rincón et al., (1992) observaron que los aislados de *Trichoderma* evaluados presentaron con mayor frecuencia lisis, vacuolación, crecimiento paralelo, granulación y con menos frecuencia enrollamiento y penetración sobre las hifas de *R. solani*, por otra parte Reyes et al., (2008) encontraron tres tipos de interacción; penetración, enrollamiento, vacuolación y lisis celular sobre hifas de *Rhizoctonia* sp., Cúndom et al., (2003b) observaron plasmólisis, acortamiento celular y enrollamiento de la hifas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* y Martínez et al (2008), encontraron cuatro tipos de interacciones, enrollamiento, penetración, vacuolación y lisis en el 98% de los aislados evaluados sobre las hifas de *Rhizoctonia* sp.

Cuadro 8. Interacción entre las hifas de *Trichoderma* spp Y *R. solani*.

AISL	EN	P	CP	L
T001	-	+	-	+
T019	-	-	+	+
T053	-	-	+	-
T054	-	-	+	+
T055	-	-	+	-
T056	-	+	-	+
T057	-	-	+	-
T058	-	-	+	+
T059	-	+	-	+
T060	-	+	-	+
T061	-	+	-	+
T062	-	+	-	-
T063	-	-	+	+
T064	-	-	-	+
T065	-	+	-	-
T066	+	+	-	+
T067	+	+	-	+
T068	+	+	-	+
T069	-	-	+	+

E= esporulación; EN= enrollamiento; P= penetración; CP= crecimiento paralelo al micelio de *Rhizoctonia*; L=lisis del micelio de *Rhizoctonia*.



Figura 16. Interacción hifal por enrollamiento de las hifas de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia*. A. T066; B. T067; C. T068.

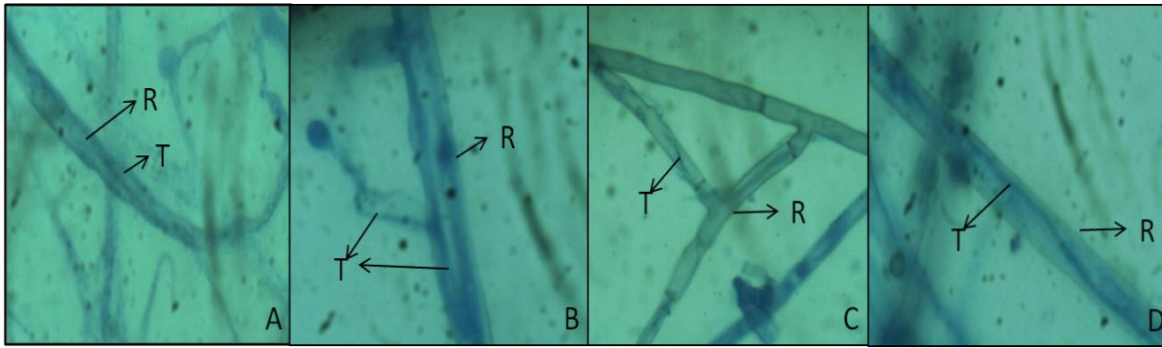


Fig. 17. Interacción hifal por penetración de hifas de *Trichoderma* en hifas de *Rhizoctonia*. A. T001; B. T059; C. T062; D. T068.

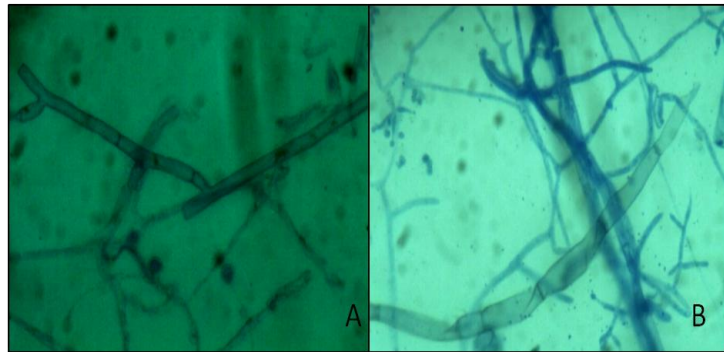


Figura 18. Interacción hifal por crecimiento paralelo de las hifas de *Rhizoctonia* y *Trichoderma*. A. Aislado T019 y B. Aislado T063

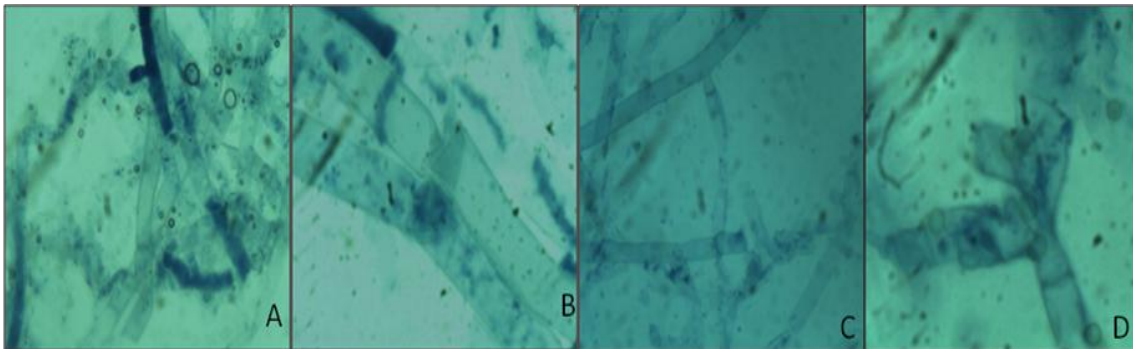


Figura 19. Interacción hifal por lisis a las hifas de *Rhizoctonia* por efecto de *Trichoderma*. A. T054; B. T056; C. T057; D. T063

5.4.3.2. Evaluación macroscópica

Se observaron diferentes reacciones en cada aislado (Cuadro 9). La mayoría de los aislados de *Trichoderma* tuvieron un cambio en la coloración del micelio durante el transcurso de la evaluación de un verde claro a un verde olivo y luego a un verde oscuro (Figura 20), a diferencia del micelio de *Rhizoctonia* que solo el del aislado T060 produjo un cambio en el color del micelio a un amarillo claro. Los aislados T054, T056, T067 y T068 tuvieron un cambio de color en la zona de contacto formándose un anillo color marrón y en otros de color amarillo claro (Figura 21). En cuanto a la producción de esclerocios por parte de *Rhizoctonia* solo se observó en el aislado T067, el cual indujo crecimiento de esclerocios, teniendo en cuenta que el aislado de *Rhizoctonia* produce esclerocios después de los 15 DDI. También se observó la esporulación de todos los aislados de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* a excepción de los aislados T056, T057 y T067 (Figura 22). Rincon *et al.*, (1991) observaron que solo el aislado T-17 de los estudiados presentó franja color café visible en la zona de contacto entre *Trichoderma* y *R. solani*.

También se evaluó los días a los que *Trichoderma* y *Rhizoctonia* realizaron contacto, el sobrecrecimiento, la esporulación en la zona de contacto sobre *Rhizoctonia* y la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia*. En el cuadro 10 se puede observar que el promedio de días para el contacto es de 3 a 4, los aislados T057, T060 y T067 no tuvieron un sobrecrecimiento sobre el patógeno. Michel (2001), observó esporulación abundante sobre la zona de interacción entre *Trichoderma* y *Fusarium*, también observó sobrecrecimiento de los aislados sobre el patógeno.

Cuadro 9. Cambios y alteraciones en el micelio y medio de cultivo en los enfrentamientos de *Trichoderma* y *Rhizoctonia*.

AISL	CCMT	CCMR	CCZC	CCM	PE	E	IR
T001	+	-	-	-	-	4+	+
T019	+	-	-	+A	-	4+	+
T053	+	-	-	+A	-	2+	+
T054	+	-	+A	+C	-	2+	+
T055	+	-	-	+C	-	2+	+
T056	-	-	+M	+M	-	-	+
T057	+	-	-	+A	-	-	-
T058	-	-	-	+A	-	3+	+
T059	+	-	-	+C	-	2+	+
T060	+	+A	-	+A	-	-	-
T061	+	-	-	+A	-	2+	+
T062	+	-	-	+A	-	+	+
T063	-	-	-	-	-	+	+
T064	-	-	-	+M	-	3+	+
T065	+	-	-	+M	-	4+	+
T066	-	-	-	+A	-	4+	+
T067	-	-	+M	-	+	-	-
T068	+	-	+M	+A	-	3+	+
T069	-	-	-	+M	-	+	+

CCMT= cambio de color del micelio de *Trichoderma*, CCMR= cambio de color del micelio de *Rhizoctonia*, CCZC= cambio de color en la zona de contacto, CCM= cambio de color del medio, PE= producción de esclerocios, E= esporulación, IR= invasión de *Rhizoctonia*, M= marrón, A=amarillo y C=crema.

Cuadro 10. Días de contacto, sobrecrecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp sobre *Rhizoctonia*.

AISL	DDC	SC(cm)	ESPORULACION		ICR
			HZC	SR	
T001	4	2.3	-	+	+
T019	3.75	1.57	-	+	+
T053	4.75	1.12	-	+	+
T054	3.5	1	-	+	+
T055	4	15	-	+	+
T056	4.75	1.05	+	-	+
T057	6.75	0	+	-	-
T058	4	1.13	-	+	+
T059	4	1.17	-	+	+
T060	3.75	0	+	-	+
T061	3	1	-	+	+
T062	3.75	0.95	-	+	+
T063	3.75	2.57	-	+	+
T064	4.5	1.1	-	+	+
T065	3.5	0.97	-	+	+
T066	3.25	1.6	-	+	+
T067	4.5	0	+	-	+
T068	4	0.67	-	+	+
T069	3.75	1.77	-	+	+

DDC= días del contacto; SC= sobre crecimiento de *Trichoderma* sobre *R. solani*; HZC= hasta la zona de contacto, SR= sobre *R. solani*, ICR= Inhibición del crecimiento de *R. solani*

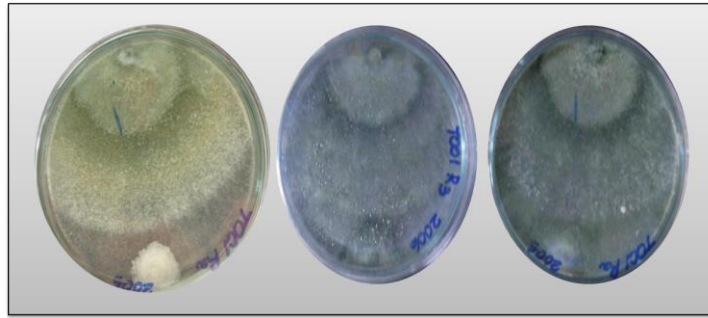


Figura 20. Evaluación macroscópica. Cambio de coloración de la colonia de *Trichoderma*

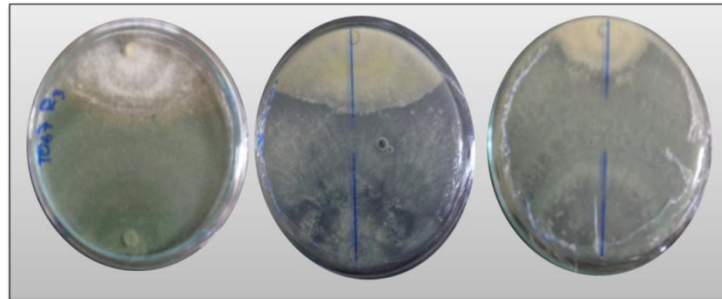


Figura 21. Evaluación macroscópica. Cambio de color en la zona de contacto entre las hifas de *Trichoderma* y *Rhizoctonia*.

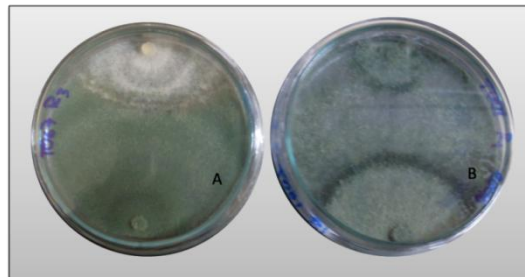


Figura 22. Evaluación macroscópica. A. No esporulación sobre el patógeno. B. Esporulación sobre el patógeno.

5.4.4. Pruebas de competencia

Se observó los cuatro tipos de grado de competencia según la escala Elias y Arcos (Cuadro 11). La mayoría de los aislados presentaron un grado de competencia de tipo 4 donde los aislados tuvieron un crecimiento y esporulación sobre toda la superficie del patógeno. Los aislados T054, T059 y T062 presentaron grado 3, donde se observó la invasión total de la superficie del patógeno pero sin esporulación; T066 y T056 grado 2 y 1 respectivamente, donde invadieron $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ de la superficie del patógeno. Y los aislados T057, T060 y T067 grado 0, es decir, que no realizaron ninguna invasión a la colonia del patógeno (Figura 23). Rincón *et al.*, (1992) observaron que todos los aislados estudiados presentaron grado de

competencia 4 sobre *Rhizoctonia* excepto el T-95 que presento de tipo 2. Askew y Ling (1994), evaluaron el grado de competencia de 118 aislados de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia* y encontraron que el 53% presentaba grado 4, 21% grado 3, 17% grado 2, 6% grado 1 y 3% grado 0. Martínez et al., (2008) observaron que el 81.35% de los aislados evaluados se ubicaron en los grados 4 y 3 competencia sobre *Rhizoctonia*.

Cuadro 11. Capacidad competitiva de los aislados de *Trichoderma* con *Rhizoctonia*.

AISL	GRADO DE COMPETENCIA				
	0	1	2	3	4
T001	-	-	-	-	+
T019	-	-	-	-	+
T053	-	-	-	-	+
T054	-	-	-	+	-
T055	-	-	-	-	+
T056	-	+	-	-	-
T057	+	-	-	-	-
T058	-	-	-	-	+
T059	-	-	-	+	-
T060	+	-	-	-	-
T061	-	-	-	-	+
T062	-	-	-	+	-
T063	-	-	-	-	+
T064	-	-	-	-	+
T065	-	-	-	-	+
T066	-	-	+	-	-
T067	+	-	-	-	-
T068	-	-	-	-	+
T069	-	-	-	-	+

+ = Presencia Y - = Ausencia

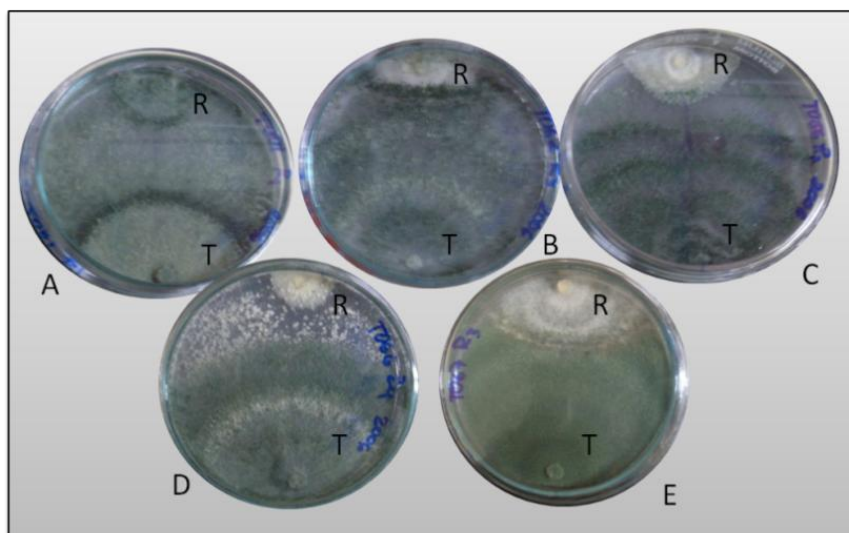


Figura 23. Tipos de capacidad competitiva de los aislados de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia*. A. 4; B. 3; C. 2; D. 1; E. 0.

5.4.4.1. Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* frente a *Trichoderma*.

Los resultados muestran que hay diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* ($p=0.000$ y C.V. 23.58). Para ello se empleó un diseño factorial, con 19 tratamientos y 4 repeticiones y un factor día. Para determinar el mejor tratamiento se aplicó la prueba de medias de Tukey (Cuadro 12), la cual muestra que hay 5 grupos homogéneos los cuales no tienen diferencias estadísticamente significativas dentro de ellos. El aislado más eficiente fue el T068, el cual logró inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia* en 65.1%, seguido de los aislados T059, T065, T063 y T055 con un porcentaje de inhibición de; 63.3%, 62.6%, 60.6% y 60.3% respectivamente a diferencia de los aislados T053 y T057 con un porcentaje de inhibición de 38.1% y 37.8% respectivamente siendo estos los menos eficientes (Figura 24). Algunos investigadores han encontrado inhibición de *Rhizoctonia* en más del 60%. Reyes *et al.*, (2008), encontraron que los aislados de *Trichoderma* evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre 83 y 34 % sobre *Rhizoctonia* sp. A diferencia de Soares y Faull (2000), los cuales encontraron que el crecimiento de *Rhizoctonia* fue inhibido en un porcentaje menor a 51%. Sin embargo se encontraron diferentes respuestas donde *Trichoderma* ejerce un nivel más alto de inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* y otros patógenos tal es el caso de, Escobar *et al.*, (2004), que observaron que la cepa Th650 de *Trichoderma* logró un porcentaje de inhibición entre 51 y 52% en *R. solani* y 46% en *Fusarium solani* y Michel (2001), observó 2 comportamientos

distintos, encontrando que la inhibición de crecimiento por parte de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum* fue de 0 a 69% y en *F. subglutinans* fue entre 0 y 73%.

Cuadro 12. Inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* por efecto de *Trichoderma*.

TRAT.	VDC	TRAT.	VDC
T068	65.071 a	T054	52.210 abcd*
T059	63.310 ab	T056	50.440 bcde
T065	62.597 ab	T058	50.129 bcde
T063	60.603 ab	T062	49.990 bcde
T055	60.278 ab	T069	45.914 cde
T001	58.870 abc	T066	44.731 cde
T061	58.756 abc	T067	39.403 de
T019	58.518 abc	T053	38.085 de
T060	56.846 abc	T057	37.825 e
T064	55.115 abc		

*Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.01)

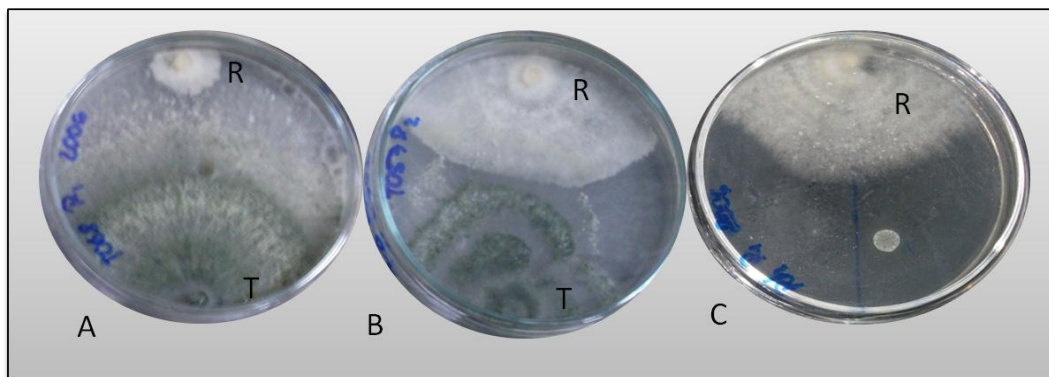


Figura 24. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* frente a *Trichoderma*. A. Aislado T068 (65.1%); B. Aislado T057 (37.8) y C. Aislado de *Rhizoctonia* (testigo).

5.4.4.2. Crecimiento de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia*.

Se realizó la comparación del crecimiento de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia* y cuando el crece solo, para observar si se produce algún efecto inhibitorio por parte de *Rhizoctonia*. En la figura 25 se puede observar diferentes comportamientos, algunos de los aislados como T001, T019 y T055 crecieron más rápidamente en cultivo dual que cuando se sembraron solos, esto puede ser a que *Trichoderma* dentro del proceso micoparasitico tiene una etapa

de crecimiento quimiotrófico donde puede detectar a distancia al patógeno y las hifas crecen en dirección al patógeno, debió a la respuesta a un estímulo químico por parte del patógeno (Infante *et al.*, 2009). El resto de aislados fueron afectados por la presencia del patógeno, es decir, que *Rhizoctonia* tiene algún efecto sobre la capacidad competitiva de *Trichoderma*, esto puede deberse a la capacidad de competir por nutrientes o espacio por parte de ambos hongos (Harman, 2000; Howell, 2003; Benitez *et al.*, 2004). Sin embargo el aislado T068 tuvo un comportamiento similar en el cultivo dual y el cultivo solo, donde el antagonista no se vio afectado por el crecimiento del patógeno. Esto muestra la capacidad competitiva y la velocidad de crecimiento de este aislado, ya que en las mismas condiciones de todos los aislados tuvo un comportamiento normal.

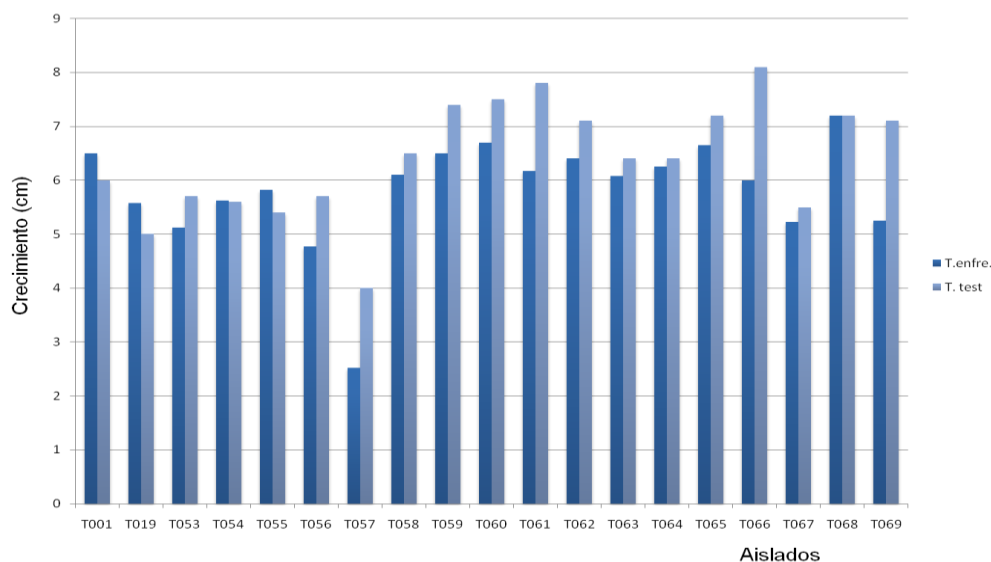


Figura 25. Crecimiento de *Trichoderma* en cultivos duales y solo.

5.4.5. Pruebas de antibiosis

5.4.5.1. Efecto de metabolitos volátiles

La producción de metabolitos volátiles por parte de los aislados de *Trichoderma* provocó la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* entre 25,5% y 64,1% en comparación con el testigo. Se empleó un diseño factorial, con 19 tratamientos y 5 repeticiones y un factor día. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados ($p = 0.0013$ y C.V. 3.46). Para determinar los mejores tratamientos se aplicó la prueba de medias Tukey, la cual mostró que hay 9 grupos homogéneos (Cuadro 13). Los mejores aislados fueron T064 con un porcentaje de inhibición de 64,1% seguido de T069 con 63.5% de inhibición, también se

observó que el aislado T019 y T057 inhibieron el crecimiento en 33.1% y 25.6% respectivamente, siendo estos los aislados menos efectivos (figura 26), esto puede deberse a la cantidad de sustancias y gases que se encuentran en el ambiente de la capsula, ya que se ha encontrado especies de hongos patogénicos que estimulan su crecimiento cuando se encuentran a altas concentraciones de dióxido de carbono. Sin embargo se ha encontrado respuestas de inhibición de las colonias de patógenos a los metabolitos de *Trichoderma*, dentro de ellos esta Siddiquee *et al.*, (2009) ellos observaron que la producción de metabolitos volátiles por parte de *Trichoderma* sobre *Ganoderma boninense* logró inhibir el crecimiento entre 24,5 % y 58,7 a los 6 DDI por otra parte Escobar *et al.*, (2004) observaron que el efecto de los metabolitos volátiles logró disminuir entre un 30,7 y un 5,5% el crecimiento de *R. solani* y en 12,8 y 5,3 % el crecimiento de *F. solani*, sin embargo Dal *et al.*, (1997) no encontraron ningún efecto sobre el crecimiento de *R. solani* y *Sclerotinia minor*, pero si la inhibió de la formación de esclerocios. Arias *et al.*, (2006) encontraron que mutates de *Trichoderma* spp. Inhibieron el crecimiento de *R. solani* y *Phytophthora nicotianae* entre 2,2-42 % y 0-55,55 % respectivamente. Eziashi *et al.*, (2006) encontraron que la colonia de *Ceratocystis paradoxa* se inhibía en un 64% por la producción de metabolitos de *T. viride*, así como también observaron que *T. aureoviride* solo inhibió el 2% del crecimiento. Se sabe que son muchas las sustancias metabolicas producidas por *Trichoderma* tales como; Gliotoxina, viridina, Pacibasina, Trichodermina, Alquil pirona entre otros que tiene un gran efecto inhibitorio en diferentes patógenos. (Howell *et al*, 1993; Horvath *et al*, 1995 y Fravel, 1998).

Además de la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* se evaluó microscópicamente el efecto de los aislados sobre las hifas de *Rhizoctonia*. Se pudo observar como una lisis o deshidratación de la hifa en casi todos los aislados, en otros aislados la hifa se ve como vacía y transparente. (Figura 27).

Cuadro 13. Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* por efecto de metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma*.

TRAT.	VDC	TRAT.	VDC
T064	64.111 a	T063	51.572 def*
T069	63.564 ab	T056	51.321 def
T059	60.981 abc	T061	47.608 efg
T067	60.532 abcd	T060	47.479 fg
T068	60.268 abcd	T065	40.020 gh
T053	56.866 abcde	T055	38.653 gh
T066	54.702 bcdef	T001	36.594 h
T062	54.010 cdef	T019	33.161 hi
T054	53.844 cdef	T057	25.590 i
T058	52.346 cdef		

*Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.01)

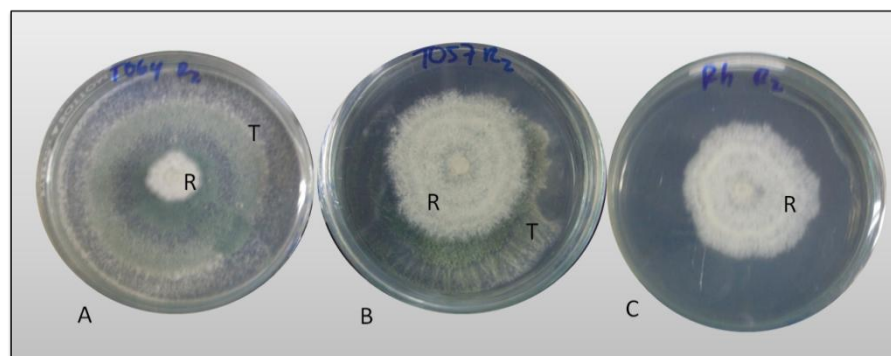


Figura 26. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* por el efecto de metabolitos volátiles de *Trichoderma*. A. Aislado T064, B. Aislado T057 y C. Testigo de *Rhizoctonia*.

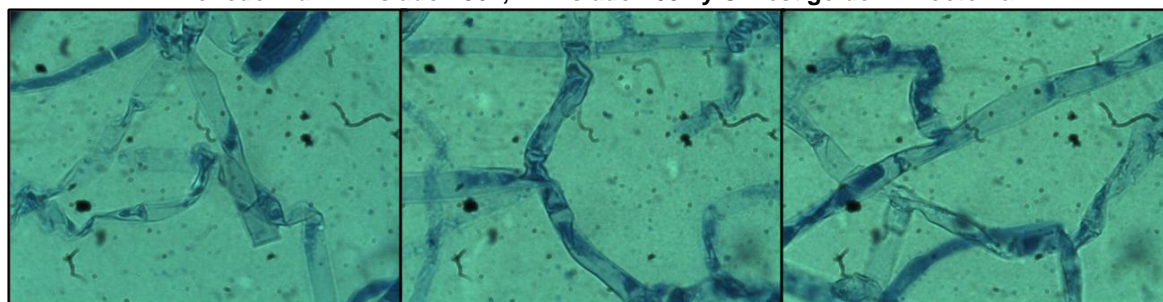


Figura 27. Hifas de *Rhizoctonia* afectadas por los metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma*.

De la misma manera como se evaluó el efecto de los metabolitos de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia*, se realizó una evaluación a cada aislado de *Trichoderma* para observar si había algún efecto en el crecimiento del mismo. Para ello se compararon los aislados en medio de cultivo solo y con *Rhizoctonia*. En la Figura 28 se puede observar que hubo un efecto de *Rhizoctonia* sobre *Trichoderma* ya que casi todos los aislados testigos crecieron más que los que se sembraron con *Rhizoctonia*, solo el aislado T001 no tuvo un efecto inhibitorio por parte del patógeno. Sin embargo los aislados T059, T061 y T066 tuvieron un crecimiento mayor en presencia del patógeno, es decir el crecimiento se vio de alguna forma estimulado por la presencia del patógeno.

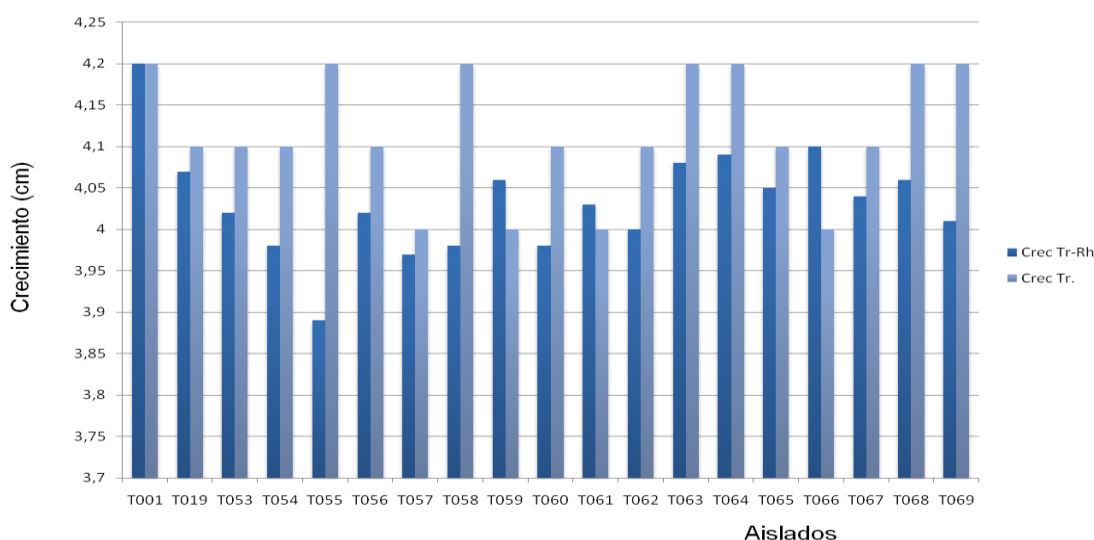


Figura 28. Crecimiento de *Trichoderma* en presencia de *Rhizocotnia* y solo.

5.4.5.2. Efecto de metabolitos no volátiles

Se empleó un diseño completamente al azar, con 19 tratamientos y 4 repeticiones, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.0000$ y C.V. 28.94). Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras se realizó la prueba de medias de Tukey, la cual muestra que hay 4 grupos homogéneos (Cuadro 14). Los mejores aislados fueron T063 y T068, los cuales lograron inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia* en 71.5% y 71.4% respectivamente, seguido de T067 con una inhibición del 65.3%, a diferencia de los aislados T057, T062 y T019 con una inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia* del 22.9, 19.5 y 17.33% respectivamente siendo así los menos eficientes (Figura 29). Se puede observar que las pruebas evaluadas, esta fue la que logró una inhibición más

alta en comparación a metabolitos volátiles y pruebas de enfrentamiento, así mismo, Escobar *et al.*, encontraron que uno de los aislados que evaluaron (Th650) logró inhibir en un 100% el crecimiento de *R. solani*, a diferencia de *F. solani* donde solo se logro inhibir en 28,4 % el crecimiento, a diferencia de Shafiquzzaman *et al.*, (2009), observaron que el efecto inhibitorio de *G. boninense* se logró solo en 40,16%. Arias *et al.*, (2006), observaron que el efecto de uno de los mutantes de *Trichoderma* estudiados fue de 100% de inhibición del crecimiento de dos aislados de *R. solani* y el *P. nicotianae*.

Al igual que en los metabolitos volátiles, se evaluó el efecto de los metabolitos en las hifas del patógeno, donde se observó todas las hifas hialinas pero con una coloración transparente como si estuvieran vacías por algún efecto, sin embargo a diferencia de los metabolitos no volátiles no se observó lisis o rompimiento de las hifas (Figura 30).

Cuadro 14. Prueba de medias para la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* por efecto de metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma*.

TRAT.	VDC	TRAT.	VDC
T063	71.525 a	T059	49.625 abcd
T068	71.400 a	T066	47.075 abcd
T067	65.300 ab	T053	42.500 abcd
T069	63.175 ab	T065	37.700 abcd
T056	61.400 ab	T060	34.600 bcd
T054	60.850 ab	T061	24.500 cd
T055	53.775 abc	T057	22.925 cd
T064	51.975 abcd	T062	19.550 cd
T058	50.425 abcd	T019	17.300 d
T001	50.075 abcd		

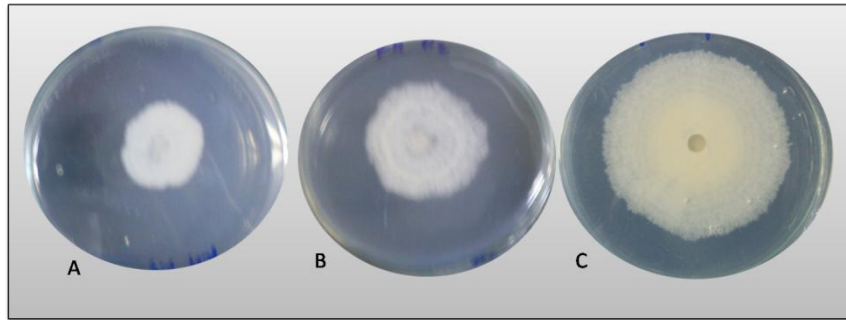


Figura 29. Efecto inhibitorio del crecimiento de *Rhizoctonia* mediante metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma*. A. Efecto de metabolitos producidos por el aislado T063, B. Efecto de metabolitos producidos por el aislado T019 y C. Crecimiento del testigo de *Rhizoctonia*.

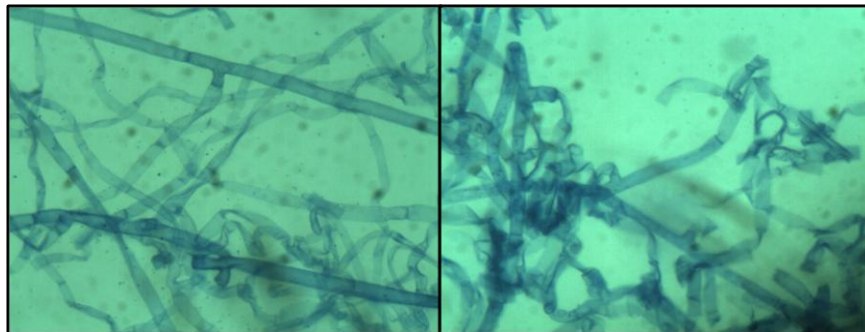


Figura 30. Hifas de *Rhizoctonia* afectadas por los metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma*

VI. CONCLUSIONES

Las características macro y microscópicas presentadas por los aislados de *Trichoderma* estudiados procedentes de los suelos de Timotes corresponde con las descritas para dicho género.

El aislado de *Rhizoctonia* evaluado fue capaz de producir síntomas de la pudrición basal y posteriormente ser reaislado en PDA, mostrando así que el aislado estudiado es el agente causal en la Zona de Timotes.

La caracterización hifal y morfológica del aislado de *Rhizoctonia* evaluado corresponde a las características bibliográficas y descritas en otras investigaciones, para *Rhizoctonia solani*.

Los resultados muestran que el uso de los aislados de *Trichoderma* como biocontrolador de el aislado *Rhizoctonia* spp estudiados ha sido efectivo. Se pudo observar que los aislados T055 y T019 (tratamientos 5 y 19) tuvieron la mayor velocidad de crecimiento, haciéndolos posibles candidatos eficientes a la hora de competir con *Rhizoctonia*.

En la interacción hifal los aislados de *Trichoderma* mostraron diferentes comportamientos tales como; lisis y crecimiento paralelo, los cuales fueron los más comunes en la mayoría de los aislados. También se observó que sólo los aislados T058, T068 y T067 (tratamientos 8, 18 y 17 respectivamente) mostraron tres diferentes efectos de interacción hifal al mismo tiempo sobre *Rhizoctonia*, haciéndolos los aislados más eficientes en cuanto a esta característica y pudiendo ser sugeridos para futuras investigaciones en este campo.

Algunos aislados de *Trichoderma* presentaron actividad micoparasítica sobre *Rhizoctonia*, haciéndose visibles la penetración y enrollamiento de la hifas.

El promedio de días de contacto de *Trichoderma* con *Rhizoctonia* fue de 3 a 4 días, esto nos da una ventaja a la hora de realizar un control, ya que tenemos una idea del tiempo en que se puede llegar a observar un efecto del biocontrolador sobre el patógeno.

En cuanto al grado de competencia, se observó que la mayoría de los aislados presentaron grado 4, excepto los aislados T057, T060 y T067 (tratamientos 7, 10 y 17) mostraron grado de competencia 0, es decir que estos aislados no lograron invadir la colonia del patógeno,

mostrando que su efecto de control se debe a su capacidad de competencia con el patógeno.

En cuanto a la inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia*, no se logró un efecto inhibitorio del 100%, sin embargo el aislado T068 inhibió el crecimiento en un 65,1% a diferencia del aislado T057 con un 37,825 %, cabe destacar que los aislados son efectivos para un control cuando logran más de un 50% de control. También se observó que *Rhizoctonia* produce un efecto sobre el crecimiento de *Trichoderma*, en algunos casos disminuyendo su crecimiento y en otros acelerándolo.

El crecimiento de *Rhizoctonia* se vio afectado por la producción de metabolitos volátiles y no volátiles producidos por los aislados T063 y T064, también se observó lisis en las hifas. Estos aislados se pueden utilizar como candidatos para la extracción de metabolitos y posteriormente se usados como fungicidas biológicos.

Los aislados T068, T065, T063 y T059 deben ser usados en posteriores investigaciones, ya que fueron los que mayor información aportaron en esta investigación, habiéndolos sobresalientes en las diferentes pruebas realizadas y se podría utilizar para preparar biopreparados para el control de *Rhizoctonia*.

VII. RECOMENDACIONES.

Realizar ensayos en campo o invernadero con los aislados T068, T065, T063 y T059 sobre *Rhizoctonia*,

T068 puede ser muy efectivo para el control del aislado de *Rhizoctonia* (usado en esta investigación) a nivel de campo.

Utilizar en próximos ensayos varios aislados de *Rhizoctonia*. Teniendo en cuenta la gran variabilidad genética que tiene este patógeno.

Usar los aislados T063 y T068 para extracción de metabolitos en investigaciones futuras.

Emplear los aislados T055 y T069 en próximas investigaciones con diferentes patógenos, debido a su velocidad de crecimiento cuando se encuentran solos.

Preparación de biopreparados con los aislados T068, T065, T063 y T059, para ser usados en el control de enfermedades causadas por *Rhizoctonia* spp.

Evaluar el efecto que pueden producir los patógenos sobre *Trichoderma*, ya que en esta investigación se pudo observar que si existe algún efecto y esto nos da un mejor resultado a la hora de escoger un aislado candidato como controlador.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ACEVEDO, R. 1995, Control biológico de la pudrición blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum* Berk) utilizando el micoparásito *Trichoderma* spp., Trabajo de ascenso, Universidad Nacional Experimental Del Táchira, 22 pp.

AGUILAR, J. ARCIA, A. 2009. Parcelas demostrativas: Visión sustentable para la producción de hortalizas en Timotes, Estado Mérida. Resumen Congreso Venezolano de Fitopatología. 23 (2): 129.

AGNEW, K. 2000. Crop Profile for Lettuce in Arizona [en línea]. URL <<http://cipm.ncsu.edu/cropprofiles/docs/azlet,tuce.html> > [Consulta 25 febrero 2008]

AGRIOS, G. 1995. Fitopatología. Segunda edición. Grupo Noriega Editores, México. Pp 452-458

AGRONEWS; 2006. Lechuga. Bayer CropScience [en línea]. URL <http://www.ciberformacion.net./cifea/moodle//file.php/76/Agronews_06-49_1_.pdf> [Consulta 05 marzo 2008]

ALLEM, D Y LENNE, J. 1998. The pathology of food and pasture legumes. New York. CAB-International. pp 150-152,572-573.663-667.

ALMODOVAR, W. 1998. Enfermedades de los Hidroponicos. Clínica al día [en línea]. URL <<http://www.uprm.edu/agricultura/sea/clinica/CldiaEnfHidrop.pdf>> [Consulta 05 marzo 2008]

ARIAS, M.; HERRERA, R., BESOÁIN, X., PÉREZ, L. Y MONTEALEGRE, J. 2006. Evaluación *in vitro* de mutantes de cepas de *Trichoderma* para el control de *Rhizoctonia solani* , y *Phytophthora nicotianae* en tomate. Boletín micológico. 21: 71-75.

ASKWE, D. AND LAING, M. 1994. The in vitro screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant and soil*. 159: 277-281.

BAUTISTA, G.; MENDOZA, H. y URIBE, D. 2007. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta biológica colombiana* 12 (1) pag. 19-32.

BELTRÁN, C y GARCÉS, E. 2000. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani kühn.* en papa bajo condiciones de casa de malla. *Acta biológica colombiana* 10 (1): 79

BENHAMAOU, N. AND CHET, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultraestructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology*.83 (10): 1062-1071.

BENITEZ, T. ; RINCON, A.; LIMON, C. AND CONDON, A. 2004 Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Universidad de Sevilla. España Internattional Microbiology*. 7: 249-260.

CALETINE, R. 2001. Lecttuce (*Lactuca*) *Rhizoctonia solani* Fungi, Basidiomycetes. [en línea]. URL <<http://www.ct.gov/caes/cwp/view.asp?a=2823&q=377786>> [Consulta 20 marzo 2008]

CARLING, D., KUNINAGA, S. AND BRAINARD, K. 2002 (a). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-Internal Transcribed Spacer Sequences, and virulence levels among subses of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*. 92(1):43-50.

CARLING, D., BAIRD, R., GITAITIS, R., BRAINARD, K. AND KUNINAGA, S. (2002)(b). Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Plant disease*. 92 (8):893-899.

CASTRO U., I. 2005. Identificación de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn aislados desde papa (*Solanum tuberosum* L.), en la Décima Región de Chile. Tesis para optar al grado de Licenciado en Agronomía. [en línea]. URL <<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fac355i/doc/fac355i.pdf>> [Consulta 02 febrero 2009]

CASTRO, M.Y RIVILLAS, C. 2005 Bioregulación de *Rhizoctonia solani* en germinadores de café. Boletín cenicafé. Avance técnico n° 336 [en línea]. URL <<http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=19,95,0,0,1,0>> [Consulta 15 febrero 2008]

CEDEÑO, L., CARRERO, C., QUINTERO, K., ARAUJO, Y., PINOY, H., y GARCÍA, R. 2001 Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. Revista INTERCIENCIA. 26 (7): 296-299.

COOK R. AND BAKER, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The Am. Phytop. Soc. U.S.A. 539 p.

CÚNDOM, M.; MAZZA, S.; GUITIERREZ, S. y MAZZANTI, M. 2003a. Evaluación de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* *in vitro* e invernadero. Facultad de ciencias agrarias UNNE. [en línea]. URL < <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/5-Agrarias/A-051.pdf> > [Consulta 02 abril 2008].

CÚNDOM, M.; MAZZA, S.; GUITIERREZ, S. 2003. Selection of *Trichoderma* spp. Isolates against *Rhizoctonia solani*. Comunicación corta. Spanish Journal of Agricultural Research. 1 (4): 79-82.

DAL B., G.; MONACO, C. Y CHEVES, A. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. Revista Iberoamericana de Micología. 14: 131-1345.

ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; AND HENIS, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma spp.* on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* – scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology. 73 (1):85-88

ESCOBAR, P.; MONTALEGRE, J. Y HERRERA, R. 2004. Respuesta in vitro de cepas de *Trichoderma harzianum* frente a Fe³⁺, salinidad, pH y temperatura, con el fin de ser utilizadas en control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate. Boletín micológico vol. 19: 95-102.

ESIASHI, E.; UMA, N.; ADEKUNLE, A. AND AIREDE, C. 2006. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. African Journal of Biotechnology. 5 (9): 703-706.

FIDDAMAN, P. AND ROSSALL, S. 1995. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizoctonia solani* in oilseed rape (*Brassica napus*). Plant Pathology, 44: 695-703.

GROSCH, R., FALTIN, F., LOTTMANN, J., KOFOET., A. AND BERG, G. 2005. Effectiveness of 3 antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kühn on lettuce and potato. Canadian Journal of Microbiology. [en línea]. URL <[http://rparticle.webp.cisti.nrc.ca/rparticle/AbstractTemplateServlet.,?journal=cjm&volume=51&year=&issue=&msno=w05-002&calyLang=eng](http://rparticle.webp.cisti.nrc.ca/rparticle/AbstractTemplateServlet.?journal=cjm&volume=51&year=&issue=&msno=w05-002&calyLang=eng)> [Consulta 02 abril 2008].

GUTIERREZ, B., GONZALEZ, M Y SALIH A. 2006. Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L). Bioagro, 18: 63 - 64.

HARMAN, G. 2000. "*Trichoderma* spp., including *T.harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system)", [en línea]. Cornell. Dirección URL<<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.htm>>. [Consulta 05 abril 2008].

HARMAN, G. BJORKMAN, T., ONDIK, K. Y 2008. Changing paradig[ums on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. Departament of Horticultural Sciencs, Cornell University, Geneva, NY, USA. Pag. 1-6.

HOWELL, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the Biological Control of Plant Diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 83 (1) 4-10.

HOWELL, C., HANSON, L., STIPANOVIC, R. Y PUCKHABER, L. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 90: 248-252.

INDEX FUNGORUM [en línea]. CABI Bioscience 2006, Dirección URL:<<http://www.indexfungorum.org/Names/IndexFungorumPartnership.htm>> [consulta: 05 de abril.2008].

INGLIS D., ANTONELLI, A., AND MILLER, W. 2000. Crop Profile for Lettuce in Washington. [en línea]. URL <<http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/docs/Walet.,tuce.htm>> [Consulta 20 marzo 2008]

INFANTE, D.; MARTINEZ, B.; GONZALEZ, N. Y REYES, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Artículo de reseña. *Rev. Protección vegetal*. 24 (1): 14-21.

INSTITUTO COLOMBIANO DE AGRICULTURA (ICA), s.f. *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. (Basidiomycota: Basidiomycet.,es: Ceratobasidiales: Ceratobasidiaceae). (Teleomórfico). [en línea] URL <<http://www.ica.gov.co/publicaciones/plagas/aster/asterendemica/aster61.htm>> [Consulta 20 marzo 2008]

INFOAGRO, 2009. El cultivo de la lechuga. [en línea] URL <<http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>> [Consulta 03 febrero 2009]

KERNS, D.; MATHERON, M.; PALUMBO, J.; SANCHEZ C.; STILL, D.; TICKES, B.; UMEDA, K. AND WILCOX, M. 1999. Guidelines for Head Lettuce Production in Arizona. IPM Series Number 12. Publication number 1099. University of Arizona, Tucson, Arizona. [en línea] URL <<http://cals.arizona.edu/crop/veget.,ables/cropmgt/az1099.html>> [Consulta 20 marzo 2008]

KUEPPER, G. BACHMANN, J., AND THOMAS, R. 2004. Producción Orgánica de Lechugas de Especialidad y Verduras Para ensalada. [en línea] URL <<http://attra.ncat.org/espanol/pdf/Lechugas.pdf>> [Consulta 20 marzo 2008].

LELAY, Y.; RUANO, R. Y LOPEZ, C. 2007. Estudio de compatibilidad *in vitro* de aislados monoconídicos de *Trichoderma* sp. potenciales agentes de biocontrol de la podredumbre blanca del aguacate. Actas VI Congreso Mundial del Aguacate: Viña del Mar, Chile. [en línea] URL < <http://www.avocadosource.com/WAC6/es/Extenso/2b-80.pdf> > [Consulta 15 abril 2010].

MALLAR, A. 1978. La lechuga. Editorial Hemisferio Sur. Primera Edición. pp 2-51

MAROTO, J. 2000 Horticultura. 4ta Edición. pp. 215-231.

MARTÍNEZ, Z. 2008. Algunos aspectos epidemiológicos del moho blanco de la lechuga (*Lactuca sativa*) en dos municipios productores de Cundinamarca. Trabajo de Grado para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Pag. 57-58 y 63-66. [en línea] URL <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis110.pdf> > [Consulta 10 febrero 2009]

MARTÍNEZ, B.; REYES, Y.; INFANTE, D.; GONZÁLEZ, E.; BAÑOS, H. Y CRUZ A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. Candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Rev. Protección vegetal 23 (2): 118-125.

MÚLLER, A. 1941. Reconocimiento de las enfermedades de las plantas en Venezuela 1937-1941. Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. N° 8. Venezuela. pp 100-113.

MESA-MOLLER, A.; ESQUEDA, M.; GARDEA, A.; TIZNADO, M. y VIERGEN-CALLEROS G. 2007. Variabilidad morfológica, patogénica y susceptibilidad a fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de rizósfera de *Vitis vinifera* var. Perlette seedless. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Revista Mexicana de micología 24: 1-7

MICHEL, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp (Euascomycet.,es: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycet.,es: Hyphales). Tesis para optar al grado de Doctor en ciencias: área de Biotecnología. Universidad de Colima, México. [en línea] URL <http://digeset...ucol.mx/tesis_posgrado/pdf/Alejandro.%20Casimiro%20Miche%20Aceves.pdf > [Consulta 23 enero 2009].

OCHOA, M. 2002. Antibiosis y mycoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Hyphomycetes: Hyphales); sobre *Mycosphaerella fijensis* (Loculoascomycetes: Dothideales). Tesis para optar al grado de Maestría en ciencias: Área de Biotecnología de la Universidad de Colima, México. [en línea] URL

<http://digeset...ucol.mx/tesis_posgrado/pdf/Maria.%20Ochoa%20Moreno.pdf > [Consulta 23 enero 2009].

PERDOMO, R., HERNANDEZ, A., GONZALEZ, A., PINEDA, J. Y ALEZONES, J. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia*, 32 (1), p.48-54.

PEREZ, L.; RONDON, T.; GUTIERREZ, G. Y PUPO, A. 2005. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* (Rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (Sacc) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad* volumen 9 (3): 57-60

PERNEZNY, K. AND RAID R. 2006. Management Guide: Lettuce and Endive. Florida Plant Disease. [en línea]. URL < <http://edis.ifas.ufl.edu/pg048> > [Consulta 20 marzo 2008].

PINEDA, J., CARRASCO, A., Y RANGEL, M. 2005. Incidencia de Roya Blanca (Albugo candida) en brasicas de la región andina Venezolana. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado estado Lara-Venezuela. Resumen. [en línea]. URL <<http://www.cedaf.org.do/eventos/ISTHresumenes/pdf/20.pdf> > [Consulta 10 de abril del 2010].

RANASINGH, N., SAURABH, A. AND NEDUMCHEZHIAN, M. 2006. Use of Trichoderma in Disease Management. Orissa Review. [en línea]. URL <<http://www.orissa.gov.in/e-magazine/Orissareview/sept-oct2006/engpdf/68-70.pdf>> [Consulta 20 febrero 2008].

RANKIN, L.1986. Lettuce Disease Survey in New Brunswick, [en línea]. URL <[http://www.cps-scp.ca/download/cpds-archive/vol67/CPDS_Vol_67_No_2_\(25-30\)1987.pdf](http://www.cps-scp.ca/download/cpds-archive/vol67/CPDS_Vol_67_No_2_(25-30)1987.pdf)> [Consulta 20 febrero 2008]

REYES, Y.; MARTÍNEZ, B. Y INFANTE, D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Rev. Protección Vegetal 23 (2): 112-117.

RINCÓN G., A.; LEGUIZAMON C., J Y ARBELAEZ T., G. 1992. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* spp. en semilleros de café. CENICAFE, 43 (3): 78-83.

ROSERO, G. 2008. Evaluación de cuatro cepas de *Trichoderma* sp. Y sus combinaciones para el control de *Fusarium* sp. en sandía (*Citrullus lanatus*). Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. [en línea]. URL <http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2008/T2655.pdf>[Consulta 10 abril 2010].

ROUSELL, P. Y CROSNIER, J. 1999. La patata. Ediciones Mundi Prensa. España. pp 5365 ; 131-159 y 297-302

SAMUELS, G. J. 1996. *Trichoderma* a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research, 100: 923-935.

SCAGLIA, E.; VEGA, M. y SALTO C. 2004. Lechuga tipo "de hoja". Prácticas para una producción continúa a campo. Anuario de Agronomía. [en línea]. URL <http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2003/a2003_p136.htm> [Consulta 5 abril 2008].

SCARSELETTI, R. Y FAULL, J. 1994. In vitro activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mycological Research, 98, 1207-1209.

SHAFIQUZZAMAN, S.; UMI, K.; KAUSAR, H. Y SARWAR, J. 2009. In vitro studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. Journal of food, Agriculture & Environment. 7 (3 y 4): 970-976.

SNEH, B; BURPEE, L. AND OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society, St, Paul, Minnesota, USA. pp 18.

SOARES, I AND FAULL, J. 2000. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. Ciencia agrícola. 57 (1):

STEFANOVA, M.; LEIVA, A.; LARRINAGA, M. Y CORONADO, M. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista de la facultad de Agronomía (LUZ). Volumen 16 pag: 509-516.

STOJSIN, V., BUDAKOV, D., JACOBSEN, B., GRIMME, E., BAGI, F AND JASNIC, S. 2007. Identification of *Rhizoctonia solani* from sugar beet roots by analyzing the its region of ribosomal DNA. Proc. Nat. Sci. 113: 161-171.

STRASHNOW, Y., ELAD, A. SIVAN A. Y CHET., I. 1985. Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichoderma harzianum*. Plant Pathology volume 34. Pp. 146-151.

VALENZUELA, H., KRATKY y CHO, J. S.F.. Lettuce Production Guidelines for Hawaii. Associate Extension Vegetable Specialist, Horticulturalist, and Plant Pathologist, CTAHR, University of Hawaii. [en línea]. URL <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/reports/lettuce_prod.htm> [Consulta 5 abril 2008].

VILLEGAS, 2002 Trichoderma pers. características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. [en línea]. URL <<http://www.oriusbiotecnologia.com/portal/content/view/12/21/>> [Consulta 5 abril 2008].

YANG, G.; NATTO, S. AND DONG, W. 2006. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. Causing wirestem of *Betula nigra* in China. *Phytopathology*, 154: 80-83.

YILDIZ, A and TIMUR, D. 2002. Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kuhn (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) Isolates from tomatoes (?) grown in Aydin, Turkey and their Disease reaction on various Tomato cultivars. *Phytopathology*, 150, 526-528.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento de los diferentes aislados de *Trichoderma*.

Source	DF	SS	MS	F	P
REP	3	1.51	0.504		
DIAS	5	3254.47	650.895		
REP*DIAS	15	1.77	0.118		
AISL	18	71.13	3.952	7.17	0.0000
Error	414	228.25	0.551		
Total	455	3557.14			

Grand Mean 6.8861 CV 10.78

Anexo 2. Análisis de varianza para la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* frente a *Trichoderma*

Source	DF	SS	MS	F	P
REP	3	34093	11364.5		
DIAS	5	83613	16722.7		
REP*DIAS	15	9433	628.9		
AISL	18	32466	1803.6	11.51	0.0000
Error	414	64880	156.7		
Total	455	224486			

Grand Mean 53.089 CV 23.58

Anexo 3. Análisis de varianza para la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* por efecto de metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma*

Source	DF	SS	MS	F	P
REP	4	10581	2645.30		
DIAS	9	86993	9665.85		
REP*DIAS	36	7432	206.44		
AI SL	18	106444	5913.54	42.69	0.0013
Error	882	122181	138.53		
Total	949	333630			

Grand Mean 50.170 CV 23.46

Anexo 4. Análisis de varianza para la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia* por efecto de metabolitos no volátiles producidos por *Trichoderma*.

Source	DF	SS	MS	F	P
AI SL	18	21091.4	1171.74	6.29	0.0000
Error	57	10610.6	186.15		
Total	75	31702.0			

Grand Mean 47.141 CV 28.94