

HN
T
6324
H6624
Ej-1

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA DE DIFERENTES AISLAMIENTOS
DEL HONGO Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli
EN EL MUNICIPIO DE PASTO, DEPARTAMENTO DE NARIÑO

Por

EDINSON ARANGO PRADO
"

Tesis de Grado presentada como requisito parcial
para optar al título de
INGENIERO AGRONOMO
UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Presidente de Tesis
BENJAMIN SANUDO S., I.A.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS
PASTO - COLOMBIA
1982

HN
T

632.4
A662d
Ej. 1

DEDICO A :

"Las ideas y conclusiones aportadas
en la Tesis de Grado, son de respon-
sabilidad exclusiva de su autor".

Artículo 10. del Acuerdo No. 324 de
Octubre 11 de 1966, emanado del Ho-
norable Consejo Directivo de la Uni-
versidad de Nariño.

EDINSON AKANGO PRADO

DEDICO A :

MIS PADRES

YOLANDA DIAZ A.

MIS HERMANOS

MIS FAMILIARES

MIS AMIGOS

EDINSON ARANGO PRADO

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades	3
AGRADECIMIENTOS A :	
2.1.1 Relaciones entre microorganismos	3
2.1.2 Efectos antagónicos	3
2.1.3 Antibióticos	3
BENJAMIN SAÑUDO SOTELO, I.A.	
VICTOR MONTENEGRO G., I.A., M. Sc.	
2.2 Microorganismos antagónicos	3
EFREN CORAL QUINTERO, Ph. D.	
2.3 Estudios sobre el antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp.	6
ARMANDO RAMOS ORDONEZ, I.A.	
III. MATERIALES Y METODOS	11
3.1 Etapa de laboratorio	11
LUIS A. MOLINA V., I.A., M. Sc.	
3.2 Nivel de materos	12
WALTER VALLEJO G.	
3.3 Nivel de campo	13
ORLANDO QUIJANO S.	
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	15
4.1 Etapa de laboratorio	15
LUCY AGUILERA R.	
4.1.1 Antagonismo en siembras sucesivas	15
4.1.2 Antagonismo sobre	15
de <i>T. reesei</i>	15
La Facultad de Ciencias Agrícolas de	
la Universidad de Nariño	
4.2 Antagonismo a nivel de materos	15
4.3 Antagonismo a nivel de campo	15
Todas aquellas personas que en una u	
otra forma contribuyeron a la culmina	
ción del presente trabajo.	
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	21
5.1 Conclusiones	21
5.2 Recomendaciones	23
VI. RESUMEN	35
SUMMARY	35
VII. BIBLIOGRAFIA	42

TABLAS

		Pág.
TABLA	VI. Análisis de variancia para los promedios de plantas de frijol voluble Mortiño sanas en	
TABLA	I. Número de plantas de frijol voluble Mortiño sanas, en la época de floración obtenidas por el antagonismo de 18 cepas del hongo <u>Trichoderma</u> , bajo dos métodos de inoculación sobre <u>Fusarium oxysporum</u> forma <u>phaseoli</u> en materos	Pág. 25 17
TABLA	VII. Comparación de los promedios de plantas de	
TABLA	II. Análisis de variancia para el promedio de plantas sanas de frijol voluble Mortiño, en la época de floración obtenidas por el antagonismo de 18 cepas de <u>Trichoderma</u> sobre <u>Fusarium oxysporum</u> forma <u>phaseoli</u> en materos	18
TABLA	VIII. Comparación de los promedios de plantas de frijol voluble Mortiño sanas en la época de floración, obtenidas con dos métodos de antagonismo de 18 cepas de <u>Trichoderma</u> sobre <u>Fusarium oxysporum</u> forma <u>phaseoli</u> en materos. Prueba de Tukey	19
TABLA	IV. Comparación de los promedios de plantas de frijol voluble Mortiño sanas, en la época de floración obtenidas con la inoculación de 18 cepas de <u>Trichoderma</u> sobre <u>Fusarium oxysporum</u> forma <u>phaseoli</u> en materos. Prueba de Tukey .	21
TABLA	V. Número de plantas de frijol voluble Mortiño sanas en la época de fructificación obtenidas por el antagonismo de 7 cepas del hongo <u>Trichoderma</u> sobre <u>Fusarium oxysporum</u> forma <u>phaseoli</u> con dos métodos de inoculación en condiciones de campo	24

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA DE DIFERENTES AISLAMIENTOS
DEL HONGO Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli
EN EL MUNICIPIO DE PASTO, DEPARTAMENTO DE NARIÑO (1)

En base a lo anterior, el presente trabajo se realizó para cumplir con los siguientes objetivos:

Por

1.1 Estudiar la capacidad antagónica de 18 aislamientos del hongo Trichoderma spp. sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli en el laboratorio

EDINSON ARANGO PRADO

1.2 Determinar el efecto antagónico en materia de incorporación de Trichoderma spp.

I. INTRODUCCION

El amarillamiento del frijol, causado por el hongo Fusarium oxysporum forma phaseoli, se ha constituido en la enfermedad más importante para las variedades de enredadera, cultivadas en las regiones frías del Sur del Departamento de Nariño, hasta tal punto, que el área de producción se ha reducido notablemente.

Los agricultores de estas regiones cambian con frecuencia las variedades susceptibles a la enfermedad, sin encontrar tolerancia; igualmente, las medidas de control químico no han dado resultados económicos rentables. Estos hechos justifican el estudio de otras medidas de control del patógeno que conlleve resultados positivos para el agricultor.

En el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, se ha logrado el aislamiento, cultivo y conservación de diferentes cepas del hongo Trichoderma spp. las cuales han demostrado buen efecto antagónico

(1) Tesis de Grado presentada como requisito parcial, para optar al título de Ingeniero Agrónomo, bajo la presidencia de Benjamín Sañudo S. I.A.

contra diferentes hongos del suelo, patógenos de plantas cultivadas. Por otra parte, no se han hecho evaluaciones respecto a especies de Fusarium, patógeno del frijol.

2.1 Generalidades

En base a lo anterior, el presente trabajo se realizó para cumplir con los siguientes objetivos :

2.1.1 Relaciones entre microorganismos

1.1 Estudiar la capacidad antagónica de 18 aislamientos del hongo Trichoderma spp. sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli, a nivel de laboratorio y antagónicas. Estas últimas se denominan antibiosis y se presentan cuando un organismo impide o inhibe el desarrollo de otros (2).

1.2 Determinar el efecto antagónico en materos, con dos métodos de incorporación de Trichoderma spp. en suelo infestado con el patógeno

1.3 Estudiar el antagonismo de aislamientos promisorios de Trichoderma spp. sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli en condiciones de campo

Wakeman (31) indica que las interrelaciones antagónicas son muy comunes entre la microvida que habita el suelo, afectando directamente o indirectamente la actividad de otros microorganismos. Estas relaciones son :

a. La competencia por el aprovechamiento de nutrientes

b. La formación de condiciones, principalmente de carácter químico, que son adversas para el crecimiento de otros microorganismos

c. La producción por parte del organismo, de sustancias específicas tales como antibióticos, alcoholes y quinonas, que perjudican el crecimiento de otros

d. El parasitismo directo de un organismo sobre otro: este caso es más notorio en hongos y bacterias

e. El efecto depredador, como el observado en la destrucción de bacterias por protozoarios, de hongos por insectos y de nemátodos por nemátodos

II. REVISIÓN DE LITERATURAS por un aspecto vital

2.1 Generalidades

Molina (23), el control biológico se puede sintetizar en las siguientes formas :

2.1.1 Relaciones entre microorganismos

a. Antagonismo. Consiste en que un organismo influye a otro en forma negativa; este mecanismo se lleva a cabo con organismos saprófitos que actúan sobre los patógenos

Entre los seres vivos, los microorganismos especialmente, establecen relaciones ecológicas que pueden ser neutrales, metabióticas, sinérgicas y antagónicas. Estas últimas se denominan antibiosis y se presentan cuando un organismo impide o inhibe el desarrollo de otros (2).

Un organismo que actúa sobre otro; se han encontrado diferentes formas de parasitismo de bacterias, hongos y virus, sobre patógenos de plantas

2.1.2 Efectos antagónicos

c. Hipovirulencia. Cuando se inocular una cepa hipovirulenta del patógeno alrededor de una lesión obtenida con una cepa virulenta, impidiendo el avance de la enfermedad

Waksman (31) indica que las interrelaciones antagónicas son muy comunes entre la microvida que habita el suelo, afectando directa o indirectamente la actividad de otros microorganismos. Estas relaciones son :

d. Preinoculación o protección cruzada. Fenómeno observado en el caso de virus y hongos y consiste en inocular una planta con cepas avirulentas y luego con cepas virulentas, dando una protección contra la raza virulenta

a. La competencia por el aprovechamiento de nutrientes
b. La formación de condiciones, principalmente de carácter químico, que son adversas para el crecimiento de otros microorganismos

2.1.3 Antibióticos

c. La producción por parte del organismo, de sustancias específicas tales como antibióticos, alcoholes y quinonas, que perjudican el crecimiento de otros organismos vivos, la cual, actuando en muy bajas concentraciones, posee propiedades tóxicas, inhibitorias o letales y selectivas sobre otros microorganismos

d. El parasitismo directo de un organismo sobre otro; este caso es más notorio en hongos y bacterias

e. El efecto depredador, como el observado en la destrucción de bacterias por protozoarios, de hongos por insectos y de nemátodos por nemátodos

f. La lucha de los microorganismos por un espacio vital cuenta, ácido gliadónico, gliotoxina, griseofulvina, ácido micofenólico, viridina, penicilina, patulina y estreptomicina, son producidos en

Según Molina (23), el control biológico se puede sintetizar en las siguientes formas:

por la actividad microbiana, por fenómenos de adsorción de los constituyentes del suelo y por otros procesos de naturaleza química.

a. Antagonismo. Consiste en que un organismo influye a otro en forma negativa; este mecanismo se lleva a cabo con organismos saprófitos que actúan sobre los patógenos

Cercos (3) afirma que es posible la producción y conservación de antibióticos en suelos esterilizados, a los cuales se agregaron abonos verdes y/o carbohidratos.

b. Hiperparasitismo. Está dado por el parasitismo de un organismo que actúa sobre otro; se han encontrado diferentes formas de parasitismo de bacterias, hongos y virus, sobre patógenos de plantas

c. Hipovirulencia. Cuando se inocula una cepa hipovirulenta del patógeno alrededor de una lesión obtenida con una cepa virulenta, impidiendo el avance de la enfermedad

d. Premunición o protección cruzada. Fenómeno observado en el caso de virus y hongos y consiste en inocular una planta con cepas avirulentas y luego con cepas virulentas, dando una protección contra la raza virulenta.

bacteria o el antibiótico y su siembra en suelo infestado con *Rhizoctonia solani*, incrementaron la germinación de 30 a 79% y de 13 a 70%, respectivamente.

2.1.3 Antibióticos

Según Cercos (3), el antibiótico es una sustancia química producida por organismos vivos, la cual, actuando en muy bajas concentraciones, posee propiedades líticas, inhibitorias o letales y selectivas sobre otros microorganismos vivos. Los antibióticos actúan de tal forma que paralizan la multiplicación celular pudiendo llegar a matar la célula.

Según Howell y Stripanovic (14), una raza de *Bordetella pertussis* cepa antagonista del *Rhizoctonia solani*, fue aislada de la rizosfera de plantas de algodón atacadas por el hongo. La bacteria produce un antibiótico denominado pirrolnitrina, que además de *Rhizoctonia solani* inhibió otros hongos del

Según Howell y Stripanovic (14), una raza de *Bordetella pertussis* cepa antagonista del *Rhizoctonia solani*, fue aislada de la rizosfera de plantas de algodón atacadas por el hongo. La bacteria produce un antibiótico denominado pirrolnitrina, que además de *Rhizoctonia solani* inhibió otros hongos del

Frank Waksman (31) menciona que los antibióticos abidina, frecuentina, ácido gladiólico, gliotoxina, griseofulvina, ácido micofenólico, viridina, penicilina, patulina y estreptomicina, son producidos en forma natural y abundante, inactivándose en el suelo por efectos del pH, por la actividad microbiana, por fenómenos de adsorción de los constituyentes del suelo y por otros procesos de naturaleza química.

Vargas Cercos (3) afirma que es posible la producción y conservación de antibióticos en suelos esterilizados, a los cuales se agregaron abonos verdes y/o carbohidratos.

Kommandahl y Chang New (19) reportan que semillas de maíz protegidas con Bacillus subtilis y el hongo Chaetomium globosum, ejercieron protección parcial contra Fusarium roseum forma graminearum.

2.2 Microorganismos antagónicos

Según Howell y Stipanovic (14), una raza de Pseudomonas fluorescens antagónica del Rhizoctonia solani, fue aislada de la rizosfera de plantas de algodón atacadas por el hongo. La bacteria produce un antibiótico denominado pirrolnitrina, que además de Rhizoctonia solani inhibió otros hongos del complejo Damping-off como Thielaviopsis basicola, Alternaria sp. y Verticillium dahliae. Dicho antibiótico inhibió parcialmente a Fusarium sp., pero no a Pythium ultimum. Tratamientos de semillas de algodón con la bacteria o el antibiótico y su siembra en suelo infestado con Rhizoctonia solani, incrementaron la germinación de 30 a 79% y de 13 a 70%, respectivamente.

Howell y Stipanovic (15) determinaron que la raza Pf-5 de Pseudomonas fluorescens fue antagónica in vitro de Pythium ultimum. El antibiótico Pyoluteorina, aislado de la bacteria, fue el responsable de la inhibición del hongo anotado, pero no de Rhizoctonia solani. Tratamientos de semilla de algodón con el antibiótico o con la bacteria, incrementaron la germinación de 33 a 65% y de 28 a 71%, respectivamente, en suelo infestado con Pythium ultimum.

Fravel y Spurr (8) probaron 16 bacterias aisladas de hojas de tabaco, por su efecto "in vitro" sobre la germinación y el desarrollo de tubos germinativos de las esporas, de tres aislamientos de Alternaria alternata. De ellas, la más efectiva para inhibir al hongo y reducir las lesiones en hojas, fueron Pseudomonas maltophilia y Bacillus cereus subespecie mycoides.

Waksman (31) da una lista de microorganismos antagonicos de patógenos de Vargas (30) encontró que la bacteria Bacillus cereus fue más efectiva, que un aislamiento del hongo Trichoderma sp., para el biocontrol de Rhizoctonia solani en repollo. Organismos afectados

Kommendahl y Chang New (19) reportan que semillas de maíz protegidas con Bacillus subtilis y el hongo Chaetomium globosum, ejercieron protección parcial contra Fusarium roseum forma graminearum.

Kommendahl y Windels (20) anotan que de 109 hongos y bacterias aislados de raíces y semillas de arveja, probados contra Fusarium solani, Rhizoctonia solani, Aphanomyces euteiches y Fusarium oxysporum, el hongo Penicillium oxalium resultó el más efectivo bajo condiciones de invierno.

De acuerdo con Hoch y Abawi (13), un aislamiento de Corticium sp., fue altamente efectivo en el control pre y postemergente del Damping off en remolacha de mesa, causado principalmente por Pythium ultimum en suelos naturalmente infestados. El antagonico se hizo crecer en harina de hojas de maíz e incorporado en una proporción del 0,5 al 10% de volumen de harina a volumen suelo, permaneciendo efectivo hasta 21 días después de la incorporación, controlando la enfermedad a 15, 20 y 25°C.

Tu (29) comprobó que el hongo Gliocladium virens es un micoparásito de Sclerotinia sclerotiorum, inhibiendo la formación de esclerocios y penetrando por medio de apresorios en los ya formados, causando su posterior destrucción.

plasma micro Marois y Mitchel (22), al inocular 300, 900 y 6.500 clamidosporas de Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici por gramo de suelo fumigado previamente y contaminado con Penicillium funiculosum, Trichoderma harzianum y Aspergillus ochraceus, no observaron incremento de inóculo del patógeno.

Waksman (31) da una lista de microorganismos antagónicos de patógenos del suelo :

según Kudryautseva (21), dicho organismo inoculado en un suelo bajo cobertura, estimula el crecimiento de las plantas afectadas por las enfermedades causadas por hongos que habitan el suelo.

<u>Antagónico</u>	<u>Organismos afectados</u>
<u>Trichoderma lignorum</u>	<u>Rhizoctonia</u> sp. <u>Phytophthora</u> sp. <u>Pythium</u> sp.
<u>Acrostalagmus</u> sp.	<u>Rhizoctonia</u> sp.
<u>Aspergillus niger</u>	<u>Peziza</u> sp. y <u>Rhizoctonia</u> sp.
<u>Botrytis cinerea</u>	<u>Rhizoctonia</u> sp.
<u>Verticillium</u> sp.	<u>Rhizoctonia</u> sp.
<u>Penicillium</u> sp.	<u>Rhizoctonia</u> sp., <u>Peziza</u> sp. y <u>Fusarium</u> sp.
<u>Fusarium lateritium</u>	<u>Rhizoctonia</u> sp.

Bulla (2) anota que el hongo Trichoderma lignorum es antagónico de Rhizoctonia solani, mientras que Streptomyces proecox es de Streptomyces scabies.

Brian, citado por Cercos (3), indica que los hongos Trichoderma lignorum y especies de Helminthosporium, Penicillium, Gladosporium, Mucor y Alternaria, inhiben el crecimiento de Ophiobolus graminis.

Sañudo (27) afirma que el nemátodo Aphelenchoides sp. puede reducir significativamente las poblaciones de varios hongos del suelo, al inyectarles sustancias digestivas que ocasionan la destrucción del proto-

plasma micelia. El suelo infestado con Sclerotium rolfsii permitió una mayor germinación de las semillas de frijol.

2.3 Estudios sobre el antagonismo de Trichoderma sp.

Josifovic (16) indica que el hongo Trichoderma lignorum (T. viride) ejerce hiperparasitismo a los hongos Pythium sp., Phytophthora parasítica, Rhizopus sp., Rhizoctonia solani y Sclerotium rolfsii. Según Kudryautseva (21), dicho organismo inoculado en un suelo bajo cobertura, estimula el crecimiento de las plantas de pepino, disminuyendo las enfermedades causadas por hongos que habitan el suelo.

Domanski (4) y Ponomareva (25) demostraron que la especie Trichoderma viride es efectiva contra los hongos Fomes annosus (Fr.) Cke y Ophiobolus graminis Sacc.

Albornoz, Molina y Cújar (1), así como Morquer y Touvet (24) reportan a Trichoderma viride como antagonico de Armillaria mellea Vahl. Igualmente, Dubos y Ricard (5) aseguran que dicho organismo es efectivo en el tratamiento de árboles de duraznero, contra el plateado de las hojas causado por Stereum purpureum.

Harman, Chet y Baker (11) indican que la protección de las semillas de arveja o rabanito con conidias de Trichoderma hamatum, permitieron su germinación en suelos contaminados con Pythium spp. y Rhizoctonia solani.

Para Kirik y Steblyuk (18), la especie Trichoderma koningii inhibe apreciablemente a Fusarium oxysporum y Fusarium culmorum, aunque no afecta en forma notoria a Rhizoctonia solani.

Kelley (17) realizó un estudio en pino, impregnando gránulos de arcilla con esporas de Trichoderma harzianum, los cuales se colocaron en suelo inoculado con Phytophthora cinnamomi, bajo condiciones de invernadero, controlando el Damping-off de las semillas hasta por dos semanas.

Guerrero y Orellana (9) determinaron que el hongo Trichoderma harzianum, aplicado en el momento de la siembra y dos meses después en un cultivo de ajo variedad Chileno, ejerció buena protección contra el ataque de Sclerotium cepivorum.

Henis, Chaffar y Baker (12) aplicaron al suelo 0,04 - 0,15 g de crecimientos miceliales de Trichoderma harzianum por kilo de suelo, para proteger la germinación de semillas de rábano, contra Rhizoctonia solani en suelos infestados. La germinación en suelos no infestados también aumentó al adicionar 4 microgramos de PCNB por g de suelo, se obtuvo un efecto aditivo en la acción de Trichoderma harzianum sobre la enfermedad y un efecto sinérgico en la disminución de la densidad de inóculo de Rhizoctonia solani. Hadar, Chet y Henis (10) obtuvieron resultados similares.

Elad, Chet y Katan (6) determinaron que un aislamiento de Trichoderma harzianum fue capaz de causar lisis en el micelio de Sclerotium rolfsii y Rhizoctonia solani y, en condiciones de campo, redujo el ataque de los dos patógenos en tomate, algodón y frijol.

Sañudo y Cáceres (28) estudiaron el efecto de la cepa No. 10 de Trichoderma harzianum sobre Sclerotium rolfsii en condiciones de campo, y observaron que hubo mayor porcentaje de plantas vivas (68,7%) donde se inoculó el antagonico, que en suelo infestado por el patógeno (12,7%). Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez (25) a nivel de materos encontrando que un 93,75% de plantas de Diacol Nima no fueron afectados por el patógeno.

A su vez, Sañudo (27) realizó un tratamiento de semilla de frijol variedad Sanilac, con un preparado de suelto orgánico seco y tamizado, 70 g de goma arábiga molida, 20 g de dextrosa, 5 g de metil celulosa 5 g agregando 100 g del preparado, 400 cc de una suspensión de esporas de 4×10^6 esporas de cada una de 5 cepas de Trichoderma harzianum, para sembrarlas en suelo infestado artificialmente con Sclerotium rolfsii. Los porcentajes de plantas vivas fueron en promedio de 17,3; 51,0; 58,0; 19,0 y 80,7% para las cepas 1, 10, 12, 15 y 17 del antagonico, en comparación con el Testigo, donde se obtuvo 5,3%.

Se cumplió con la colección de 18 aislamientos del hongo Trichoderma existentes en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Maricao, denominados T 1, T 4 B, T 5A, T 6B, T 10A, T 10B, T 11, T 12A, T 12B, T 13A, T 13B, T 16, T 17A, T 17B, T 20, T 21, T 22 y T 23, los cuales se sembraron individualmente, cada uno en cuatro cajas Petri con PDA ácido. Obtenidas las colonias, se replicaron en tubos con el mismo medio inclinado, con el fin de purificarlas.

Simultáneamente se recolectaron muestras de raíces de plantas de frijol Morón, afectadas con amarillamiento, para aislar el hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli, mediante siembra en cajas Petri con PDA ácido, de trozos de tejido con parte muerta y porción sana, previamente desinfectados en hipoclorito de sodio al 5% por 3 minutos. Las colonias obtenidas del patógeno, se replicaron en tubos de ensayo con PDA inclinado.

Una vez obtenidos los cultivos puros de los antagonicos y del patógeno, se procedió a determinar el antagonismo a nivel de cajas Petri con PDA, realizando dos pruebas:

1.1.1 Cada cepa de Trichoderma y el hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli, se sembraron en forma opuesta en una caja Petri de 9 cm de diámetro con PDA, utilizando cuatro por aislamiento. Se determinó la capacidad de invasión del micelio de Trichoderma sobre el de Fusarium.

viceversa, así como el posible efecto de los hongos al no permitir el desarrollo del otro en la zona de encuentro.

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó entre Abril de 1981 y Julio de 1982, en predios de la Ciudad Universitaria, perteneciente a la Universidad de Nariño (2.560 msnm), cumpliendo etapas de laboratorio y campo.

3.1 Etapa de laboratorio

Como medio de cultivo, se colocó en el centro una porción de colonia con PDA de cada cepa de Trichoderma, utilizando cuatro cajas Petri, para determinar la capacidad que tiene el antagonista para invadir cultivos establecidos de Fusarium oxysporum forma phaseoli.

Se cumplió con la colección de 18 aislamientos del hongo Trichoderma existentes en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, denominados T 1, T 4 B, T 5A, T 6B, T 10A, T 10B, T 11, T 12A, T 12B, T 15A, T 15B, T 16, T 17A, T 17B, T 20, T 21, T 22 y T 23, los cuales se sembraron individualmente, cada uno en cuatro cajas Petri con PDA ácido. Obtenidas las colonias, se repicaron en tubos con el mismo medio inclinado, con el fin de purificarlas.

Simultáneamente se recolectaron muestras de raíces de plantas de frijol Mortiño, afectadas con amarillamiento, para aislar el hongo Fusarium oxysporum forma phaseoli, mediante siembra en cajas Petri con PDA ácido, de trozos de tejido con parte muerta y porción sana, previamente desinfectados en hipoclorito de sodio al 5% por 3 minutos. Las colonias obtenidas del patógeno, se repicaron en tubos de ensayo con PDA inclinado.

Los sistemas usados consistieron en la inoculación de los antagonistas en suspensión de esporas e incorporado un estiércol de ganado vacuno. Una vez obtenidos los cultivos puros de los antagonistas y del patógeno, se procedió a determinar el antagonismo a nivel de cajas Petri con PDA, realizando dos pruebas:

3.1.1 Cada cepa de Trichoderma y el hongo Fusarium oxysporum forma phaseoli, se sembraron en forma opuesta en una caja Petri de 9 cm de diámetro con PDA, utilizando cuatro por aislamiento. Se determinó la capacidad de invasión del micelio de Trichoderma sobre el de Fusarium o

viceversa, así como el posible antagonismo de los dos hongos al no permitir el desarrollo del otro en la zona de encuentro.

El sistema de incorporación de cada uno de los antagonistas se hizo, mezclando 40 cc de una sus-

3.1.2 Se establecieron colonias de Fusarium oxysporum forma phaseoli en cajas Petri con PDA; cuando el micelio del hongo invadió el medio de cultivo, se colocó en el centro una porción de colonia con PDA de cada cepa de Trichoderma, utilizando cuatro cajas Petri, para determinar la capacidad que tiene el antagonista para invadir cultivos establecidos de Fusarium oxysporum forma phaseoli.

Se mantuvieron hasta la época de floración con riego frecuente de agua destilada, momento en el cual se hizo la evaluación del número de plantas sanas, lo cual se constató por la ausencia de síntomas foliares y radicales. Los datos obtenidos se transformaron a la fórmula $\sqrt{X + 1}$, donde X representa el número de plantas vivas,

3.2 Nivel de materos

Los 18 aislamientos del hongo Trichoderma se multiplicaron en cajas Petri con PDA. Igualmente la especie Fusarium oxysporum forma phaseoli, se replicó en erlenmeyers con granos de trigo humedecidos y esterilizados en autoclave a 120°C y 1 kilo/cm² de presión.

Se llenaron 120 bolsas plásticas de 3 Kg de capacidad con suelo, conteniendo 3 partes de tierra y una de arena, con el fin de establecer un diseño de parcelas divididas con 3 repeticiones para dos sistemas y 20 tratamientos, con una distribución irrestrictamente al azar.

Los sistemas usados consistieron en la inoculación de los antagonistas en suspensión de esporas e incorporado en estiércol de ganado vacuno, molido, tamizado y esterilizado. Los tratamientos correspondieron a las 18 cepas de Trichoderma, un Testigo con suelo contaminado con Fusarium oxysporum (T -) y un Testigo sin inoculación del patógeno ni incorporación de los antagonistas (T +). En cada uno de los materos, a excepción del T + el suelo se mezcló con 50 g de granos de trigo contaminado con Fusarium oxysporum forma phaseoli en los primeros 5 cm de la superficie.

Para el primero de los sistemas, se hizo una suspensión de esporas de cada cepa en agua destilada utilizando una proporción de 4×10^6

Se llenaron 120 bolsas plásticas de 3 Kg de capacidad con suelo, conteniendo 3 partes de tierra y una de arena, con el fin de establecer un diseño de parcelas divididas con 3 repeticiones para dos sistemas y 20 tratamientos, con una distribución irrestrictamente al azar.

esporas/cm³, regando una cantidad de 50 cc por bolsa (plástica en los sistemas donde se depositaron las semillas. El segundo sistema de incorporación de cada uno de los antagonicos se hizo, mezclando 40 cc de una suspensión de 4×10^6 esporas/cm³ con 60 g de estiércol e incorporando 50 a de la mezcla por matero. En el Testigo positivo (T+) únicamente se agregó agua destilada y estiércol para cada uno de los sistemas. Cada surco correspondió a un subtratamiento dentro del respectivo tratamiento, y en él se establecieron 10 sitios cada metro, donde se colocaron Por matero se sembraron 10 semillas germinadas de frijol voluble Mortiño y las plantas germinadas se mantuvieron hasta la época de floración con riego frecuente de agua destilada, momento en el cual se hizo la evaluación del número de plantas sanas, lo cual se constató por la ausencia de síntomas foliares y radicales. Los datos obtenidos se transformaron a la fórmula $\sqrt{X \pm 1}$, donde X representa el número de plantas vivas, para realizar el análisis estadístico correspondiente.

3.3 Nivel de campo fructificación del frijol se determinó el número de plantas sanas en base a 30 semillas sembradas, midiendo la sanidad por la ausencia de síntomas en los sistemas aéreo y radical de las plantas. Se seleccionaron las cepas de Trichoderma que permitieron la mitad o más de plantas vivas respecto a las semillas sembradas, para observar su efectividad en condiciones de campo, realizando una multiplicación de antagonicos y patógenos similar a la descrita anteriormente.

Se preparó un lote de 19 x 30 m, el cual se dividió en 3 bloques de 19 x 9 m, con separación entre ellos por una calle de 1,5 m, trazándose por bloque 20 surcos de 9 m de longitud con separación de 1 m. Esto sirvió para realizar un diseño de parcelas divididas en bloques al azar para dos tratamiento y 10 subtratamientos.

Los tratamientos correspondieron a la incorporación de antagonicos en suspensión de esporas y en mezcla con estiércol molido, tamizado y estéril, mientras que los subtratamientos comprendieron 7 cepas de Trichoderma, un control con el fungicida Difolatan, un Testigo positivo y un Testigo negativo, similares a los descritos para el ensayo en materos.

La preparación de los antagonistas en los dos medios (agua destilada y estiércol) se hizo de la misma manera que la descrita en el numeral 3.2.

El Difolatan se incorporó en dosis de 2 g/lt de agua y 2 g/kilo de estiércol.

4.1.1 Antagonismos en siembras opuestas

Cada surco correspondió a un subtratamiento dentro del respectivo tratamiento, y en él se establecieron 10 sitios cada metro, donde se colocaron aproximadamente 20 g de granos de trigo contaminado con Fusarium oxysporum forma phaseoli, depositándose encima 3 semillas germinadas de frijol variedad Mortiño y 3 de maíz Morocho amarillo, aplicando luego el subtratamiento en cantidad de 30 ml y 30 g, según correspondiera al tratamiento de suspensión de esporas o de mezcla de esporas con estiércol. El Testigo positivo consistió en la incorporación de agua destilada o estiércol solo. Una vez realizado lo anterior se tapó manualmente.

En la época de fructificación del frijol se determinó el número de plantas sanas en base a 30 semillas sembradas, midiendo la sanidad por la ausencia de síntomas en los sistemas aéreo y radical de las plantas. Los datos obtenidos se interpretaron estadísticamente, de acuerdo con el diseño de parcelas divididas. La posibilidad de que el antagonismo del hongo Trichoderma sea por invasión de un sustrato, no dejando progresar al patógeno. Sin embargo, para que se cumpla este efecto, probablemente, los antagonistas deben tener condiciones especiales, principalmente nutricionales, lo cual incide que es un medio natural como es el suelo, haya diferencias en el antagonismo.

4.1.2 Antagonismo sobre cultivos desarrollados de F. oxysporum

f. phaseoli

Únicamente los antagonistas T 17A, T 22 y T 23 de Trichoderma

fueron capaces de invadir cultivos establecidos de Fusarium oxysporum desarrollando sus estructuras reproductivas sobre el micelio del patógeno. Al determinar el efecto al microscopio, se observó que el inte-

rior del micelio y espes IV. RESULTADOS Y DISCUSION áreas pramiolosas, debi
do posiblemente a que los antagonicos en su actividad de invasion, produ-
cen sustancias antibi6ticos que pueden provocar coagulaci6n protoplasm6ti-
ca (3).

4.1 Etapa de laboratorio

4.1.1 Antagonismos en siembras opuestas

Para los tests aislamientos de Trichoderma, la incapaci-
dad de invadir cultivos de F. oxysporum forma phaseoli, puede deberse a

Todos los aislamientos de Trichoderma invadieron el cre-
cimiento micelial de Fusarium oxysporum forma phaseoli, unos realizando
un desarrollo r6pido sin ocurrir 6reas de acordonamiento entre los dos
hongos, T 10B, T 12A, T 12B, T 16, T 17A, T 23 y otros con producci6n ini-
cial de zonas de acordonamiento, donde la esporulaci6n de antagonico y pa-
t6geno es mayor que en el resto del micelio (T 1, T 4B, T 5A, T 6B, T 10A,
T 11, T 15A, T 15B, T 20, T 21, T 22 y T 17B).

Al intentar recuperar al hongo Fusarium oxysporum de las
diferentes cajas Petri, no fue posible hacerlo, determin6ndose 6nicamente
la presencia de cada uno de los antagonicos empleados en las cajas Petri.

En la Tabla I, aparece el numero de plantas vivas de cada tipo
tino en la 6poca de claraci6n, en base a 10 semillas sembradas, despu6s de
haber realizado dos m6todos de inoculaci6n de Trichoderma spp. sobre Fu-
sarium oxysporum f. phaseoli, incorporado al suelo. La Tabla II muestra

el an6lisis de v6ctores. Lo anterior indica la posibilidad de que el antagonismo
del hongo Trichoderma sea por invasi6n de un sustrato, no dejando progre-
sar al pat6geno. Sin embargo, para que se cumpla este efecto, probable-
mente, los antagonicos deben tener condiciones especiales, principalmente
nutricionales, lo cual incide que en un medio natural como es el suelo,
haya diferencias en el antagonismo.

4.1.2 Antagonismo sobre cultivos desarrollados de F. oxysporum f. phaseoli

En la Tabla III, se muestra el resultado de la inoculaci6n sobre Fusarium oxysporum
forma phaseoli, obteni6ndose que es m6s efectiva la incorporaci6n l6qui-

da de las esporas. 6nicamente los antagonicos T 17A, T 22 y T 23 de Tricho-
derma fueron capaces de invadir cultivos establecidos de Fusarium oxyspo-
rum, desarrollando sus estructuras reproductivas sobre el micelio del pa-
t6geno. Al determinar el efecto al microscopio, se observ6 que el inte-

rior del micelio y esporas del patógeno, mostraban áreas granulosas, debido posiblemente a que los antagonicos en su actividad de invasión, producen sustancias antibióticas que pueden provocar coagulación protoplasmática (3).

Para los demás aislamientos de Trichoderma, la incapacidad de invadir cultivos de F. oxysporum forma phaseoli, puede deberse a que no hay posibilidad de ocasionar lisis progresiva del micelio, para ir actuando como contaminante de sustancias orgánicas muertas, porque los compuestos metabólicos que producen, entre los cuales se encuentran sustancias antibióticas, no tienen especificidad sobre el micelio y esporas del patógeno (3).

4.2 Antagonismo a nivel de materos

En la Tabla I, aparece el número de plantas vivas de frijol Mortiño en la época de floración, en base a 10 semillas sembradas, después de haber realizado dos métodos de inoculación de Trichoderma spp. sobre Fusarium oxysporum f. phaseoli, incorporado al suelo. La Tabla II muestra el análisis de variancia con diferencias altamente significativas entre formas de inoculación de Trichoderma (tratamientos) y para los diferentes aislamientos del antagonico (subtratamientos) pero no para la interacción tratamientos x subtratamientos, demostrándose por lo tanto que la actuación de cada uno de los aislamientos efectivos y no efectivos no cambia cualitativamente con los cambios en la inoculación.

En la Tabla III se comparan los promedios de plantas vivas de frijol Mortiño, con dos métodos de inoculación sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli, obteniéndose que es más efectiva la incorporación líquida de las esporas que en mezcla con estiércol de ganado vacuno. Puede suceder en el primer caso que se produzca mayor cantidad de sustancias antibióticas, no adsorbidas por elementos de la materia orgánica (estiércol), donde deben proliferar además del patógeno otros microorganismos

TABLA 1

NUMERO DE PLANTAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTALO SANAS EN LA EPOCA DE FLORACION, OBTENIDAS POR EL AITACONISOL DE 18 CEPAS DEL HONGO Trichoderma BAJO LOS METODOS DE INOCULACION SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli EN MATEROS

Sistemas	Tratamientos																		Testigo	Total	
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10	T 11	T 12	T 13	T 14	T 15	T 16	T 17	T 18			
A	1	2	1	2	1	4	2	5	6	3	4	5	5	3	4	1	4	5	10	0	
II	1	0	1	3	2	4	2	4	3	2	3	6	8	2	3	0	8	8	9	1	
III	1	1	2	1	2	4	2	7	5	3	3	6	6	2	3	2	7	8	10	0	
IV	4	2	8	3	11	6	16	14	8	10	17	19	19	7	10	3	19	21	29	1	212
\bar{X}	1,33	1,33	0,67	2,67	1	3,67	2	5,33	4,67	2,67	3,33	5,67	6,33	2,33	3,33	1	6,33	7	9,67	0,33	3,53
B	1	3	1	3	2	4	3	7	7	4	5	7	9	3	5	3	8	7	10	0	
II	4	2	2	5	1	6	2	6	5	5	3	7	6	3	4	2	6	8	10	0	
III	3	3	2	5	2	4	3	6	7	5	4	7	7	3	9	2	7	7	10	1	278
IV	8	5	13	5	14	8	19	19	14	12	21	22	22	9	18	7	21	22	30	1	
\bar{X}	3,33	2,67	1,67	4,33	1,67	4,67	2,67	6,33	4,67	4	7	7,33	7,33	3	6	2,33	7	7,33	10	0,33	4,63
Total	14	12	7	21	8	25	14	35	33	22	22	38	41	16	28	10	40	43	59	2	
\bar{X}	2,33	2	1,17	3,5	1,33	4,17	2,33	5,83	5,5	3,67	3,67	6,33	6,83	2,67	4,67	1,67	6,67	7,17	9,83	0,33	

TABLA II

TABLA III

ANALISIS DE VARIANCIA PARA EL PROMEDIO DE PLANTAS SANAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTIÑO, EN LA EPOCA DE FLORACION OBTENIDAS POR EL ANTAGONISMO DE 18 CEPAS DE Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli EN MATEROS EN LA EPOCA DE FLORACION, OBTENIDAS CON DOS METODOS DE ANTAGONISMO, DE 18 CEPAS DE Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli EN MATEROS. PRUEBA DE TUKEY

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Ft. 5%	1%
Tratamiento	1	Promedios plantas 1,94	B 2,1,94	A 2,064,67 ^{**}	7,71	21,20
Error (a)	4	0,12	0,03			
Subtratamiento	19	35,80	1,88	47,00 ^{**}	1,75	2,18
Trat. x Subtrat.	19	0,66	0,03	0,75 ^{NS}	1,75	2,18
Error (b)	76	2,99	0,04			
Total		41,51				

** : Diferencias altamente significativas

NS : Diferencias no significativas

Comparador Tukey 5% = 0,63

Comparador Tukey 1% = 0,72

que ejerce un notable antagonismo sobre los aislamientos de Trichoderma. Igualmente se cuenta con la probabilidad de que las bacterias que atacan y la reacción del estiércol no favorecen sobre el desarrollo de Trichoderma.

TABLA III

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE PLANTAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTIÑO SANAS EN LA EPOCA DE FLORACION, OBTENIDAS CON DOS METODOS DE ANTAGONISMO, DE 18 CEPAS DE Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli EN MATEROS. PRUEBA DE TUKEY

Promedios plantas sanas	B	A
	2,30	2,04

A	2,04	0,26 ^{††}	-
B	2,30	-	-

†† : Diferencias altamente significativas

Comparador Tukey 5% = 0,63
 Comparador Tukey 1% = 0,72

De los anteriores, T 124 y T 125, al parecer corresponden a la misma especie de hongo, mostrando promedios de plantas sanas al nivel del 99% con relación al Testigo negativo, y a los aislamientos T 5A, T 10A, T 21, T 4B, T 1 y T 11 y significativas respecto a T 125. Por lo

TABLA IV

COMPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PLANTAS LE FOLIO VOLLE HORTILO SARAS EN LA EPOCA DE FLOREACION, OBTENIDAS CON LA INOCULACION DE 18 CEPAS DE *Trichoderma SORBE Fusarium oxysporum* forma phaseoli EN MATEROS, PRUEBA DE TUKEY

promedios	Test r 23	T17A	T 22	T 16	T12A	T12B	T10B	T 30	T15B	T15A	T 6B	T17B	T 11	T 1	T 4B	T 21	T10A	T 5A	Test	
plantas saras	3,29	2,85	2,79	2,76	2,71	2,61	2,54	2,27	2,23	2,16	2,15	2,10	1,91	1,82	1,80	1,71	1,60	1,52	1,45	1,14
Test -	1,14	2,15**	1,71**	1,65**	1,62**	1,51**	1,47**	1,40**	1,13**	1,09**	1,02**	0,96**	0,77**	0,68*	0,66*	0,57 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,38 ^{NS}	0,31 ^{NS}	-
T 5A	1,45	1,84**	1,40**	1,34**	1,31**	1,26**	1,16**	1,09**	0,82**	0,78**	0,71*	0,70*	0,65*	0,46 ^{NS}	0,37 ^{NS}	0,26 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,07 ^{NS}	-	-
T 10A	1,52	1,77**	1,33**	1,27**	1,24**	1,19**	1,09**	1,02**	0,75**	0,71*	0,64*	0,63*	0,58 ^{NS}	0,39 ^{NS}	0,30 ^{NS}	0,28 ^{NS}	0,19 ^{NS}	0,08 ^{NS}	-	-
T 21	1,00	1,09**	1,25**	1,19**	1,16**	1,11**	1,01**	0,94**	0,67*	0,63*	0,55 ^{NS}	0,50 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,22 ^{NS}	0,20 ^{NS}	0,11 ^{NS}	-	-	-	-
T 4B	1,71	1,58**	1,14**	1,08**	1,05**	1,00**	0,90**	0,83**	0,56 ^{NS}	0,52 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,44 ^{NS}	0,39 ^{NS}	0,20 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,09 ^{NS}	-	-	-	-
T 1	1,80	1,49**	1,05**	0,99**	0,96**	0,91**	0,81**	0,74**	0,43 ^{NS}	0,41 ^{NS}	0,38 ^{NS}	0,35 ^{NS}	0,30 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,02 ^{NS}	-	-	-	-	-
T 11	1,82	1,47**	1,03**	0,97**	0,94**	0,89**	0,79**	0,72**	0,45 ^{NS}	0,41 ^{NS}	0,34 ^{NS}	0,33 ^{NS}	0,28 ^{NS}	0,09 ^{NS}	-	-	-	-	-	-
T 17B	1,91	1,38**	0,94**	0,88**	0,85**	0,80**	0,70*	0,63*	0,35 ^{NS}	0,35 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,24 ^{NS}	0,19 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-
T 15B	2,10	1,19**	0,75**	0,69**	0,66**	0,61 ^{NS}	0,51 ^{NS}	0,44 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,06 ^{NS}	0,05 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-
T 15A	2,15	1,14**	0,70**	0,64**	0,61 ^{NS}	0,56 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,39 ^{NS}	0,12 ^{NS}	0,08 ^{NS}	0,01 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 15B	2,16	1,13**	0,69**	0,63**	0,60 ^{NS}	0,55 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,38 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,07 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 20	2,23	1,06**	0,62**	0,55 ^{NS}	0,53 ^{NS}	0,48 ^{NS}	0,38 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,04 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 10B	2,27	1,02**	0,58**	0,52 ^{NS}	0,49 ^{NS}	0,44 ^{NS}	0,36 ^{NS}	0,34 ^{NS}	0,27 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 12B	2,54	0,75**	0,31 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,22 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,07 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 12A	2,51	0,68**	0,24 ^{NS}	0,18 ^{NS}	0,15 ^{NS}	0,10 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 16	2,71	0,58**	0,14 ^{NS}	0,08 ^{NS}	0,05 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 22	2,76	0,53 ^{NS}	0,09 ^{NS}	0,03 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 17A	2,79	0,50 ^{NS}	0,06 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T 23	2,85	0,44 ^{NS}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test. r	3,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Comparador Tukey 5% = 0,63

Comparador Tukey 1% = 0,72

** : Diferencias altamente significativas

* : Diferencias significativas

NS : Diferencias no significativas

tanto, los dos aislamientos únicamente presentaron algunas diferencias en la coloración de las esporas. Así mismo parece ser que los aislamientos T 10B y T 20 tienen afinidad en el antagonismo sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli con diferencias estadísticas respecto a aislamientos escasamente efectivos como son T 5A, T 10A y T 21, además del Testigo negativo.

De acuerdo con los resultados anotados, T 23, T 17A, T 22 y T 16, fueron los antagonistas más efectivos contra Fusarium oxysporum forma phaseoli, posiblemente por tener mayor capacidad de invadir los espacios vitales ocupados por el patógeno, produciendo sustancias antibióticas que causan lisis en las estructuras fungosas de la especie Fusarium.

De otra parte, los aislamientos T 12A, T 12B, T 10B y T 20 son menos efectivos que las cuatro cepas anotadas, probablemente porque tan solo pueden invadir parcialmente las estructuras del patógeno o porque las sustancias tóxicas tienen escasa persistencia en el suelo.

Los aislamientos T 15B y T 15A también parecen corresponder a la misma especie y su antagonismo fue escaso, permitiendo ambos un promedio de 3,67 de plantas vivas, con diferencias al 99% de probabilidades respecto al Testigo negativo y al 95% de probabilidades respecto a T 5A y T 10A. Un aislamiento similar fue T 6B con 3,50 plantas vivas, que mostró diferencias altamente significativas sobre el Testigo negativo y significativas sobre T 5A.

El escaso antagonismo demostrado por T 15B, T 15A y T 6B puede ser debido a que únicamente tuvieron efecto de masa inicial en el momento de la inoculación, inhibiendo parcialmente el crecimiento del patógeno. Sin embargo, éste pronto colonizó espacios del suelo, especialmente donde se aplicó estiércol, lo cual demuestra que algunas especies de Trichoderma, no tienen persistencia en el suelo, probablemente porque son afectadas por otros microorganismos.

4.3 Antagonismo a nivel de campo

En la Tabla V se observa el número de plantas de frijol Mortiño, no afectadas por Fusarium oxysporum forma phaseoli en la época de fructificación, después de incorporar 7 aislamientos de Trichoderma bajo dos métodos de inoculación del patógeno.

El análisis de variancia, consignado en la Tabla VI, permite observar diferencias al nivel del 5% entre tratamientos (métodos de inoculación de Trichoderma) y al 1% para subtratamientos (aislamientos de Trichoderma). No se detectaron diferencias estadísticas para la interacción de las variables anotadas, porque el grado de antagonismo de un aislamiento, se conserva con cualquier método de inoculación, determinándose únicamente cambios en la eficiencia de actuación.

La Tabla VII indica la comparación de los promedios de plantas de frijol Mortiño con dos métodos de inoculación de Trichoderma sobre F. oxysporum forma phaseoli, verificándose que cuando se la hizo por suspensión de esporas en medio líquido, el número de 15,80 plantas vivas superó en forma significativa en 12,63 obtenido al mezclar las esporas de los antagonísticos con estiércol de ganado vacuno.

Se observa que de 30 plantas sembradas, más de la mitad se mantuvieron vivas con el primer método, porque las esporas del antagonístico se ponen más en contacto con el patógeno, iniciándose con mayor rapidez la acción antagonística, mientras que cuando se adiciona estiércol, no hay mejor contacto entre los dos organismos y el estiércol puede ayudar a crecer más el patógeno y otros microorganismos del suelo, con lo que se limita la acción de algunas cepas de Trichoderma que no cuentan con condiciones óptimas en el suelo para ejercer su acción parasitaria.

TABLA V

NUMERO DE PLANTAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTIÑO SANAS EN LA EPOCA DE FRUCTIFICACION OBTENIDAS POR EL ANTAGONISMO DE 7 CEPAS DEL HONGO *Trichoderma* SOBRE *Fusarium oxysporum* forma phaseoli CON LOS METODOS DE INOCULACION EN CONDICIONES DE CAMPO

Tratamientos	Subtratamientos										Difolatan	Test. Test. Test. Promedio	Total	
	T 10B	T 12A	T 12B	T 16	T 17A	T 22	T 23	T 23	T 23	T 23				
A	9	12	13	3	21	15	15	15	6	24	1	24	1	1
II	7	9	15	3	18	20	18	18	14	28	1	28	1	1
III	9	11	15	5	14	18	17	17	12	25	1	25	1	1
	25	32	43	11	53	53	50	50	32	77	3	77	3	3
\bar{X}	8,33	10,67	14,33	3,67	17,67	17,67	16,67	16,67	10,67	25,67	1	25,67	1	12,63
B	13	13	17	6	23	19	22	22	16	27	1	27	1	1
II	11	14	16	3	21	23	21	21	21	28	1	28	1	1
III	9	17	22	7	16	23	22	22	17	24	1	24	1	1
	33	44	55	16	60	65	65	65	54	79	3	79	3	3
\bar{X}	11	14,67	18,33	5,33	20	21,67	21,67	21,67	18	26,33	1	26,33	1	15,80
Total	58	76	98	27	113	118	115	115	86	156	6	156	6	853
\bar{X} Total	9,67	12,67	16,33	4,50	18,83	19,67	19,67	19,67	14,33	26,00	1	26,00	1	14,22

TABLA VI

ANALISIS DE VARIANCIA PARA LOS PROMEDIOS DE PLANTAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTIÑO SANAS EN LA EPOCA DE FRUCTIFICACION, OBTENIDAS POR EL ANTAGONISMO DE 7 CEPAS DE Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli, CON DOS METODOS DE INOCULACION EN CONDICIONES DE CAMPO

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	5%	Ft.	1%
Bloques	2	6,43	3,21	1,76 ^{NS}	19,00	99,00	
Tratamientos	1	150,41	150,41	82,64 [†]	18,51	98,50	
Error (a)	2	3,64	1,82				
Parcelas Ppales.	5	12,63	3,17				
Subtratamientos	9	3.066,35	340,70	63,20 ^{††}	2,16	2,96	
Trat. x Subtrat.	9	63,42	7,04	1,30 ^{NS}	2,16	2,96	
Error (b)	36	193,93	5,39				
Total		3.484,18					

† : Diferencias significativas

Comparador Tukey 5% = 2,13

Comparador Tukey 1% = 4,90

†† : Diferencias altamente significativas

† : Diferencias significativas

NS : Diferencias no significativas

La comparación de los promedios de plantas vivas de frijol Mortiño en la época de fructificación y en condiciones de campo, de acuerdo con el aislamiento de Trichoderma (Tabla VIII), permitió observar los siguientes resultados :

El aislamiento T 16 con 4,50 plantas vivas fue el menos efectivo al no mostrar diferencias estadísticas respecto al Testigo negativo, donde únicamente una planta sobrevivió al ataque de Fusarium oxysporum.
TABLA VII
COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE PLANTAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTIÑO SANAS EN LA EPOCA DE FRUCTIFICACION, OBTENIDAS POR DOS METODOS DE ANTAGONISMO DEL HONGO Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli, SIENDO SU PERSISTENCIA EN CONDICIONES DE CAMPO. PRUEBA DE TUKEY es limitada por las de otros microorganismos más agresivos que pueden colonizar los espacios vitales alrededor de la zona radical de las plantas de frijol.

Promedios plantas sanas	B	A
	15,80	12,63

Los aislamientos T 12B y T 12A tuvieron acción similar al control con el fungicida Ditolatan, con 16,33, 12,67 y 14,33 plantas vivas, respectivamente, mostrando diferencias altamente significativas con relación a T 16 y al Testigo negativo. Estos aislamientos pueden tener una mayor persistencia en el suelo, pero las sustancias antibióticas que producen no tienen efecto residual, por lo que los productos vegetales que se pierden rápidamente en el suelo.

‡ : Diferencias significativas

Comparador Tukey 5% = 2,13

El aislamiento T 17A con 18,83 plantas vivas de 30 sembradas, tuvo buen efecto contra el hongo Fusarium oxysporum forma phaseoli, con diferencias altamente significativas respecto al Testigo negativo, T 16 y T 10B, lo cual determina la posibilidad de que el incremento de eficiencia se deba al mayor poder de persistencia de los aislamientos en el suelo, invadiendo residuos orgánicos, para ejercer mayor la lucha contra el patógeno. El mismo caso sucedió con los aislamientos más efectivos como fueron T 22 y T 23 que permitieron 19,67 y 19,17 plantas de Mortiño no afectadas por el patógeno, para diferencias estadísticas con respecto al Testigo negativo, T 16, T 10B y T 12A (Figuras 1 y 2).

Comparador Tukey 1% = 4,90

La comparación de los promedios de plantas vivas de frijol Mortiño en la época de fructificación y en condiciones de campo, de acuerdo con el aislamiento de Trichoderma (Tabla VIII), permitió observar los siguientes resultados :

El aislamiento T 16 con 4,50 plantas vivas fue el menos efectivo al no mostrar diferencias estadísticas respecto al Testigo negativo, donde únicamente una planta sobrevivió al ataque de Fusarium oxysporum. El aislamiento T 10B, con 9,67 plantas vivas únicamente presentó diferencias altamente significativas con relación al Testigo negativo. Es probable que los aislamientos T 10B y T 16 no sean típicos del suelo, siendo su persistencia escasa, lo cual haría que su población se vea limitada por las de otros microorganismos más agresivos que pueden colonizar los espacios vitales alrededor de la zona radical de las plantas de frijol.

Los aislamientos T 12B y T 12A tuvieron acción similar al control con el fungicida Difolatan, con 16,33, 12,67 y 14,33 plantas vivas, respectivamente, mostrando los tres diferencias altamente significativas con relación a T 16 y al Testigo negativo. Estos aislamientos pueden tener una mayor persistencia en el suelo, pero las sustancias antibióticas que producen no tienen efecto residual, pudiendo tratarse de productos volátiles que se pierden rápidamente en el suelo.

El aislamiento T 17A con 18,83 plantas vivas de 30 sembradas, tuvo buen efecto contra el hongo Fusarium oxysporum forma phaseoli, con diferencias altamente significativas respecto al Testigo negativo, T 16 y T 10B, lo cual determina la posibilidad de que el incremento de eficiencia se deba al mayor poder de persistencia de los aislamientos en el suelo, invadiendo residuos orgánicos, para ejercer mayor la lucha contra el patógeno. El mismo caso sucedió con los aislamientos más efectivos como fueron T 22 y T 23 que permitieron 19,67 y 19,17 plantas de Mortiño no afectadas por el patógeno, para diferencias estadísticas con respecto al Testigo negativo, T 16, T 10B y T 12A (Figuras 1 y 2).

TABLA VIII

COMPARACION DE LOS PROMEDIOS DE PLANTAS DE FRIJOL VOLUBLE MORTIÑO SANAS,
EN LA EPOCA DE FRUCTIFICACION, OBTENIDAS POR EL ANTAGONISMO DE 7 CEPAS

DEL HONGO Trichoderma SOBRE Fusarium oxysporum forma phaseoli
EN CONDICIONES DE CAMPO. PRUEBA DE TUKEY

Promed. plantas sanas	Test. †	T 22	T 23	T 17A	T 12B	Difo- latan	T 12A	T 10B	T 6	Test.-
Testigo - 1,00	25,00††	18,67††	18,17††	17,83††	15,33††	13,33††	11,67††	8,67††	3,50 NS	-
T 6 4,50	21,50††	15,17††	14,67††	14,33††	11,83††	9,83††	8,17††	5,17 NS	-	-
T 10B 9,67	16,33††	10,00††	9,50††	9,16††	6,66 NS	4,66 NS	3,00 NS	-	-	-
T 12A 12,67	13,33††	7,00††	6,50†	6,16 NS	3,66 NS	1,66 NS	-	-	-	-
Difolatan 14,33	11,67††	5,34 NS	4,84 NS	4,50 NS	2,00 NS	-	-	-	-	-
T 12 B 16,33	9,67††	3,34 NS	2,84 NS	2,50 NS	-	-	-	-	-	-
T 17A 18,83	7,17†	0,84 NS	0,34 NS	-	-	-	-	-	-	-
T 23 19,17	6,83†	0,50 NS	-	-	-	-	-	-	-	-
T 22 19,67	6,33 NS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testigo † 26,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

†† : Diferencias altamente significativas Comparador Tukey 5% = 6,41
 † : Diferencias significativas Comparador Tukey 1% = 7,58
 NS : Diferencias no significativas



FIGURA 1. Surco de frijol Mortiño con incorporación del aislamiento T 23 del hongo Trichoderma en un suelo infestado con Fusarium oxysporum forma phaseoli.

Foto 1 - 5 - 1960

Foto 1 - 5 - 1960

Cuando no se inoculó a Fusarium oxysporum forma phaseoli (Testi-
go positivo) se obtuvo 26 plantas vivas de 30 sembradas, dato que no mos-
tró diferencias estadísticas respecto a T 22 con 19,67 plantas vivas, pe-
ro sí difirió estadísticamente en los tratamientos.



FIGURA 2. Surcos correspondientes a Un Tes-
tigo inoculado con Fusarium oxys-
porum forma phaseoli y tratado
con el aislamiento T 6 de Tricho-
derma, con alta incidencia del
"amarillamiento".

Foto : L. E. Arturo

Cuando no se inoculó a Fusarium oxysporum forma phaseoli (Testigo positivo) se obtuvo 26 plantas vivas de 30 sembradas, dato que no mostró diferencias estadísticas respecto a T 22 con 19,67 plantas vivas, pero sí difirió estadísticamente respecto a los demás subtratamientos.

5.1 Conclusiones

5.1.1 Al estudiar el efecto antagónico de 18 aislamientos de Trichoderma sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli en cajas Petri con medio de cultivo, se determinó que en siembras opuestas antagónico-patógeno, el primero invadió el micelio del segundo, pero cuando se probó el antagonismo en cultivos establecidos de Fusarium, únicamente T 17A, T 22 y T 23 fueron capaces de invadirlos.

5.1.2 En el ensayo de antagónismo a nivel de materos, se comprobó que al incorporar las esporas de los antagónicos en agua al suelo, el número de plantas vivas de frijol Mortiño en la floración fue de 2,30 en base a 10 sembradas, superando en forma altamente significativa al obtenido por mezcla de esporas con estiércol de ganado vacuno con 2,04 plantas vivas sanas.

5.1.3 Los aislamientos de Trichoderma denominados T 17B, T 11, T 1, T 4B, T 21, T 10A y T 5A con promedios de 2,67 a 1,17 plantas, no tuvieron efecto sobre F. oxysporum. De ellos, los cuatro últimos no presentaron diferencias estadísticas con respecto al Testigo inoculado con el patógeno.

5.1.4 Los aislamientos T 23, T 17A, T 22 y T 16 con 7,17, 6,83, 6,67 y 6,33 de plantas vivas, respectivamente, no difirieron entre sí, ni con el Testigo sin el patógeno con 9,83 de plantas vivas.

5.1.5 Los aislamientos T 6B, T 15A y T 15B, T 10B, T 20, T 12B y T 12A permitieron 1,30, 3,67, 4,17, 4,67, 5,50 y 3,83 plantas vivas de frijol Mortiño en 10 sembradas en suelo inoculado con F. oxysporum forma phaseoli.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.6 El uso de esporas en agua de los antagonistas permitió 15,80 plantas de frijol en la fructificación y afectadas por F. oxysporum, con diferencias significativas a las

5.1 Conclusiones

realizadas con la incorporación en estiércol donde se obtuvieron 12,63 plantas vivas.

5.1.1 Al estudiar el efecto antagonístico de 18 aislamientos de Trichoderma sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli en cajas Petri con medio de cultivo, se determinó que en siembras opuestas antagonístico-patógeno, el primero invadió el micelio del segundo, pero cuando se probó el antagonismo en cultivos establecidos de Fusarium, únicamente T 17A, T 22 y T 23 fueron capaces de invadirlos.

5.1.2 En el ensayo de antagonismo a nivel de materos, se comprobó que al incorporar las esporas de los antagonistas en agua al suelo, el número de plantas vivas de frijol Mortiño en la floración fue de 2,30 en base a 10 sembradas, superando en forma altamente significativa al obtenido por mezcla de esporas con estiércol de ganado vacuno con 2,04 plantas vivas sanas.

5.1.3 Los aislamientos de Trichoderma denominados T 17B, T 11, T 1, T 4B, T 21, T 10A y T 5A con promedios de 2,67 a 1,17 plantas, no tuvieron efecto sobre F. oxysporum. De ellos, los cuatro últimos no presentaron diferencias estadísticas con respecto al Testigo inoculado con el patógeno.

5.1.4 Los aislamientos T 23, T 17A, T 22 y T 16 con 7,17, 6,83, 6,67 y 6,33 de plantas vivas, respectivamente, no difirieron entre sí, ni con el Testigo sin el patógeno con 9,83 de plantas vivas.

5.1.5 Los aislamientos T 6B, T 15A y T 15B, T 10B, T 20, T 12B y T 12A permitieron 3,50, 3,67, 4,17, 4,67, 5,50 y 5,83 plantas vivas de frijol Mortiño de 10 sembradas en suelo inoculado con F. oxysporum forma phaseoli.

5.1.6 En condiciones de campo, la suspensión de esporas en agua de los antagonistas permitió 15,80 plantas de frijol en la fructificación no afectadas por F. oxysporum, con diferencias significativas a las realizadas con la incorporación en estiércol donde se obtuvieron 12,63 plantas vivas.

5.1.7 Los aislamientos T 16 y T 10B con 4,50 y 9,67 plantas vivas, en base a 30 sembradas fueron los antagonistas menos efectivos contra F. oxysporum, que los del Testigo inoculado con patógeno que únicamente permitió una planta viva.

5.1.8 Los aislamientos T 12B, T 12A con 16,33 y 12,67 plantas vivas tuvieron efecto similar al subtratamiento en el cual se empleó el fungicida Difolatan, donde se obtuvo 14,33 plantas vivas.

5.1.9 Los subtratamientos más eficaces correspondieron a los aislamientos T 22, T 23 y T 17A con 19,67, 19,17 y 18,83 plantas vivas de frijol Mortiño, datos que se acercan más a 26 plantas vivas obtenidas con un Testigo sin el patógeno.

5.2 Recomendaciones

5.2.1 Determinar la incidencia de los aislamientos T 17A, T 22 y T 23 en la producción de frijol Mortiño en interacción con el patógeno F. oxysporum f. phaseoli.

5.2.2 Establecer la identificación de las especies de Trichoderma anotadas, estableciendo la forma de ejercer el antagonismo sobre el patógeno.

5.2.3 Evaluar la acción de diferentes microorganismos aislados de raíces de frijol atacadas con Fusarium oxysporum forma phaseoli contra dicho patógeno.

5.2.4 Efectuar una colección de microorganismos antagónicos de hongos patógenos.

El presente estudio se realizó con el objeto de medir el efecto antagónico de 18 aislamientos del hongo Trichoderma denominados, T 1, T 4B, T 5B, T 6B, T 10A, T 10B, T 11, T 12A, T 12B, T 15A, T 15B, T 16, T 17A, T 17B, T 20, T 21, T 22 y T 23 sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli, causante del "amarillamiento" del frijol en el Departamento de Nariño.

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño. En cajas Petri con PDA, los aislamientos de Trichoderma invadieron el crecimiento del patógeno. Sin embargo, en cultivos establecidos por Fusarium oxysporum forma phaseoli, únicamente T 17A, T 22 y T 23 tuvieron capacidad de invadir el micelio de aquel.

En ensayos de invernadero y de campo se empleó la variedad de frijol "Mortino" y dos sistemas de incorporación de los antagónicos: suspensión de esporas y mezcla de éstas con estiércol de ganado vacuno esterilizado y suco. De acuerdo con los resultados se observó un mejor efecto en la incorporación de la suspensión de esporas.

De las cepas estudiadas, T 23, T 17A y T 22 fueron las más efectivas contra el patógeno en invernadero y en campo y T 16 mostró mejor efectividad en invernadero únicamente.

VI. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objeto de medir el efecto antagonico de 18 aislamientos del hongo Trichoderma denominados, T 11, T 14B, T 5B, T 6B, T 10A, T 10B, T 11, T 12A, T 12B, T 15A, T 15B, T 16, T 17A, T 17B, T 20, T 21, T 22 y T 23 sobre Fusarium oxysporum forma phaseoli, causante del "amarillamiento" del frijol en el Departamento de Nariño.

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño. En cajas Petri con PDA, los aislamientos de Trichoderma invadieron el crecimiento del patógeno. Sin embargo, en cultivos establecidos por Fusarium oxysporum forma phaseoli, únicamente T 17A, T 22 y T 23 tuvieron capacidad de invadir el micelio de aquel. Pathogen.

En ensayos de invernadero y de campo se empleó la variedad de frijol "Mortino" y dos sistemas de incorporación de los antagonicos: suspensión de esporas y mezcla de éstas con estiércol de ganado vacuno esterilizado y seco. De acuerdo con los resultados se observó un mejor efecto en la incorporación de la suspensión de esporas. It showed a better effect.

De las cepas estudiadas, T 23, T 17A y T 22 fueron las más efectivas contra el patógeno en invernadero y en campo y T 16 mostró mejor efectividad en invernadero únicamente. house only.

VII. BIBLIOGRAFIA

9. GUERRERO, C.R. y ORELLANA, N. Efecto antagonico de algunos microorganismos sobre Sclerotium cepivorum Berk. patógeno del ajo (Allium sativum L.) a niveles de laboratorio y campo en el Alto-Plano de Pasto. Tesis Ing. Agr. Pasto, Colombia, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, 1977. 48 p. (Mecanografiada).

10. MADAR, Y., CHET, I. y MENIS, Y. Biological control of Rhizoctonia solani, damping-off with wheat bran culture of Trichoderma harzianum. Phytopathology 69: 84-88. 1979

11. BARMAN, G.E., CHET, I. y LAWER, R. Trichoderma hamatum effects on seed and seedling disease, induced in radish and pea by Pythium spp. of Rhizoctonia solani. Phytopathology 70: 1167-1172. 1980

12. DOMANSKI, S. Preliminary study on bult rots in spruce stand. Sylvan 112(2): 13-27. 1968. In Review of Applied Mycology 48(5): 266. 1969.

13. DUBOS, B. y RICARD, J.L. Curative treatment of peach tress against silver leaf disease (Stereum purpureum) with Trichoderma viride preparations. Plant Disease Reporter 58(2): 147-150. 1974. In Review of Plant Pathology 53(11): 997. 1974.

14. HOWELL, G.R. y STIPANOVIC, R.D. Control of Rhizoctonia solani on cotton seedlings with Pseudomonas fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69: 447-449. 1979

15. ELAD, Y., KATAN, J. y CHET, I. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. Phytopathology 70: 418-422. 1980

16. ELAD, Y., CHET, I. y KATAN, J. Trichoderma harzianum: a biocontrol agent effective against Sclerotium rolfsii and Rhizoctonia solani on cotton seedlings. Phytopathology 70: 112-115. 1980

17. JUSTOVIC, N. Hyperparasitism on fungi and the biological control of plant diseases. Crvena Zvezda Ser. Bot. 19(2): 173-180. 1967.

18. FRAVEL, D.R. y SPURR, H.W. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by Bacillus cereus subsp. mycoides in a controlled environment. Phytopathology 67: 930-932. 1977.

9. GUERRERO, O.É. y ORELLANA, M.G. Efecto antagónico de algunos microorganismos sobre Sclerotium cepivorum Berk. patógeno del ajo sed (Allium sativum L.) a niveles de laboratorio y campo en el Altiplano de Pasto. Tesis Ing. Agr. Pasto, Colombia, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, 1977. 48 p. (Mecanografiado). Trichoderma koningii Gud. in the biological control of fusariosis of pea. Mirologiya : Fitopatologiya 8(2): 108-112. 1974. In
10. HADAR, Y., GHET, I. y HENIS, Y. Biological control of Rhizoctonia solani, Damping-off with wheat bran culture of Trichoderma harzianum. Phytopathology 69 : 64-68. 1979
11. HARMAN, G.E., GHET, I. y BAKER, R. Trichoderma hamatum effects on seed and seedling disease, induced in radish and pea by Pythium spp. or Rhizoctonia solani. Phytopathology 70: 1167-1172. 1980
12. HENIS, Y., CHAFFAR, A. y BAKER, R. Integrated control of Rhizoctonia solani, Damping-off or radish : effect of successive plantings of PGNB, and Trichoderma harzianum on pathogen and disease. Phytopathology 68 : 900-907. 1978
13. HOGH, H.G. y ABAWI, G.S. Biological control of Pythium root rot of table betw with Corticium sp. Phytopathology 69 : 417-419. 1979
14. HOWELL, G.R. y STIPANOVIC, R.D. Control of Rhizoctonia solani on cotton seedlings with Pseudomonas fluorescens and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69: 480-482. 1979
15. _____ y STIPANOVIC, R.D. Suppression of Pythium ultimum induced Damping-off of cotton seedlings by Pseudomonas fluorescens and its antibiotic, Pyoluteoria. Phytopathology 70: 712-715. 1980
16. JOSIFOVIC, M. Hyperparasitism on fungi and the biological control of plant diseases. Studie Cerc. Biol. Ser. Bot. 19(2): 173-180. In Review of Applied Mycology 46(12): 670. 1967.

17. KELLEY, W.D. Evaluations of Trichoderma harzianum impregnated clay granules as a biocontrol of Damping-off of pine seedling caused by Phytophthora cinnamomia. *Phytopathology* 66 : 1023-1027. 1976
18. KIRIK, W.N. y STEBLYUK, N.I. Assessment of the effectiveness of Trichoderma koningii Gud. in the biological control of fusariosis of pea. *Mirologiya : Fitopatologiya* 8(2): 108-112. 1974. In Review of Plant Pathology 53(2): 1007. 1974.
19. KOMMENDAHL, T. y NEW, I. CH. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonist. *Phytopathology* 65: 296-300. 1974
20. _____ y WINDELS, G.E. Evaluation of biological seed treatment for controlling root diseases of pea. *Phytopathology* 68 : 1087-1095. 1978
21. KUDRYAUTSEVA, K.I. Effect of Trichoderma lignorum (Tode) Harz on the growth and development of cucumber under cover. In Review of Plant Pathology 51(10): 666. 1972
22. MAROIS, J.J. y MITCHEL, D.J. Effects of fumigation and fungal antagonist on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in Fusarium crown rot of tomatoe. *Phytopathology* 71: 167-170. 1981
23. MOLINA V., L.A. Control biológico de hongos. Bogotá, D.E., Colombia. 1976. 26 p.
24. MORQUER, R. y TOUVET, A. Comparative action of antagonist fungi against various Hymenomycete parasites of resinous trees. *Compter Rendus Hebdomadaires de Seases de L'Academic de Sciences*, D. 278 (6): 709-713. 1974. In Review of Plant Pathology 53(10): 823-824. 1974

17. KELLEY, W.D. Evaluations of Trichoderma harzianum impregnated clay granules as a biocontrol of Damping-off of pine seedling caused by Phytophthora cinnamomia. Phytopathology 66 : 1023-1027. 1976
18. KIRIK, W.N. y STEBLYUK, N.I. Assessment of the effectiveness of Trichoderma koningii Gud. in the biological control of fusariosis of pea. Mirologiya : Fitopatologiya 8(2): 108-112. 1974. In Review of Plant Pathology 53(2): 1007. 1974.
19. KOMMENDAHL, T. y NEW, I. CH. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonist. Phytopathology 65: 296-300. 1974
20. _____ y WINDELS, C.E. Evaluation of biological seed treatment for controlling root diseases of pea. Phytopathology 68 : 1087-1095. 1978
21. KUDRYAUTSEVA, K.I. Effect of Trichoderma lignorum (Tode) Harz on the growth and development of cucumber under cover. In Review of Plant Pathology 51(10): 666. 1972
22. MAROIS, J.J. y MITCHEL, D.J. Effects of fumigation and fungal antagonist on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in Fusarium crown rot of tomatoe. Phytopathology 71: 167-170. 1981
23. MOLINA V., L.A. Control biológico de hongos. Bogotá, D.E., Colombia. 1976. 26 p.
24. MORQUER, R. y TOUVET, A. Comparative action of antagonist fungi against various Hymenomycete parasites of resinous trees. Comptes Rendus Hebdomadaires de Seances de L'Academic de Sciences, D. 278 (6): 709-713. 1974. In Review of Plant Pathology 53(10): 823-824. 1974