

PARASITISMO *IN VITRO* DE 23 AISLAMIENTOS DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* CONTRA *RHIZOCTONIA SOLANI* Y *FUSARIUM OXYSPORUM*

José Arturo Solórzano Arroyo¹, Cristina Vargas-Chacón¹

Resumen

Parasitismo *in vitro* de *Trichoderma asperellum* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antagónica de 23 aislamientos del hongo *Trichoderma asperellum*, sobre los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* aislados de plantas de arroz y tomate respectivamente. Se utilizaron 23 aislamientos de *Trichoderma asperellum* y un aislamiento de cada fitopatógeno. Se emplearon placas Petri con medio de cultivo PDA para realizar las pruebas de parasitismo, mediante la técnica de enfrentamientos duales. Para evaluar el nivel de parasitismo se utilizó la escala de Bell. Se realizó un ANDEVA y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un 95% de confianza. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre tratamientos con *Rhizoctonia solani*. Un 17% de los tratamientos de *Trichoderma*, INTA-H-4, INTA-H-5(b), INTA-H-7(b), e INTA-H-35 (b,c) lograron parasitar en pocos días al fitopatógeno, con un valor de 1 en la escala de Bell; otro grupo de aislamientos lograron un parasitismo parcial con valores entre 2 y 3 en la escala. Los aislamientos INTA-H-1(a) e INTA-H-1(b), INTA-H-12(1), INTA-H-12(a) e INTA-H-34(a), que incluyó productos comerciales y recolectados en campo, no mostraron una patogenicidad *in vitro* eficiente contra *R. solani*. No se determinaron diferencias estadísticamente significativas con *F. oxysporum*. Este patógeno logró mantenerse en el medio de cultivo sin que ningún aislamiento de *Trichoderma asperellum* lo parasitara por completo, obteniéndose únicamente grados de parasitismo entre 2,2 y 3.5 en la escala de Bell.

Palabras clave: Antagonismo, porcentaje de inhibición, control biológico, micoparasitismo.

Keywords: Antagonism, percent Inhibition, biocontrol, mycoparasitism.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por organismos fitopatógenos son la principal causa de pérdidas económicas en la producción agrícola (Benitez *et al.* 2004). Algunas son causadas por hongos habitantes de suelo, de amplia diversidad en su forma y modo de ataque a los cultivos. La persistencia de algunas de estas enfermedades ha aumentado durante los últimos años, debido al uso indiscriminado

¹ Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. asolorzano@inta.go.cr, cvargas@inta.go.cr. Sede del Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

de plaguicidas y el cambio de prácticas agrícolas, provocada por la generación de resistencia a los agroquímicos (Cruz 2007).

Las especies de *Trichoderma* spp. son probablemente los agentes de control biológico más estudiados para el combate de fitopatógenos del suelo (Harman 2006). Existen numerosas publicaciones donde se describe la acción antagonista de *Trichoderma lignorum*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. harzianum* o *T. koningii* sobre patógenos como *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rosellinia bunodes*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *P. parasítica* y *Botrytis cinerea* (Aquino-Martínez, et al. 2008; Sarro et al 2011; Bell et al. 1982; Mora y Solórzano 2003; Guigón-Lopez et al. 2010; Harman, 2006; Harman 2011; Harman y Shores, 2007). El INTA de Costa Rica, ha realizado investigaciones con algunas cepas de *Trichoderma* spp., que han evidenciado su capacidad antagónica contra hongos que causan enfermedades, como la Malla o *Rosellinia bunodes* en el cultivo de Helecho hoja de cuero, utilizando los hongos *Trichoderma lignorum*, *T. pseudokoningii* y *T. viridae* recuperando plantas con 100% de incidencia. La enfermedad conocida como el Mal de talluelo del café (*Rhizoctonia solani*) fue controlada con *Trichoderma harzianum* y *T. viridae*. (Mora y Solórzano 2003; Solórzano, et al. 2004).

El potencial como agente de biocontrol de cepas de *Trichoderma*, se puede determinar en estudios “*in vitro*” para identificar los antagonistas y definir su potencial, antes de efectuar estudios en campo que requieren más tiempo y costo económico (Guigón-Lopez, et al. 2010). La inhibición del crecimiento *in vitro* de hongos patógenos por agentes de control biológico antagonistas se ha descrito ampliamente. La metodología más habitual es la del enfrentamiento equitativo o dual de ambos microorganismos (Aquino-Martínez et al 2008; Guigón-López y González-González 2004), inoculándose al mismo tiempo o no, generalmente en forma de “plug” o gota y determinándose posteriormente su eficacia. Para medir el parasitismo, se han desarrollado varias técnicas como los grados de parasitismo mediante la escala de Bell (Bell et al 1982), mediante la fórmula de inhibición por competencia de Abbott modificada (Aquino-Martínez et al 2008) o bien mediante pruebas de antibiosis (Arzate et al. 2006).

El estímulo clave para inducir el micoparasitismo en *Trichoderma*, son los productos de degradación de quitina liberados de la pared celular de los fitopatógenos y de moléculas liberadas por el patógeno por la acción de las enzimas del *Trichoderma* degradadoras de la pared celular. Estas moléculas no sólo estimulan el hongo biocontrolador y su actividad antagonista mediante la activación de la expresión génica micoparasítica en cascada, sino que además actúan como inductores del sistema de defensa de las plantas en las células de la planta huésped expuestas o cuando se inyectan a las raíces y hojas (Woo y Lorito 2007).

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antagónica de 23 aislamientos del hongo *Trichoderma asperellum*, sobre los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* aislados de plantas de arroz y tomate respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en la provincia de San José, Cantón Central, distrito Mata Redonda.

Cultivos de *Trichoderma* y Fitopatógenos

Los aislamientos de *Trichoderma asperellum* y los hongos fitopatógenos fueron cultivados en placas Petri plásticas de 94 X 16 mm con medio de cultivo artificial Papa Dextrosa Agar (PDA), acidificado con ácido láctico al 25% (pH aproximado de 4.0). El ensayo *in vitro* se realizó en placas Petri con las mismas características.

Preparación de los tratamientos

Los hongos utilizados en los tratamientos se obtuvieron de la micoteca del INTA, la cual contiene cepas aisladas del suelo, plantas enfermas o sanas de varias localidades del país, además de productos de origen comercial. A fin de asegurar el mayor potencial antagonista y patogénico de los hongos utilizados, se procedió a revigorizarlos, mediante la exposición a condiciones de competencia.

Para el hongo fitopatógeno *R solani*, se colocó un disco de 5 mm de diámetro de medio de cultivo PDA, conteniendo el hongo sobre hojas de arroz previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% y lavadas con abundante agua para eliminar restos del desinfectante. Las hojas se colocaron dentro de una placa Petri con una toalla húmeda en la base y se dejó que el hongo se desarrollara por 2 semanas. Los esclerocios formados, fueron transferidos a un medio PDA para obtener el hongo revigorizado. Para revigorizar el fitopatógeno *F. oxysporum*, se colocó el hongo en un suelo estéril húmedo durante dos semanas y luego se re-aisló.

Finalmente, los aislamientos de *Trichoderma* spp., se pusieron a competir, mediante la técnica de enfrentamiento dual, con el hongo *Fusarium* sp. y luego de una semana se reaislaron y purificaron. En la técnica de enfrentamiento dual, se colocan discos de PDA con el hongo "antagonista" y el fitopatógeno en los extremos de una placa Petri con PDA acidificado, a una distancia del borde de 15 mm.

En cuadro 1, se indican los microorganismos utilizados en el estudio. Previamente, mediante técnicas moleculares se identificaron los hongos de la especie *Trichoderma* spp.

Cuadro 1. Aislamientos de *Trichoderma asperellum* evaluados y cultivos de hongos fitopatógenos empleados¹. Micoteca del INTA. 2013.

Tratamiento:	Descripción	Origen
INTA-H-37	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-1(b)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-7(b)	<i>T. asperellum</i>	Sarapiquí Heredia
INTA-H-5(b)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-4	<i>T. asperellum</i>	Desamparados
INTA-H-34(a)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H- 2(1)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-12(a)	<i>T. asperellum</i>	Puriscal
INTA-H-2(b)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-6(a)	<i>T. asperellum</i>	Laboratorio INTA
INTA-H-2(c)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-16(2b)	<i>T. asperellum</i>	Cartago
INTA-H-2(a)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-12(1)	<i>T. asperellum</i>	Puriscal
INTA-H-16(2a)	<i>T. asperellum</i>	Cartago
INTA-H-35(b,c)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-6(b)	<i>T. asperellum</i>	Lab. INTA
INTA-H-1(a)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-34(b)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-16(1a,b)	<i>T. asperellum</i>	Cartago
INTA-H-36(b)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
INTA-H-7(a)	<i>T. asperellum</i>	Sarapiquí Heredia
INTA-H-5(a)	<i>T. asperellum</i>	Comercial
Fitopatógeno 1	<i>Rhizoctonia solani</i>	Aislamiento de arroz
Fitopatógeno 2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Aislamiento de tomate

Parasitismo según escala de Bell

Para evaluar el parasitismo, se utilizó la técnica de enfrentamiento dual, colocando un disco de 5 mm con medio de cultivo con el hongo "tratamiento", en uno los extremos, a 15 mm de distancia del borde de un plato Petri con PDA acidificado y en el otro extremo se coloca un disco de igual medida del hongo fitopatógeno. Dado que el fitopatógeno *F. oxysporum* tiene un crecimiento más lento que los *Trichodermas*, se colocaron los discos con el fitopatógeno en las placas Petri, dos días antes que los tratamientos. El parasitismo se evaluó cualitativamente y se categorizó en 5 grados de antagonismo, acorde con la escala cualitativa desarrollada por Bell, *et al.* 1982, la cual establece cinco clases a saber:

1. *Trichoderma* sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie.
2. *Trichoderma* sobrecrece las dos partes de la superficie del medio.
3. *Trichoderma* y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro
4. El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión de *Trichoderma*.
5. El patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* y ocupa toda la superficie del medio. (Ver Figura 1).

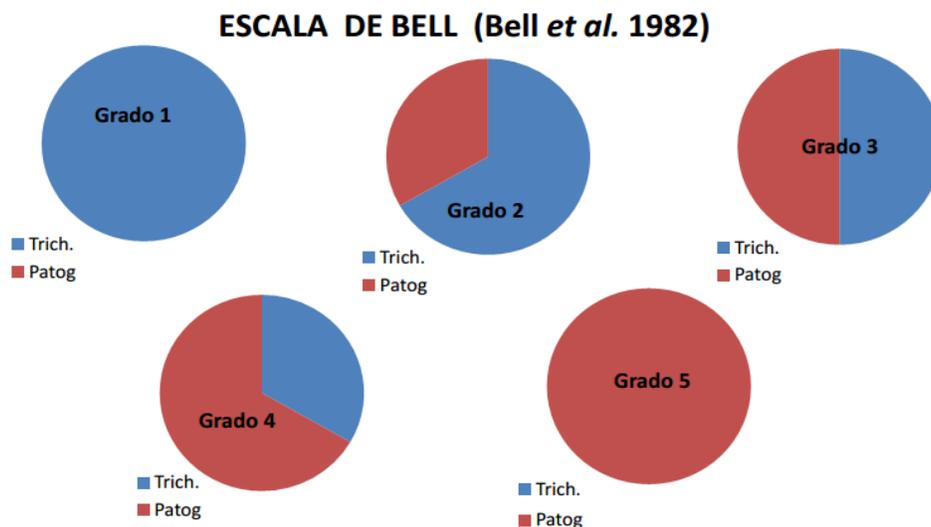


Figura 1. Escala de grados de parasitismo de *Trichoderma* sp sobre un hongo fitopatógeno. Bell *et al.* 1982.

VARIABLES EVALUADAS

La principal variable fue el grado de antagonismo según escala pictórica de Bell. En los casos donde se observaron halos de inhibición durante la revigorización, se midió el halo de inhibición y el crecimiento radial del hongo.

Diseño experimental y Análisis estadístico

Se empleó un diseño completo al azar con cuatro repeticiones. Se realizó un análisis de varianza ANDEVA y una prueba de separación de medias Tukey a $p < 0.05$, mediante el programa SAS (Statistical Analysis System, ver 9.0 2005).

RESULTADOS y DISCUSION.

Los aislamientos de *Trichoderma* mantenidos en aceite y en refrigeración a 4°C se cultivaron en medio PDA acidificado y luego se revigorizaron utilizando los patógenos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Fueron necesarias tres revigorizaciones de los aislamientos de *T. asperellum*, dos con *R. solani* y una contra *Fusarium oxysporum*; con lo cual se garantizó el vigor adecuado para su desarrollo y desempeño *in vitro*. Los fitopatógenos estaban recién aislados, así que solo se revigorizaron una vez a fin de garantizar su capacidad metabólica.

A pesar de que todos los *Trichoderma* pertenecen a la misma especie, se observaron diferencias en los crecimientos en cuanto a tonos de verde, crecimiento radial y esporulación, aún después de la revigorización (figura 2). Similares resultados fueron obtenidos por Rodríguez y Wang 2020 con aislamientos de *Trichoderma* que fenotípicamente fueron diferentes, pero genéticamente no se diferenciaron. Por lo tanto, es importante emplear otros marcadores moleculares

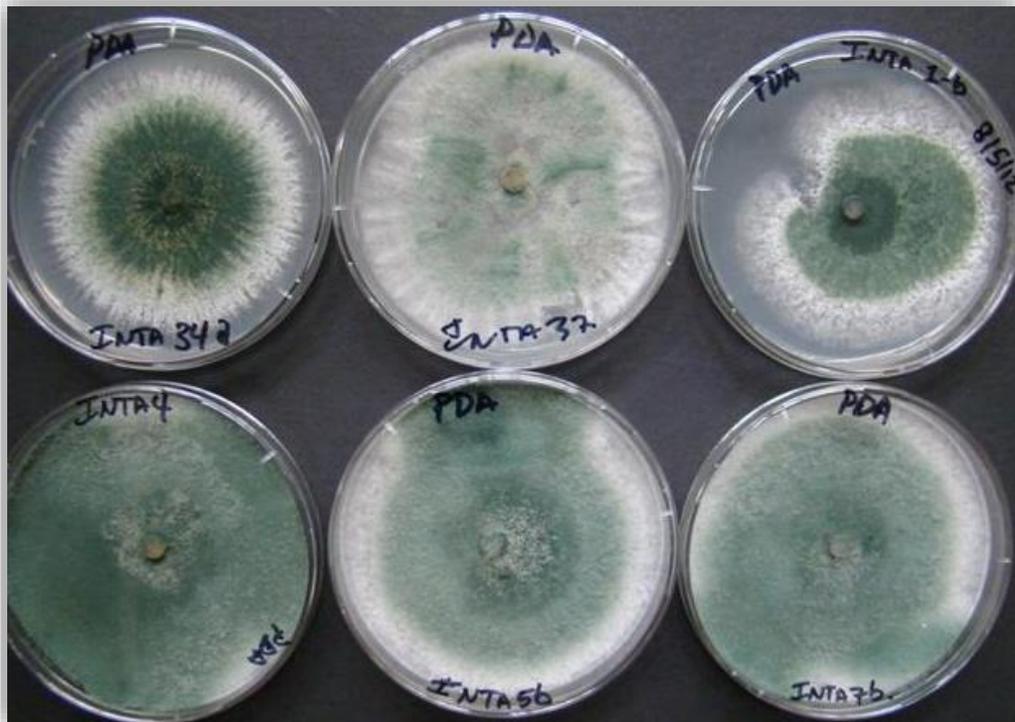


Figura 2. Aislamientos de *T.asperellum* revigorizados. INTA 2013.

En la etapa de revigorización, se observó la formación de halos de antibiosis con *R.solani*, esto por lo general se debe a la presencia de sustancias antibióticas producidas por el hongo, en respuesta al estímulo del antagonismo que tiene con el fitopatógeno. Los aislamientos de *T. asperellum* que produjeron esta respuesta metabólica (cuadro 2), son promisorios para ser estudiados en la producción y secreción de metabolitos, a fin de identificarlos, caracterizar el mecanismo de acción que hace que estas sustancias impidan el desarrollo de hongos fitopatógenos y determinar un proceso de producción de dichas sustancias para uso agrícola.

Cuadro 2. Halos de inhibición presentados por algunos de los aislamientos de *Trichoderma* de la sobre *R. solani*. INTA 2013.

Aislamiento	Crecimiento radial (cm)	Halo inhibición (mm)
INTA-H-2	4,2 cm	6 mm
INTA-H-4	5.2 cm	10 mm
INTA-H-5	5 cm	8 mm
INTA-H-6	2,8 cm	3 mm
INTA-H-35	4 cm	5 mm
INTA-H-36	4,2 cm	6 mm

En los procesos de antibiosis, se da una secreción de metabolitos secundarios como trichodermina, gliovirina y gliotoxina que inhiben la germinación del fitopatógeno (Arauz 2011). En el año 1993, varios investigadores identificaron, purificaron y caracterizaron varias enzimas que inhibieron la germinación de las esporas y la elongación de las hifas de hongos patogénicos en condición *in vitro*; algunas de estas sustancias identificadas son chitobiosidasa y N-acetil-b-D-glucosaminidas inhibitorias de *Botrytis cinerea*, *Fusarium* y *Alternaria* (Lorito *et al.* 1993).

La etapa de revigorización de los aislamientos de *Trichoderma*, permitió la recuperación de las capacidades antagónicas de los aislamientos y una valoración preliminar de la capacidad de parasitismo de cada uno de los aislamientos. En general, se observó que el grado de antagonismo de los aislamientos de *Trichoderma* fue mayor contra *R. solani* que sobre *F. oxysporum*. En la Figura 3,

se observa el crecimiento invasivo de *Trichoderma* sobre los discos de *R. solani*, pero no logra desarrollarse sobre *F. oxysporum*.



Figura 3. Revigorización *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* sp sobre *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. INTA 2013.

Como se observa en la figura 4, algunos de los aislamientos de *T. asperellum*, desde la etapa de revigorización mostraron un fuerte parasitismo, tal es el caso de INTA 4; mientras que otros aislamientos como el INTA 1B, no mostró parasitismo alguno y el plato Petri con PDA fue rápidamente colonizado por el fitopatógeno.

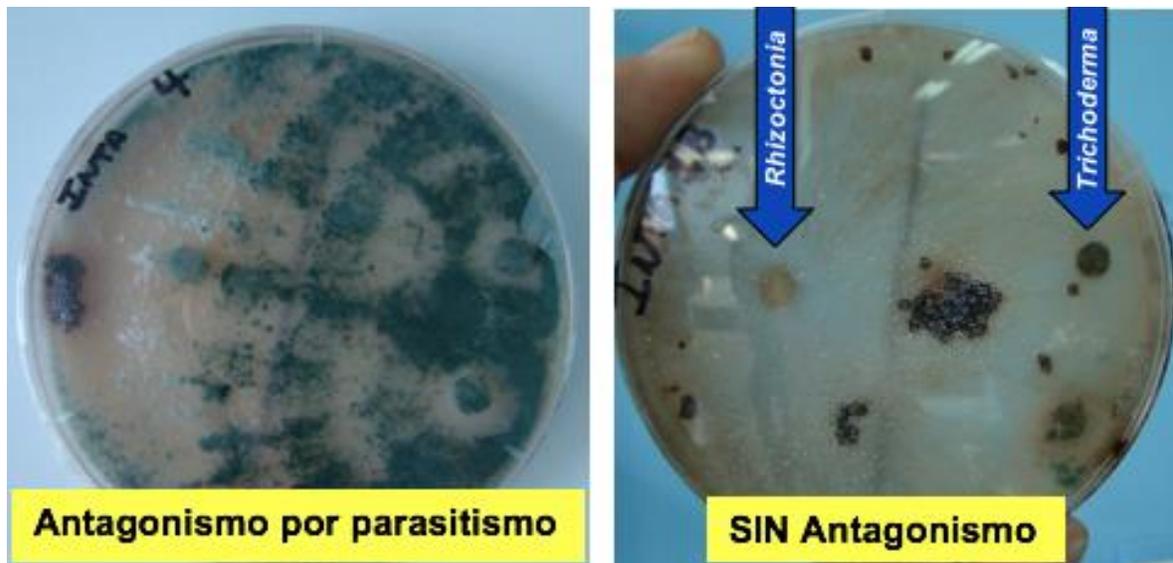


Figura 4. Antagonismo de *Trichoderma* INTA 4 y 1B sobre *R. solani* en estudios de revigorización. INTA 2013.

La técnica de revigorización de aislamientos resultó ser ventajosa, no solo para activar el metabolismo de los microorganismos, sino para tamizar y seleccionar mediante una técnica *in vitro* económica, simple y rápida, cepas promisorias en el

control biológico específico o cepas productoras de sustancia de interés en el manejo de fitopatógenos, en caso de contar con muchos aislamientos.

Mediante la escala de Bell, se estimó el grado de parasitismo por inhibición de crecimiento de *R. solani* con los tratamientos evaluados. Se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$). Los grados de parasitismo fueron variables, siendo algunos muy buenos antagonistas, otros con un parasitismo intermedio (figura 5) y otros no evidenciaron ningún parasitismo y más bien fueron superados por el fitopatógeno.

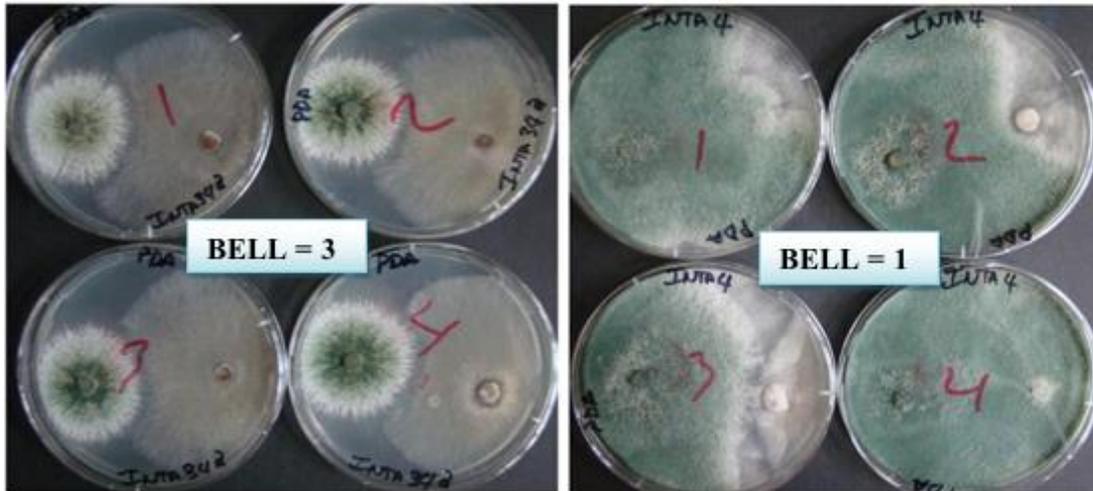


Figura 5. Grado de inhibición *in vitro* de crecimiento de *Rhizoctonia solani* por cepas de *T. asperellum*: INTA 34 a e INTA 4. INTA 2013

Un 56% de los Trichodermas presentaron un parasitismo entre los grados 1 y 2 en la escala de Bell. El grupo de tratamientos que mostró el mejor grado de parasitismo (100%) que corresponde al grado 1 en la escala de Bell estuvo conformado por INTA-H-4, INTA-H-5(b), INTA-H-7(b) e INTA-H-35(b, c). Este es el mejor resultado esperado de un controlador biológico, ya que el crecimiento del antagonista cubrió toda la placa Petri impidiendo el desarrollo del fitopatógeno *R. solani*. Estos cuatro tratamientos no se diferenciaron estadísticamente de otro grupo de Trichodermas, INTA-H-6(a), INTA-H-6(b), INTA-H-16(2b), INTA-H-36(b), INTA-H-7(a), INTA-H-2(b), INTA-H-2(c), INTA-H-34(b) e INTA-H-5(a), que obtuvieron valores entre 1 y 2 en la escala de parasitismo de Bell (Figura 6).

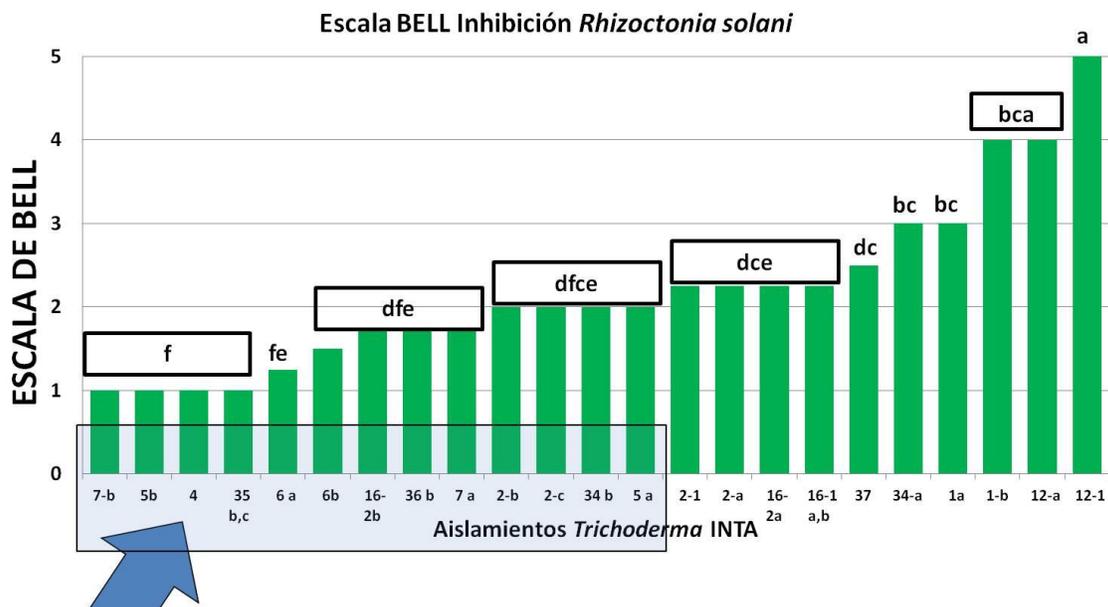


Figura 6. Grado de inhibición de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* según escala de Bell 1982. INTA 2013.

El tratamiento INTA-H-12(1) no mostró parasitismo alguno, obteniendo un valor de 5 en la escala de Bell, en este caso *R. solani* cubrió toda la placa de Petri. Los tratamientos INTA-H-1(b) e INTA-H-12(a), presentaron valores de grado 4 en la misma escala, con un mínimo grado de inhibición de *R. solani*, resistiéndose el patógeno a ser colonizado. Los tratamientos INTA-H-2(1), INTA-H-2(a), INTA-H-16(2a), INTA-H-16(1a,b), INTA-H-37, INTA-H-34(a) e INTA-H-1(a) presentaron niveles de inhibición entre 2 y 3, siendo significativamente diferentes a los mejores tratamientos para esta misma variable.

El grado de parasitismo de *F. oxysporum* fue mucho menor que el de *R. solani*. Ninguno de los aislamientos evaluados logró parasitar completamente a *F. oxysporum*. Las valoraciones de escala de Bell para la variable grado de parasitismo no mostró diferencias significativas ($p= 0.2147$). A pesar de que algunos tratamientos presentaron en repeticiones grados entre 4 y 2, en promedio, todos los tratamientos oscilaron entre 2.5 y 3.3 (figura 7). El hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, presentó en casi todos los tratamientos un fuerte halo de inhibición, particular de este hongo que produce ácido fusárico que actúa en forma de fitotoxina en medio de cultivo.

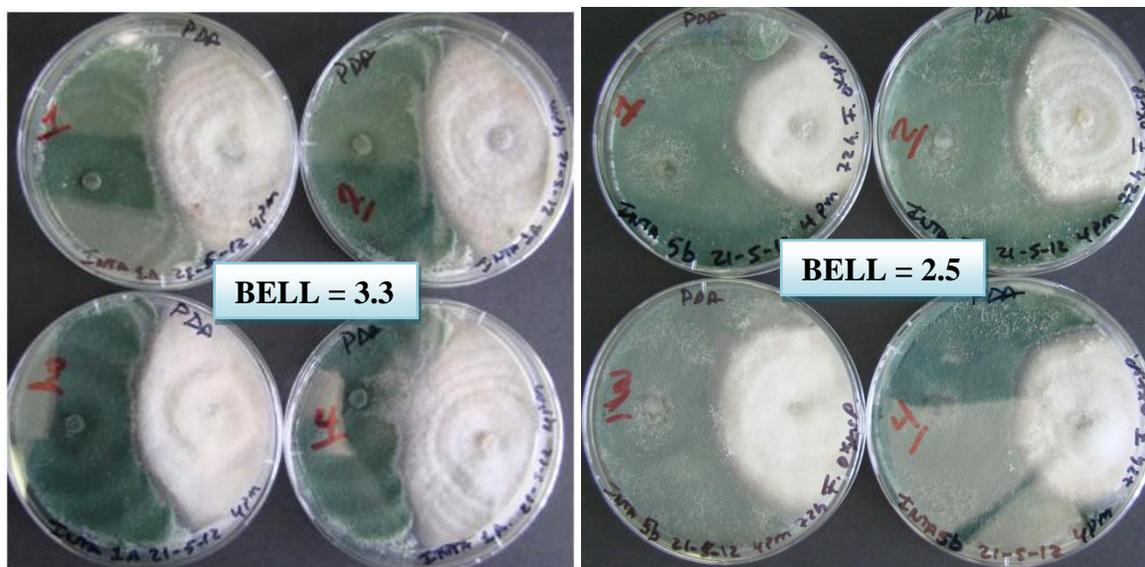


Figura 7. Grado de inhibición de *Fusarium oxysporum* por *Trichoderma* según escala de Bell 1982. INTA 2013.

Similar resultado obtuvo Mahato (2005), el cual determinó la capacidad inhibitoria de *T. viridae* contra *Sclerotium rosffii*, pero no contra *Fusarium solani*. En las investigaciones realizadas por Sarro *et al.* 2011, preparó un medio de cultivo líquido con *Trichoderma lignorum* y a las 24 horas le agregó *F. oxysporum* logrando la inhibición completa del fitopatógeno a todas las concentraciones que utilizó; mientras que cuando incubó previamente a *F.oxysporum* el *Trichoderma* solo inhibió el crecimiento significativamente a concentraciones más bajas (1×10^2 ó 1×10^3 esporas/ml) del fitopatógeno.

Los resultados obtenidos en este estudio y en previos, indican que los estudios de antagonismo con *Fusarium oxysporum* se deben investigar a profundidad, a fin de determinar el mejor momento de aplicación o bien, estudiar las sustancias que producen ambos hongos y que sin duda juegan un papel importante en el combate de este fitopatógeno. Estudios recientes en pruebas *in vitro* por Rodríguez y Wang 2020 empleando una escala de inhibición por el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) con la fórmula utilizada por Ezziyyani *et al.* (2004) obtuvieron parastismo sobre *F. oxysporum* con cepas de *T. asperellum*, *T. asperelloides* y *T. guizhouense* con valores cercanos entre 52 y 70% lo cual equivale a unos valores entre 3 y 4 de la escala de Bell. Los resultados contradictorios en la inhibición de *F. oxysporum* ha sido planteada por Ploetz (2004) y depende de la eficiencia de los ensayos *in vitro* o invernadero bajo condiciones controladas y por lo tanto no se puede generalizar para todos las cepas de *Trichoderma*.

Finalmente es importante recalcar que los aislamientos INTA-H-4, INTA-H-5(b), INTA-H-7(b) e INTA-H-35(b, c) presentaron el mejor parasitismo contra *Rhizoctonia solani* y de estos, INTA-H-4 e INTA-H-5(b) presentaron los mayores halos de inhibición, lo que los hace ser potencialmente útiles en el manejo de éste

fitopatógono el cual afecta varios cultivos de importancia agrícola como el arroz, la papa, el café y el chile dulce entre otros.

La eficacia biológica de diferentes aislamientos de *T. asperellum*, va más allá de la especie por lo que se debe tener especial cuidado al seleccionar este antagonista, ya que demostraron que su antagonismo es variable. Además, se deben hacer más estudios para el control biológico de hongo *Fusarium oxysporum*, un patógeno importante por su amplia distribución, por su gama de hospederos de importancia agrícola y que produce metabolitos que lo hacen altamente resistente.

LITERATURA CITADA.

Aquino-Martínez, JG; Vázquez-García, LM; Reyes-Reyes, BG. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht.f. sp. Dianthi (Prill. Y Delacr.) Snyder y Hans con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de villa Guerrero. Revista Mexicana de Fitopatología 26(2):127-137.

Arauz, LF. 2011. Fitopatología un enfoque agroecológico. 2 ed. Editorial UCR, UCR (Universidad de Costa Rica), San José Costa Rica. 400 p.

Arzate, J; Aceves-Michel, A; Domínguez, VM; Santos, O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de Sigatoka Negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. México. 24(2):98-104.

Bell, DK; Wells, HD; Markham, CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology Vol 72(4): 379-382.

Benitez, T; Rincón, A; Limón, M; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7(4):249-260.

Cruz M, LC. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto (en línea). Tesis Lic. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Consultado 08 abril. 2020.. Disponible en <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>

Ezziyiani, M; Pérez, S; Requena, M; Rubio, L; Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Ann. de Biol. 26:69-78.

Harman, GE. 2006. Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 78:190-194

- Harman, GE. 2011. *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39:103-108.
- Harman, GE; Shores, M. 2007. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. *In* Vurro, M; Gressel, J (eds.) *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*. Dordrecht, the Netherlands: Springer. p. 131–155.
- Mahato, U, 2005. Characterization of native isolates of *Trichoderma* spp. and cloning of endochitinase gene. Tesis Mag. Sc. Ciudad, País. University of Agricultural Sciences, Dharwad. 82 p.
- Lorito, M; Harman, GE; Hayes, CK; Broadway, RM; Troncoso, T; Woo, SL; Di Pietro, A. 1993, Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinase. *Phytopathology* 83:302-307
- Guigón-López C; Guerrero-Prieto, V; Vargas-Albores, F; Carvajal-Milán, E; Ávila-Quesada, G; Bravo-Luna, L; Ruocco, M; Lanzuine, S; Woo, S; Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2):32-39.
- Guigón-López, C; González-González, PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:117-124.
- Mora, B. Solórzano, JA., 2003. Control biológico de *Rosellinia bunodes*. En helecho hoja de cuero *Rhumora adiantiformis* con el hongo *Trichoderma lignorum*. *Memorias V Congreso Nacional de Fitopatología*. San José Costa Rica. 215 p.
- Ploetz, R. 2004. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96:653-656.
- Rodríguez-García, D; Wang-Wong, A. 2020. Efectividad a nivel *in vitro* *Trichoderma* spp. Nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense* 44(2): 109-125.
- Sarro, A; Lara, JM; Fernández, C. 2011. Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma lignorum* FEEP TL06001 frente a *Fusarium oxysporum* f.so. *lycopersici*. *Phytoma* 225:47-50.
- SAS. 2005. *Statistical Analysis System version 8*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Solórzano, JA; Mora, B; Bravo, O. 2004. Experiencias en el control biológico de enfermedades de suelo en helecho hoja de cuero, piña y café con el hongo *Trichoderma* spp. *In* Costa Rica. Memorias IV encuentro Nacional de agricultores experimentadores e investigadores en producción orgánica (5, 2004, Turrialba, Costa Rica). FIDA, RUTA, CATIE, FAO. Memoria. Turrialba, Costa Rica. CATIE p. 120.
- Woo, SL.; Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. *In* Vurro, M; Gressel, J (eds.). Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management. Dordrecht, the Netherlands: Springer. p. 107–130.