

# Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo

Evaluation of antagonism of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens

Karina Astorga-Quirós<sup>1</sup>  
Karla Meneses-Montero<sup>2</sup>  
Claudia Zúñiga-Vega<sup>3</sup>  
Jaime Brenes-Madriz<sup>4</sup>  
William Rivera-Méndez<sup>5</sup>

Fecha de recepción: 07 de octubre del 2013  
Fecha de aprobación: 21 de diciembre del 2013

Astorga-Quirós, K; Meneses-Montero, K; Zúñiga-Vega, C; Brenes-Madriz, J; Rivera-Méndez, W.  
Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo.  
*Tecnología en Marcha*. Vol. 27, N° 2. Pág 82-91

- 1 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: kariasq@yahoo.com.
- 2 Investigadora. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: kmeneses@itcr.ac.cr.
- 3 Académica. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@itcr.ac.cr.
- 4 Académico. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@itcr.ac.cr.
- 5 Académico. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: wrivera@itcr.ac.cr.

## Palabras clave

*Allium sativum*; *Bacillus subtilis*; *Trichoderma* sp.; *Sclerotium cepivorum*; *Pseudomonas marginalis*; *Penicillium* sp.

## Resumen

La producción y calidad del cultivo del ajo criollo (*Allium sativum*) se ven limitadas por diversas enfermedades de origen fungoso y bacterial, que llevan al productor a aplicar estrategias de control químico y en algunos casos abandonar la actividad por un incremento en las pérdidas. El control biológico es una estrategia útil para combatir este tipo de microorganismos. El objetivo de esta investigación consistió en evaluar el antagonismo in vitro de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres de los principales patógenos del ajo: *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* sp. y *Pseudomonas marginalis*. Las especies mencionadas se aislaron e identificaron con pruebas bioquímicas y claves taxonómicas respectivamente y se determinó su actividad antagonista y efecto inhibitorio utilizando el crecimiento en platos duales. La cepa de *B. subtilis* mostró un potencial con valores bajos de PICR: 14,087 ante *S. cepivorum* y 3,328 ante *Penicillium* sp., por lo que se clasifica como un mal biocontrolador. Por su parte, *Trichoderma* presentó un potencial muy alto, con valores de PICR de 40,210 frente a *S. cepivorum* y de 45,034 ante *Penicillium* sp., lo que indica que es un muy buen controlador. Los resultados apoyan el potencial de las cepas de *Trichoderma* sp. como agentes de control biológico frente a la pudrición causada por *Penicillium* del ajo, la bacteriosis por *P. marginalis* y la pudrición blanca por *S. cepivorum*. No así *Bacillus subtilis*, pues la cepa aislada demostró poco potencial como biocontrolador.

## Key words

*Allium sativum*; *Bacillus subtilis*; *Trichoderma* sp.; *Sclerotium cepivorum*; *Pseudomonas marginalis*; *Penicillium* sp.

## Abstract

The production and quality of the cultivate garlic field (*Allium sativum*) is limited by diverse fungal diseases and bacteria that lead the producer to implement the application of chemical control strategies and in some cases the abandonment of the activity by an increase in losses. Biological control is a useful strategy to combat these types of microorganisms. The objective of this research was to evaluate the in vitro antagonism of the *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* against three major pathogens of garlic: *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* sp. and *Pseudomonas marginalis*. The species mentioned were isolated and identified by biochemical and taxonomic keys respectively and tested for antagonistic activity and inhibitory effect on growth using dual plates. Strain *B. subtilis* showed a low potential with low values of PICR, 14,087 against *S. cepivorum* and 3,328 against *Penicillium* sp., this is bad biocontrol. Regarding *Trichoderma* sp, it presented a very high potential, with values of 40,210 PICR against *S. cepivorum* and 45,034 against *Penicillium* sp. The valuation classifies it as a very good biocontrol. The results obtained in these studies support the potential of the strains of *Trichoderma* sp as biological control agents against *Penicillium* sp garlic rot, *P. marginalis* bacteria and white rot by *S. cepivorum*. This is not the case with *B. subtilis*, as the isolate proved otherwise.

## Introducción

En Costa Rica, la producción y la calidad del cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) se ven limitadas por diversas enfermedades de origen fungoso, bacterial y viral, que inciden en la baja productividad y en una reducción de la superficie sembrada. Esto, sumado a las políticas arancelarias que reducen o anulan los impuestos a los productos importados, ha causado un incremento de las importaciones desde China y otros países que estancan o dejan rezagada, aún más, la producción del ajo criollo (Brenes et al. 2013, Guillén et al. 2011, Rivera et al., 2012).

Las enfermedades más comunes de esta hortaliza afectan tanto al follaje como a los órganos subterráneos, principalmente por la podredumbre de los bulbos causado por especies de *Penicillium*, podredumbre blanda en bulbos y sistema radicular por *Sclerotium cepivorum* Berk o bacteriosis ocasionadas por *Pseudomonas marginalis* (Lisboa, 2003, Rojas et al., 2009). En el caso de *S. cepivorum*, la gran capacidad de supervivencia de los esclerocios, que pueden permanecer en el suelo por hasta 20 años, dificulta aún más el manejo (Velásquez y Medina, 2004, Pinto et al., 1998).

Por su parte, el control biológico de plagas, una de las alternativas que existe, debe basarse en técnicas preventivas, fomentando el desarrollo óptimo de las plantas y su resistencia natural a plagas y enfermedades. Los microorganismos más usados en ajo incluyen *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Reinoso et al., 2006, Izzeddin y Medina, 2011). En el caso de *Trichoderma*, la especie *T. harzianum* ejerce su actividad de hiperparásito competitivo con la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, que provocan cambios estructurales a nivel celular, sin atacar a las plantas superiores; mientras que las cepas de *B. subtilis* se caracterizan por producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antifúngica que impiden el establecimiento de los patógenos (Ezziyani et al., 2004b).

Tanto *T. harzianum* como *B. subtilis* crecen rápidamente en cultivo líquido, forman endosporas y producen metabolitos secundarios que reducen la posibilidad de desarrollar resistencia por parte del patógeno. También presentan la ventaja de que se degradan de forma paulatina. El grado de ataque de estos antagonistas depende de factores como el

ambiente, el estado del tejido vegetal y, en el caso de los hongos, de la cantidad y calidad del inóculo (Hernández et al. 2007). Varios autores han analizado la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Se ha demostrado que *B. subtilis* no solo produce compuestos antibacteriales sino también antifúngicos (Santander, 2012).

El objetivo de esta investigación consistió en estudiar la capacidad antagonica in vitro del hongo *Trichoderma* sp. y la bacteria *B. subtilis* frente a tres patógenos del ajo: *S. cepivorum*, *P. marginalis* y *Penicillium* sp., para su utilización como una estrategia futura para lograr un control más efectivo de estas enfermedades en el campo.

## Materiales y métodos

### Localización y material experimental

Las pruebas y procedimientos se llevaron a cabo durante el segundo semestre de 2012 y 2013, en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) y los laboratorios de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

Para el bioensayo se emplearon muestras de tejido vegetal (bulbos de ajo blanco), rizosfera y suelo con signos de las diferentes enfermedades en el campo, procedentes de la zona norte de Cartago, Costa Rica.

### Aislamiento y caracterización de *Penicillium* sp., *Sclerotium cepivorum*, *Pseudomonas marginalis*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sp.

El aislamiento y caracterización de *Penicillium* sp., *S. cepivorum* y *P. marginalis* se realizó según la metodología utilizada por Astorga et al. (en prensa).

Para *B. subtilis* se utilizó el método descrito por Reyes et al. (2011). Se pesó 1 g de cada muestra de suelo y se suspendió en 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de centrifuga de fondo cónico de 15 ml. Se homogeneizó vigorosamente en un vórtex durante 3-5 min. Los tubos se colocaron a 80° C por 15 min y se sembraron 200 µl para una dilución final de 1:200 en placa Petri con medio agar nutritivo. Finalmente, se incubó a 28 ± 2° C durante 24 h. Se seleccionaron colonias según su forma, tamaño, bordes, elevación, color y textura con base en lo descrito por Claus y Berkeley (1986).

Se sembraron en forma individual en agar nutritivo, con 5 repeticiones de la muestra inicial. Se sembraron en medio agar sangre y se volvieron a cultivar en agar glucosado al 2%. A cada colonia se le realizó una caracterización bioquímica (Bergey, 2005). Se aplicaron las siguientes pruebas: oxidasa, catalasa, crecimiento en NaCl al 6,5%, asimilación de citrato, Voges-Proskauer, (producción de acetoina o 2,3 butanodiol), reducción de nitratos, almidón y rojo de metilo. Con la tinción de Gram, se determinó el tipo de pared y el tipo de agregación, mediante observación microscópica a 1000x.

Para los cultivos de *Trichoderma* sp. se activaron cepas conservadas a -10° C, provenientes de investigaciones realizadas en el cultivo del ajo en el CIB (Rivera 2011). Se inoculó una porción del tejido fúngico en medio PDA acidificado (ac) con ácido láctico e incubado a 28° C por 96 horas.

### Pruebas de antagonismo

Se desarrollaron pruebas de antagonismo usando la metodología de cultivo dual. En el caso de bacteria frente a bacteria, se incubaron cepas de *B. subtilis* y *P. marginalis* en un medio glucosado. Una placa Petri se rayó hasta la mitad con el patógeno y se colocaron 3 estrías perpendiculares del posible biocontrolador a 2 cm entre cada una.

Para las pruebas de bacterias contra hongos se empleó agar PDA para evaluar *B. subtilis* frente a *Penicillium* sp. y a *S. cepivorum*; así como para determinar la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp. frente *P. marginalis*. En estas, las bacterias se rayan en toda la placa y los hongos se colocan en un disco de 1 cm de diámetro en el centro de ella.

En el caso del hongo frente a hongo, se empleó PDA-ac. para evaluar a *Trichoderma* sp. contra *Penicillium* sp. y *S. cepivorum*. En estas placas se colocó un disco del patógeno y otro del posible biocontrolador en lados opuestos, a 1 cm del borde (Correa et al. 2007). Las placas se incubaron a 28 ± 1° C y los diámetros de crecimiento del patógeno y del biocontrolador se midieron a las 72, 96 y 120 horas.

Para la evaluación de la capacidad biocontroladora de los microorganismos se empleó la escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004a) (Cuadro 1) y el cálculo del Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial (PICR), que mide el antagonismo de los microorganismos evaluados. Este se obtiene a partir del crecimiento de cada patógeno en cultivo dual, junto con sus respectivos testigos, empleando la fórmula utilizada por Suárez et al. (2008):

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \cdot 100$$

donde  $R_1$  es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y  $R_2$  es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual).

Para las pruebas de bacteria vs bacteria se efectuó el cálculo del potencial antagonista, que consiste en medir el diámetro del halo de inhibición y sustraerlo del diámetro de la colonia del biocontrolador.

## Resultados y discusión

### Identificación de aislamientos del género *Bacillus*

Se determinó que los aislamientos corresponden a *B. subtilis*, tanto por la morfología de las colonias como por los resultados de las pruebas de identificación del género (figura 1, cuadro 2).

Cuadro 1. Escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004a) para la evaluación de la capacidad antagonista de los biocontroladores.

Grado	Capacidad antagonista	Potencial biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena	Muy malo
1	¼ Invasión de la superficie de la cepa patógena	Malo
2	½ invasión de la superficie de la cepa patógena	Deficiente
3	Total invasión de la superficie de la cepa patógena	Bueno
4	Total invasión de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella	Muy bueno

### Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis*

#### *Bacillus subtilis* vs *Pseudomonas marginalis*

Los resultados de las pruebas entre *B. subtilis* y *P. marginalis* (figura 2, cuadro 3) indican que esta cepa no tiene un buen efecto biocontrolador. La media estadística del potencial antagonista es 1,17 mm, por lo que la cepa de *B. subtilis* utilizada mostró un porcentaje bajo de poder antibiótico,

Los valores del potencial antagonístico a las 120 horas de cultivo, en la prueba de *B. subtilis* vs *P. marginalis*, presentaron un comportamiento estadístico normal ( $P=0,286$ ).

#### *Bacillus subtilis* vs *Sclerotium cepivorum*

Los resultados obtenidos en cultivo dual mostraron que *B. subtilis* no ejerció un buen control sobre el patógeno *S. cepivorum* (figura 3, cuadro 4). En

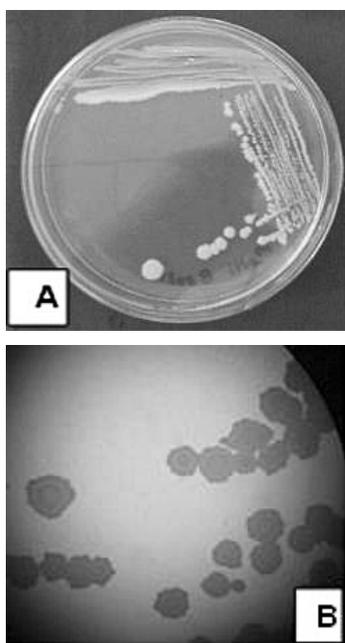


Figura 1. Características de las colonias de *Bacillus subtilis*. A y B) Morfología de colonias de *B. subtilis*, borde aserrado, centro elevado en forma de anillo con consistencia cremosa y pegajosa.

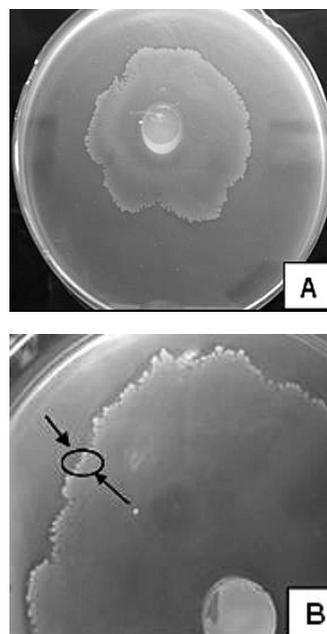


Figura 2. Confrontación de *Bacillus subtilis* vs *Pseudomonas marginalis*. A y B) *B. subtilis* vs *P. marginalis* a las 120 horas de incubación. Se observa la presencia de una pequeña zona clara que separa un microorganismo de otro.

Cuadro 2. Resultados de pruebas de identificación para *Bacillus subtilis*.

Pruebas	<i>Bacillus subtilis</i>	Pruebas	<i>Bacillus subtilis</i>
Gram	+	Agar Nutritivo 1% dextrosa	+
Sangre	+	Voges Proskauer	+
Glucosado	+	Citrato Simmonds	+
Peptona	+	Tolerancia 6,5% NaCl	+
Motilidad	+	Hidrólisis Almidón	+
Catalasa	+	Rojo de metilo	+
Nitrato	+	Oxidasa	+

Fuente: Laboratorio de Microbiología, CIB, ITCR 2012.

los valores del PICR a las 120 horas de cultivo se presentó un comportamiento estadístico normal ( $P = 0,339$ ).

### *Bacillus subtilis* vs *Penicillium* sp.

En la figura 4 y el cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos de la medición del antagonismo de

*B. subtilis* sobre *Penicillium* sp. En los valores de PICR a las 120 horas de cultivo se evidenció un comportamiento normal ( $P=0,851$ ). Como se puede observar, el biocontrolador no tuvo un buen control sobre el patógeno.

En el cuadro 6 se presenta el resumen de los resultados de *B. subtilis* frente a los patógenos del ajo evaluados.

Cuadro 3. Cálculo del potencial antagonista para *Bacillus subtilis* vs *Pseudomonas marginalis*.

Repetición	Potencial antagonista de <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Pseudomonas marginalis</i> (mm)
1	1,24
2	1,11
3	1,40
4	1,12
5	1,10
6	1,28
7	1,03
8	1,14
9	1,08
10	1,26

Cuadro 4. Cálculo del PICR para *Bacillus subtilis* vs *Sclerotium cepivorum*.

Repetición	PICR <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Sclerotium cepivorum</i>
1	14,22
2	15,56
3	14,82
4	12,70
5	14,62
6	13,99
7	15,89
8	12,20
9	12,28
10	14,59

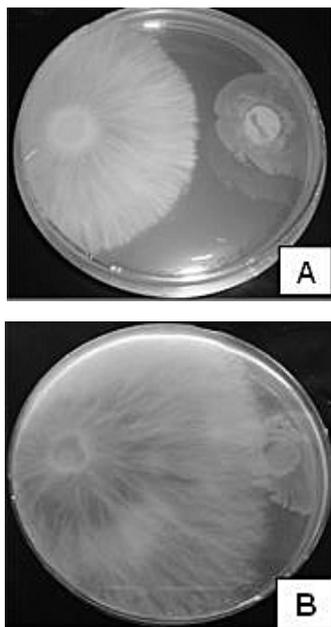


Figura 3. Confrontación de *Bacillus subtilis* vs *Sclerotium cepivorum*. A) Prueba a las 72 horas de incubación. B) Prueba a las 120 horas de incubación.

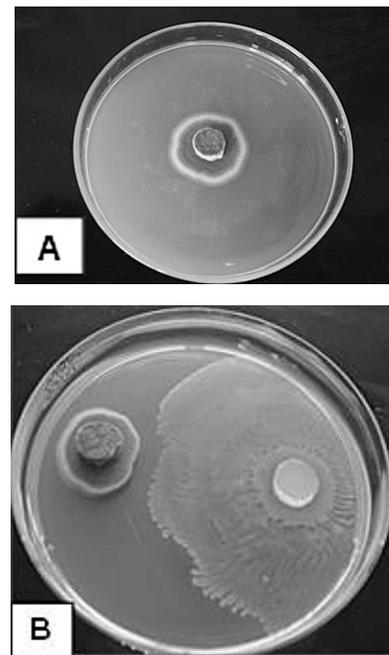


Figura 4. Confrontación de *Bacillus subtilis* vs *Penicillium* sp. A) Testigo de *Penicillium*. B) Prueba a las 120 horas de incubación.

La media estadística de las pruebas de *B. subtilis* vs *S. cepivorum* y *Penicillium* sp. es de 14,087 y 3,328 respectivamente. El análisis de varianza indicó que existen diferencias significativas ( $P= 0.00$ ) en el poder antagonista mostrado por *B. subtilis* frente a los dos patógenos.

La cepa de *B. subtilis* aislada y evaluada contra cada uno de los patógenos no mostró un buen control de las enfermedades. En especial en los análisis frente a los hongos, el desempeño no fue bueno. Con respecto a su comportamiento frente a la bacteria, aunque el valor de la inhibición es bajo, por las condiciones intrínsecas de la prueba, existe un potencial antagonista que se podría valorar con mayor detalle. Las variaciones en el potencial biocontrolador de una cepa específica están ligadas a las características genéticas y los factores ambientales presentes, así como a las interacciones con otros microorganismos.

Cuadro 5. Cálculo del PICR para *Bacillus subtilis* vs *Penicillium* sp.

Repetición	PICR <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Penicillium</i> sp.
1	0,30
2	4,09
3	0,00
4	6,29
5	2,91
<b>6</b>	<b>3,56</b>
<b>7</b>	<b>3,14</b>
<b>8</b>	<b>4,51</b>
<b>9</b>	<b>1,42</b>
<b>10</b>	<b>7,06</b>

Cuadro 6. Resultados del comportamiento de *Bacillus subtilis* frente a *Sclerotium cepivorum* y *Penicillium* sp. según escala de Ezziyani.

Biocontrolador	<i>Sclerotium cepivorum</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i>	Malo	Malo

### Potencial antagonico de *Trichoderma* sp.

El método de preservación de la cepa a  $-4^{\circ}$  C fue efectivo y no provocó daños en su integridad. Al cabo de 72 horas a  $28 \pm 2^{\circ}$  C, se observó crecimiento activo hasta cubrir por completo la placa en el transcurso de una semana.

### *Trichoderma* sp. vs *Pseudomonas marginalis*

En la prueba de antagonismo in vitro de *Trichoderma* sp. contra *P. marginalis* se presentó competencia por espacio y nutrientes por parte del biocontrolador; con una zona de inhibición progresiva y continuó creciendo hasta invadir la totalidad de la colonia de la bacteria. *Trichoderma* sp. evidenció una alta actividad antagonica con un valor de supresión del 32% (Cuadro 7, Figura 5). En los valores de PICR a las 120 horas de incubación, la prueba de *Trichoderma* vs *P. marginalis* presenta un comportamiento estadístico normal ( $P= 0,085$ ).

### *Trichoderma* sp. vs *Sclerotium cepivorum*

Las pruebas de crecimiento dual de *Trichoderma* sp. frente a *S. cepivorum* muestran una inhibición progresiva del patógeno a las 120 horas de incubación, lo que coincide con los mecanismos de antibiosis y parasitismo descritos por la literatura (Infante et al. 2009) (figura 6). Según la escala utilizada por Ezziyani et al. (2004a), *Trichoderma* sp. obtuvo un grado de 4, que lo califica con muy buen potencial

Cuadro 7. Cálculo del PICR para *Trichoderma* sp. vs *Pseudomonas marginalis*.

Repetición	PICR. <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>Pseudomonas marginalis</i>
1	29,55
2	24,47
3	50,92
4	27,12
5	37,88
6	27,19
7	26,53
8	34,71
9	30,43
10	35,15

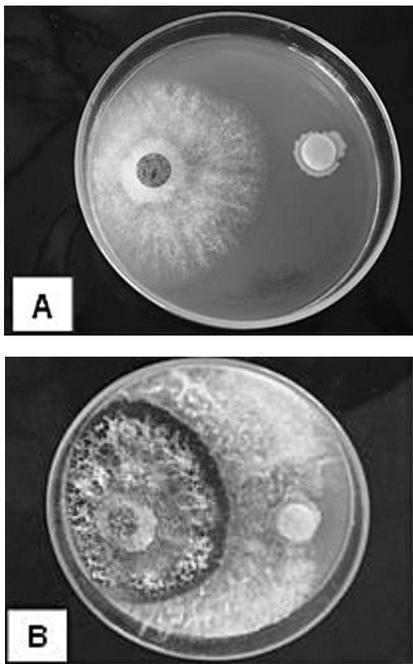


Figura 5. Confrontación de *Trichoderma* sp. vs *Pseudomonas marginalis*. A) A las 72 horas. B) A las 96 horas de incubación.

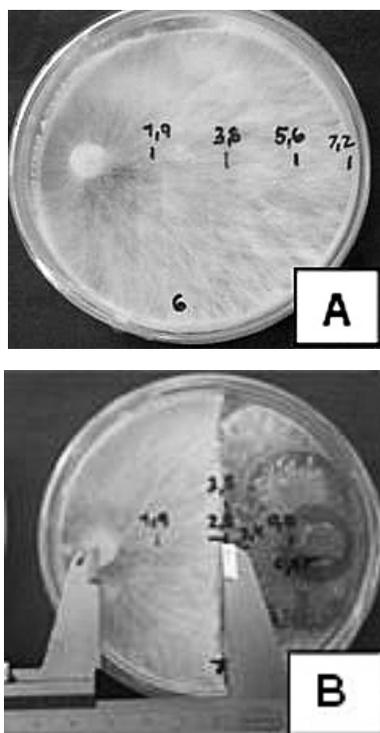


Figura 6. Confrontación de *Trichoderma* sp. vs *Sclerotium cepivorum*. A) Testigo de *Sclerotium cepivorum*. B) Cultivo dual de los dos hongos a las 120 horas.

biocontrolador. Lo anterior posiblemente es provocado por metabolitos difusibles y volátiles, así como por enzimas de los grupos celobiohidrolasas, endoglucanasas, glucosidasas, endoquitinasas, endoxilanasas y serinproteasas (Infante et al., 2009).

En el cuadro 8 se presentan los valores de PICR calculados a las 120 horas, donde se demuestra el potencial antagonístico del biocontrolador frente a *Sclerotium* sp. El análisis estadístico de este conjunto de datos mostró que tiene un comportamiento normal ( $P= 0,257$ ).

#### *Trichoderma* sp. vs *Penicillium* sp.

Las pruebas de antagonismo con *Trichoderma* sp. mostraron inhibición del crecimiento de *Penicillium* sp. El biocontrolador continuó creciendo hasta invadir totalmente al hongo patógeno al cabo de 120 horas (figura 7). De acuerdo con Harman (2006), este efecto puede estar relacionado con la producción de las enzimas quitinasa,  $\beta$ -glucanasa, celulasa y proteasa por parte de las cepas de *Trichoderma* sp.

En los datos de PICR del cultivo dual, la prueba de *Trichoderma* vs *Penicillium* presentó un comportamiento estadístico normal ( $P= 0,254$ ) (cuadro 9).

Según la escala utilizada por Ezziyyani et al. (2004a), el hongo *Trichoderma* sp. obtuvo un valor de 4, que lo califica como muy buen potencial biocontrolador ante *Penicillium* sp.

Cuadro 8. Cálculo del PICR para *Trichoderma* sp. vs *Sclerotium cepivorum*.

Repetición	PICR. <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Sclerotium cepivorum</i>
1	49,02
2	46,30
3	42,37
4	37,04
5	35,19
6	37,50
7	39,66
8	20,93
9	45,00
10	49,09

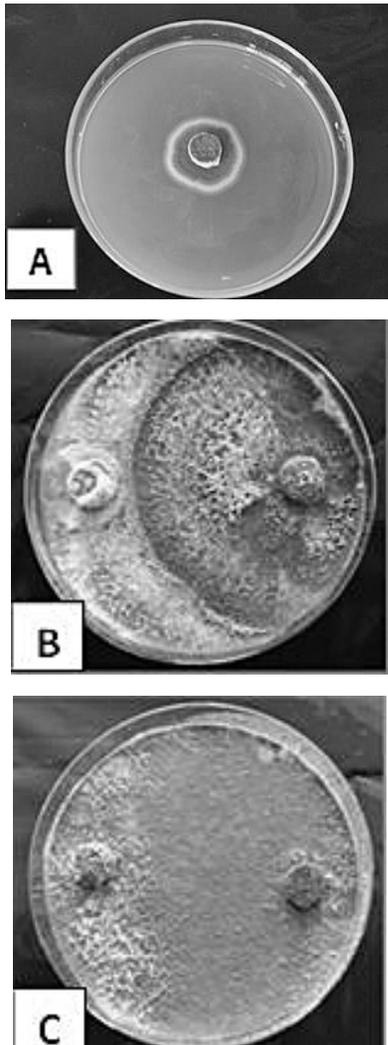


Figura 7. Confrontación de *Trichoderma* sp. vs *Penicillium* sp. A) Testigo de *Penicillium*. B) Prueba a las 96 horas. C) Prueba a las 120 horas.

En el cuadro 10 se presenta el desglose de resultados según el comportamiento de *Trichoderma* sp. frente a los agentes patógenos.

*Trichoderma* es un hongo que ataca, parasita y desplaza otros hongos que producen enfermedades en las plantas. Según el análisis de varianza de los porcentajes de inhibición del crecimiento radial como variable se determinó que no existían diferencias significativas entre los tratamientos ( $P= 0,107$ ).

La cepa de *Trichoderma* sp. utilizada para la prueba antagonista mostró un porcentaje de poder antibió-

Cuadro 9. Cálculo del PICR para *Trichoderma* sp. vs *Penicillium*.

Repetición	PICR <i>Trichoderma</i> sp. vs <i>Penicillium</i> sp
1	44,96
2	49,32
3	42,19
4	42,43
5	44,14
6	49,56
7	40,31
8	44,20
9	44,61
10	48,62

Cuadro 10. Resultados del comportamiento de *Trichoderma* sp. frente a *Sclerotium cepivorum* y *Penicillium* sp., según la escala de Ezziyani.

Biocontrolador	<i>Sclerotium cepivorum</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Trichoderma</i> sp.	Muy bueno	Muy bueno

tico in vitro muy alto, lo que lo ubica como un buen candidato para el biocontrol de estos patógenos.

El buen desempeño de *Trichoderma* ante los tres patógenos es un indicador de la alta actividad de los mecanismos de biocontrol disponibles por parte de la cepa. En las pruebas in vitro se obtuvo evidencia de los procesos de competencia, antibiosis y parasitismo que logran la inhibición y destrucción de los patógenos de interés. El grado en que los afecta también está en función de la estructura celular propia de esos patógenos, que permiten el accionar del biocontrolador:

Los resultados obtenidos indican que las cepas estudiadas de *Trichoderma* sp. pueden utilizarse como antagonistas frente a la pudrición por *Penicillium* del ajo, bacteriosis por *P. marginalis* y pudrición blanca por *S. cepivorum*. No así *Bacillus subtilis*, pues la cepa aislada no logró controlar los diferentes patógenos.

## Bibliografía

- Astorga, K. (2012). Evaluación *in vitro* del antagonismo de *Bacillus subtilis* estirpe silvestre y *Trichoderma* spp. frente a cepas aisladas e identificadas de *Sclerotium cepivorum*, *Pseudomonas marginalis* y *Penicillium* sp., patógenos de ajo (*Allium sativum* L.). Trabajo final de graduación Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Astorga, K, Zúñiga, C. & Rivera, W. (En prensa). Aislamiento e identificación de patógenos de ajo (*Allium sativum* L.).
- Bergey (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume II: The Proteobacteria*. Editorial James T. Staley, Don J. Brenner, Noel R. Krieg. 187 pp.
- Brenes Chacón, R., Guillén, A, Hilje, L., Rivera, W. & Zúñiga, C. (2013). *Cultivo del Ajo en Costa Rica*. Editorial UNED. 100 pp.
- Claus, D. & Berkeley, R.C. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, US: Williams y Wilkins.
- Correa, S., Mello, M., Ávila, Z., Minare, L., Pádua, R. & Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfii* SAAC. *Fitosanidad* 11(1): 3-9.
- Ezziyiani, M, Pérez, S.C., Requena, M.E., Rubio, L. & Candela, M.E. (2004a). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78. Consultado 20 nov. 2012. Obtenido desde: <http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>.
- Ezziyiani, M., Pérez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M. & Candela, M. (2004b). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45. Consultado 12 jul. 2012. Obtenido desde: [http://www.phycoelementa.es/Documents/05-Trichoderma\[1\].pdf](http://www.phycoelementa.es/Documents/05-Trichoderma[1].pdf).
- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194.
- Hernández, A., Bautista, S., Velázquez, M. & Hernández, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades pos cosecha en frutos. *Rev Mex Fitopatología* 25: 66-74.
- Infante, D., Martínez, B., Gonzáles, N. & Reyes, Y. (2009). *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi. *Revista de Protección Vegetal* 24(1). Consultado 25 sept. 2012. Obtenido desde: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002).
- Guillén, A., Chacón, R. & Zúñiga, C. (2011). Detección del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV) en ajo (*Allium sativum* L.) costarricense. *Tecnología en Marcha* 24 (4): 47-58.
- Izzeddin, N. & Medina, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus* 15(3). Consultado 28 oct. 2012. Obtenido desde: [http://www2.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-71382011000300005&lng=es&nrm=i](http://www2.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382011000300005&lng=es&nrm=i)so.
- Lisboa Minguzzi, M.A. (2003). Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinérea*) en *Vid vinifera*. Universidad de Talca-Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Agronomía (en línea). Consultado 27 jul. 2013. Obtenido desde: <http://www.factorhumus.com/wp-content/uploads/estudios/Control%20de%20plagas/univ.%20talca.%20subtilis%20pudric.%20gris.pdf>.
- Reyes, A., Ruiz, E., Yam, C. & Dzul, M. (2011). Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad* 15(2): 117-121. Consultado 31 ag. 2012. Obtenido desde: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209122297007>.
- Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J., Álvarez, V. & Álvarez, V. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad* 10: 187-191. Consultado 28 jul. 2012. Obtenido desde: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/2091/209116108001.pdf>.
- Rivera Méndez, W. (2011). Aislamiento y uso de cepas de *Trichoderma* spp. Para el control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* Berkeley, causante de la pudrición blanda de bulbos de ajo (*Allium sativum*), con miras a la transferencia tecnológica a productores de la zona de Llano Grande de Cartago. Tesis Magister en Gestión de recursos naturales y Tecnologías de producción. Instituto Tecnológico de costa Rica.
- Rivera, W., Zúñiga, C. & Brenes, J. (2012). Cultivo del ajo. Combate de la enfermedad del torbó (*Sclerotium cepivorum*). Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 20 pp.
- Rojas, V., Ulacio, D., Sanabria, M.E. & Jiménez, M.A. (2009). Efecto del calcio, *Trichoderma* y brócoli en la pared y área celular del ajo para el control de la pudrición blanca. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 43(2). Consultado 10 sept. 2012. Obtenido desde: <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/bcib/article/viewFile/3401/3287>.
- Santander, A. (2012). Uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de (*Colletotrichum gloeosporioides* Pens.) causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.) (en línea). Consultado 12 jul. 2012. Obtenido desde: <http://saber.ucv.ve/jspui/handle/123456789/3595>.
- Suárez, C., Fernández, R., Valero, N., Gámez, R. & Páez, A. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(3): 35-43.