

## IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DEL MARCHITAMIENTO EN *Caesalpinia spinosa* “tara” Y EL EFECTO ANTAGÓNICO DE AISLADOS DE *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp.

### IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF THE WILTING OF *Caesalpinia spinosa* "tara" AND THE ANTAGONIC EFFECT OF *Bacillus* spp. and *Trichoderma* sp. ISOLATES

Dayvi Pérez<sup>1</sup> y Paula García-Godos<sup>2</sup>

#### Resumen

La enfermedad denominada marchitamiento vascular es un problema que produce pérdidas en la producción de los cultivos de *Caesalpinia spinosa* “tara”. El objetivo de la investigación fue identificar el agente causal del marchitamiento y determinar el efecto antagónico de cepas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. Fueron muestreadas plantas de tara con síntomas de la enfermedad y desde el suelo. Se aislaron 27 cepas de hongos filamentosos que fueron identificados mediante el método de Pitt basado en las claves taxonómicas. El efecto antagónico se realizó mediante pareamientos *in vitro* en medio Agar Papa Dextrosa, enfrentando a cepas de *Fusarium* spp. con dos cepas de *Trichoderma* sp. y 18 de *Bacillus* spp. como potenciales antagonistas. Los resultados constataron que las cepas de *Fusarium* spp., son las causantes del marchitamiento vascular progresivo en tara. La evaluación del antagonismo *in vitro* mediante contacto directo, indicó que las cepas de *Bacillus* spp. TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 y TBa 18 tuvieron un mayor efecto alcanzando entre 88.9% y 93.3% de inhibición de *Fusarium*. Las pruebas de antagonismo en cultivos duales, mostraron que las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 11 y TBa 18 alcanzaron los mayores niveles de inhibición del patógeno, fluctuando entre 92.2% y 90.0%; entretanto, las cepas de *Trichoderma* sp. y *T. viridae*, obtuvieron 77.8% y 74.4% de inhibición del patógeno, respectivamente. El grado de inhibición *in vitro* alcanzado por las cepas de *Bacillus* spp., permite considerarlas como potenciales agentes de control biológico contra *Fusarium* spp. en cultivos de tara.

**Palabras clave:** marchitamiento vascular, efecto antagónico, *Bacillus* spp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* spp.

#### Abstract

The disease called vascular wilt is a problem that causes production losses in the *Caesalpinia spinosa* "tara" crops. The objective of the research was to identify the causal wilting agent and to determine the antagonistic effect of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* sp. strains. Tara plants with symptoms of the disease and from the soil were sampled. We isolated 27 strains of filamentous fungi that were identified by the Pitt method based on taxonomic keys. The antagonistic effect was achieved through *in vitro* pairing in Papa Dextrose Agar medium, facing strains of *Fusarium* spp. with two strains of *Trichoderma* sp. and 18 of *Bacillus* spp. as potential antagonists. The results showed that the strains of *Fusarium* spp. are the cause of the progressive vascular wilting in tara. The evaluation of *in vitro* antagonism by direct contact, indicated that strains of *Bacillus* spp. TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 and TBa 18 had a greater effect reaching between 88.9% and 93.3% inhibition of *Fusarium*. In the tests of antagonism in dual cultures, they showed that the strains TBa 4, TBa 6, TBa 11 and TBa 18 reached the highest levels of inhibition of the pathogen, fluctuating between 92.2% and 90.0%; meanwhile, strains of *Trichoderma* sp. and *T. viridae* they obtained 77.8% and 74.4% inhibition of the pathogen, respectively. The degree of *in vitro* inhibition achieved by *Bacillus* spp. strains makes it possible to consider them as potential biological control agents against *Fusarium* spp. in tara cultures.

**Key words:** vascular wilt, antagonistic effect, *Bacillus* spp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* spp.

#### Introducción

*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze ("tara") es una especie forestal que viene adquiriendo una

demanda creciente por sus múltiples usos, ya sea medicinal, alimenticio e industrial; productora de taninos y de la que se obtienen tintes con fines

comerciales (De La Cruz, 2004). El avance en las investigaciones sobre el comportamiento de la dinámica biológica de plagas y su interacción con el ambiente han sido determinantes para el desarrollo de métodos de control que enfatizan al manejo sostenible del predio agrícola a través del manejo integrado de las plagas. Las plagas presentes en *C. spinosa* aún no son importantes, pero con el incremento progresivo de las áreas de cultivo de esta especie se determinará un entorno favorable para que la plaga sea más nociva, por tanto, es relevante conocer las características de estas plagas para prevenir y contrarrestar los daños al cultivo, siendo fundamental una diagnosis correcta de las enfermedades (Ogata & Zúñiga, 2008).

Una de las enfermedades que está diseminándose es el marchitamiento vascular progresivo en las plantas de tara, siendo la principal enfermedad en vivero y con menor incidencia en plantaciones. En vivero, la incidencia y severidad puede ser alta, dependiendo del origen y calidad de sustrato utilizado y la humedad del suelo. En plantación, las plantas infectadas pueden llegar a marchitarse completamente a los dos años. El agente causal del marchitamiento de la tara, desde las raíces afectadas, podrían ser los hongos de los géneros *Fusarium* y *Verticillium* (Coca, 2009).

El objetivo de la investigación fue identificar el patógeno asociado al marchitamiento progresivo (“seca seca”) de la planta de tara (*C. spinosa*) y evaluar el efecto antagónico de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. contra el hongo patógeno causante de la enfermedad.

## Materiales y métodos

### Muestras de plantas

Las muestras de plantas fueron obtenidas en el Distrito de Huamanguilla, Provincia de Huanta, Región de Ayacucho. Fueron recolectadas partes aéreas y radiculares de 15 plantas de tara con síntomas de marchitamiento desde diferentes campos de cultivo. Las muestras consistentes en hojas y tallos de hasta 10 cm se recolectaron con la ayuda de una tijera desinfectada, y las raíces se recolectaron con la ayuda de un pico esterilizado desenterrando las plantas completamente y evitando dañar la raíz. Además, fueron colectados plantines con síntomas de marchitamiento del vivero con baja intensidad de luz solar y se tomaron en su totalidad. Las muestras colectadas se colocaron en bolsas de polietileno individuales, herméticamente selladas y rotuladas.

### Muestras de suelo

Las muestras se recolectaron de las partes circundantes de la zona radicular de las plantas de tara con síntomas, se tomaron aproximadamente 50 g de suelo, los que se rotularon y se transportaron en bolsas de polietileno color negro.

## Aislamiento de fitopatógenos

### Aislamientos desde plantas

Fueron realizados a partir raíces, tallos y hojas. Las muestras de seis meses de edad fueron desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio (5%) y alcohol en una placa de Petri por 20 min, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, para luego ser sembradas en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) en oscuridad, seguido de incubación por 5 días a 25 °C.

### Aislamientos desde suelo

Se agregó 10 g de suelo en 90 ml de agua peptonada al 0.1%, luego homogenizamos y se realizaron diluciones sucesivas hasta  $10^{-3}$  para sembrar por 1 ml de la última dilución en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (APD), e incubándose a 25 °C por 5 días. Luego del tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias con características macroscópicas distintas y se repicaron en tubos conteniendo medio APD y se almacenaron a 4 °C, lo que conformaron el cepario fúngico (French & Herbert, 1980).

## Identificación de fitopatógenos

### a. Método de Pitt

Del cepario fúngico se sembró por puntura en tres puntos equidistantes para cada placa de Petri conteniendo los medios Malta-Glucosa, Czapek-Levadura y Czapek-Glicerol, para luego ser incubadas a 25 °C durante 7 días. Además, se sembraron dos placas de Petri con medio Czapek, que se incubaron a 5 °C y 37 °C, durante 7 días (Fox, 1993; Pitt & Hocking, 1997).

### b. Técnica de Microcultivo

Se realizó usando las claves taxonómicas internacionales descritas por Carrillo (2003) de acuerdo con los criterios de morfología y color de colonia, picnidios, arreglo de las células conidiogénicas, tipo de conidiogénesis y el largo y ancho de conidios.

### Pruebas de patogenicidad

Los ensayos de patogenicidad se basaron en lo descrito por Valencia-Botín (2002). Se utilizaron las cepas de *Fusarium* spp. M1R1 y M1R2, aisladas de plantas de tara en el presente estudio. Para ambas cepas fueron preparadas suspensiones de esporas, obtenidas a partir de las colonias de estos hongos crecidas en tubos de ensayo, en medio APD, incubadas por 10 días a 25 °C. La colecta de esporas se realizó con agua peptonada al 0.1%. El inóculo se preparó a partir de 5 ml de la suspensión de esporas, que fueron colocadas en un matraz con 150 ml con Caldo Papa Dextrosa (CPD), seguido de incubación a 25 °C, agitado a 100 rpm y aireación constante por 5 días. La suspensión final se ajustó a una concentración de  $10^4$  esporas/ml.

Fueron inoculadas plantas de tara de dos meses, conservadas en el vivero del INIA – Ayacucho. Las plantas se trasplantaron a macetas de plástico con suelo esterilizado en autoclave y se mantuvieron en cuarentena por cuatro semanas en un vivero cerrado, garantizando condiciones de humedad del 80%,

temperatura de 16 a 20 °C y con riego cada 72 horas. Para el tratamiento se utilizaron diez plantas por cepa de *Fusarium*, las que fueron asperjadas con 50 ml una suspensión de esporas por cepa de *Fusarium*, ocasionando previamente lesión en la epidermis, corteza, endodermis y parte de la médula de la raíz y el tallo por un tiempo aproximado de 5 minutos, junto con aplicar el inóculo de *Fusarium* directamente al suelo circundante a los pelos radicales de la planta (Monzón, 2000). A las plantas control se asperjó agua sin inóculo del patógeno. Las plantas después de la inoculación se mantuvieron en condiciones de humedad del 80%, temperatura de 16 a 20 °C y con riego cada 72 horas. Las evaluaciones de las plantas se realizaron cada 24 horas por 30 días y las plantas que mostraron los signos y síntomas del marchitamiento progresivo se llevaron al laboratorio para el re-aislamiento del patógeno inicialmente inoculado (French & Herbert, 1980).

#### Aislamiento de *Bacillus* spp. de muestras de suelo

Las cepas de *Bacillus* spp. se obtuvieron de 50 g de suelo rizósferico de las plantas de tara. Del suelo inicial se realizaron diluciones sucesivas hasta 10<sup>-3</sup> en agua peptonada al 0.1%, se tomó 1 ml de la última dilución y se sembró en placas de Petri con medio de cultivo Agar Nutritivo. Las placas se mantuvieron a 37 °C por 24 horas hasta observar el desarrollo de las colonias con la morfología característica del género (forma estrellada o circular, borde entero, elevación convexa, superficie rugosa y color blanquecino). Luego, se realizó la caracterización microscópica de las colonias mediante tinción Gram, las que debían corresponder a bacilos en cadena y con esporas, procediéndose a realizar el cepario.

#### Evaluación del efecto antagonico de cepas de *Bacillus* spp.

##### **Por contacto directo**

Las cepas de *Fusarium* spp. (M1R1 y M1R2) se cultivaron por puntura en el centro de una placa de Petri con medio APD y se incubó por 10 días a 25 °C hasta cubrir toda la placa con el micelio del hongo, estas placas sirvieron para obtener discos de micelio del patógeno con un sacabocado. Se prepararon cultivos en suspensión de cada cepa de *Bacillus* en caldo nutritivo, los que se incubaron durante 48 h, se colorearon las bacterias con azul de lactofenol, para luego ajustar la concentración a 10<sup>8</sup> bacterias /ml aproximadamente, mediante cámara de Neubauer. Se sembró por agotamiento con un hisopo 0.25 ml de la suspensión bacteriana en una placa con medio APD. Con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro se retiró el micelio de las cepas de *Fusarium* y se colocó el disco del micelio en la superficie del medio de cultivo en contacto directo con el centro de la placa de Petri sembrada previamente con *Bacillus* spp. Se incubaron a 25 °C por 10 días evaluando cada 24 h el crecimiento del diámetro del hongo. Para cada cepa antagonica se realizó la prueba por triplicado (Mitidieri, 1988).

##### **Por cultivos duales**

Se colocó en un extremo de la placa de Petri un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro del hongo patógeno tomado con un sacabocado. En la misma placa a 2.5 cm de separación se sembró frente a frente el antagonista bacteriano mediante estrías. Las placas se incubaron a 25°C durante 10 días y se evaluó cada 24 h el crecimiento del diámetro del hongo (Acosta *et al.*, 2007).

Para el control de ambas pruebas, se hizo crecer en una placa con medio APD el hongo patógeno en las mismas condiciones pero sin el antagonista, durante 10 días hasta que la colonia del patógeno alcanzó el borde opuesto de la placa. Los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron la tasa de crecimiento micelial (cm/día) y el porcentaje de inhibición. La tasa de crecimiento micelial (TC) se determinó considerando el diámetro de crecimiento de la colonia fúngica calculando su magnitud mediante la expresión sugerida (Benítez *et al.*, 2004):

$$TC = (Cf - Ci) / (Tf - Ti),$$

Donde:

Cf y Ci corresponden al diámetro final e inicial del patógeno, respectivamente, y

Tf y Ti, al diámetro final e inicial en el testigo, respectivamente.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM en %) se calculó empleando la fórmula de Acosta *et al.* (2007):

$$ICM = ((R1 - R2) / R1) * 100,$$

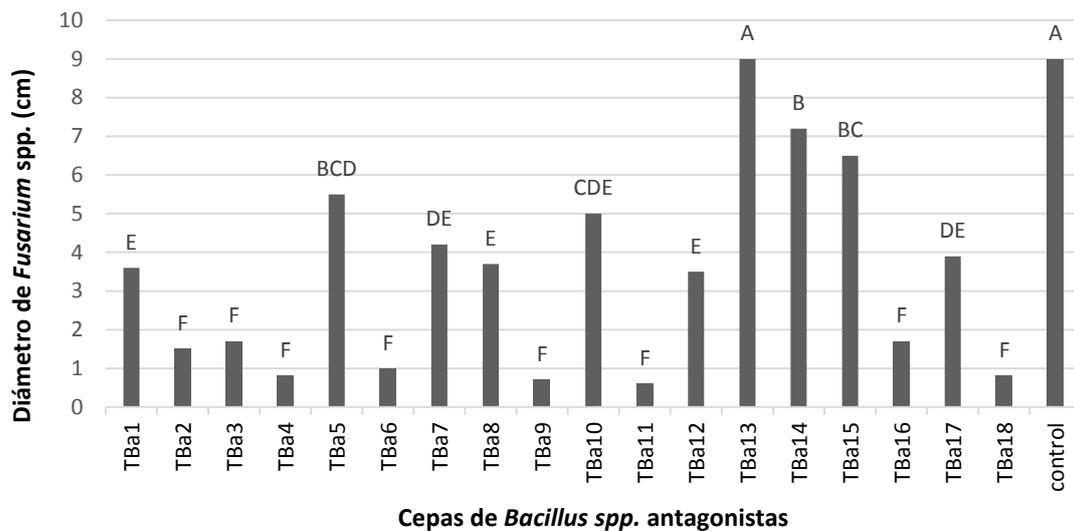
Donde:

R1 correspondió al crecimiento radial del testigo y R2 al crecimiento radial del patógeno en cada tratamiento.

Los datos obtenidos en las pruebas de antagonismo se evaluaron mediante el Análisis de Varianza, y las comparaciones múltiples con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05%.

#### **Resultados y discusión**

Se aislaron cepas de *Fusarium* spp. de diez árboles de tara con marchitamiento, y en medio de cultivo todas presentaron el mismo tipo morfológico de la colonia. Fueron seleccionadas dos cepas de *Fusarium* spp. (M1R1 y M1R2) para las pruebas de patogenicidad en plantas de tara (Figura 1), las que causaron los síntomas específicos del marchitamiento vascular progresivo, según lo descrito por Valencia-Botín (2002), confirmando que especies de *Fusarium* como el agente causal de la enfermedad en el cultivo de tara en el Distrito de Huamanguilla. Según Coca (2009), un causante de marchitamiento vascular también podría corresponder a *Verticillium* spp., sin embargo, las pruebas de patogenicidad no mostraron sintomatología similar con este género fungoso. En el Perú es frecuente

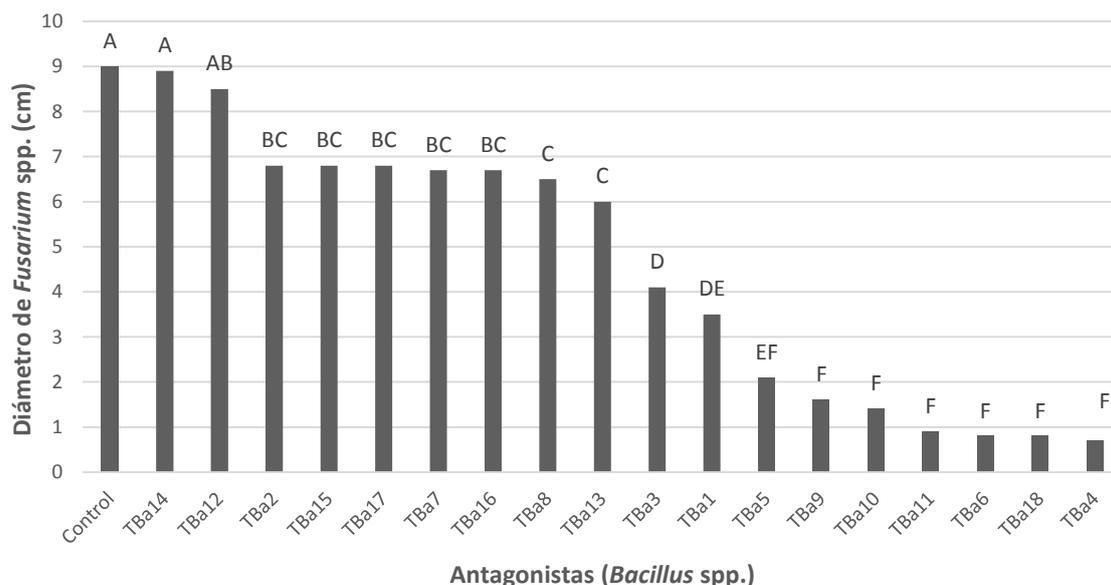


**Figura 1.** Efecto de cepas de *Bacillus* spp. (antagonistas) en el diámetro de colonia de *Fusarium* spp. en ensayo de antagonismo por contacto directo, después de diez días de incubación.

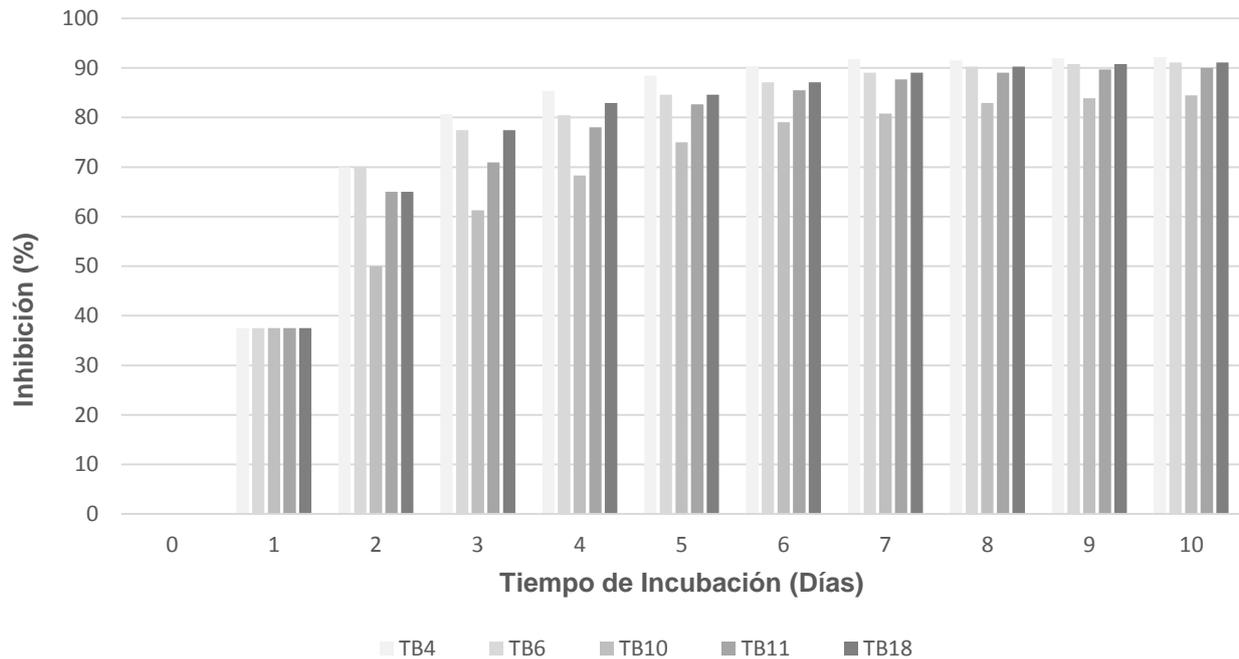
la infección del maíz por *Fusarium* spp., patógeno que se diseminada a partir de la semilla, lo que podría explicar la infestación de las plantas de tara por *Fusarium* spp. (Injante & Joyo, 2010), considerándose que en el distrito de Huamanguilla las plantaciones de tara se realizan en cultivos mixtos con plantas de maíz.

Las cepas más eficaces de *Bacillus* spp. en la prueba de antagonismo por contacto directo frente a *Fusarium* spp. (Figura 1), correspondieron a las cepas TBa 4, 11, 9, 18, 6, 2, 16 y 3, evidenciando variaciones en el efecto inhibitorio de cepas de *Bacillus* spp. sobre el crecimiento micelial del patógeno. Las variaciones en

el potencial biocontrolador *in vitro* de *Bacillus* spp. están asociadas generalmente a las características genéticas de la especie (Astorga *et al.*, 2013; Calvo & Zuñiga, 2010), reportándose una mayor actividad antagonica, en diferentes condiciones, a las especies *B. brevis* y *B. subtilis* (Layton *et al.*, 2011). Estos datos son similares a los reportados por Corrales *et al.*, (2012), donde obtuvieron tasas mínimas de crecimiento de hasta 0.08 cm/día de *Fusarium* frente a *Bacillus* en plantas de Tomillo (*Thymus vulgaris*). Constanza *et al.* (2011) en pruebas antagonicas de *Fusarium* frente a



**Figura 2.** Efecto de cepas de *Bacillus* spp. (antagonistas) en el diámetro de colonia de *Fusarium* sp. en ensayo de antagonismo por cultivos duales, después de diez días de incubación.



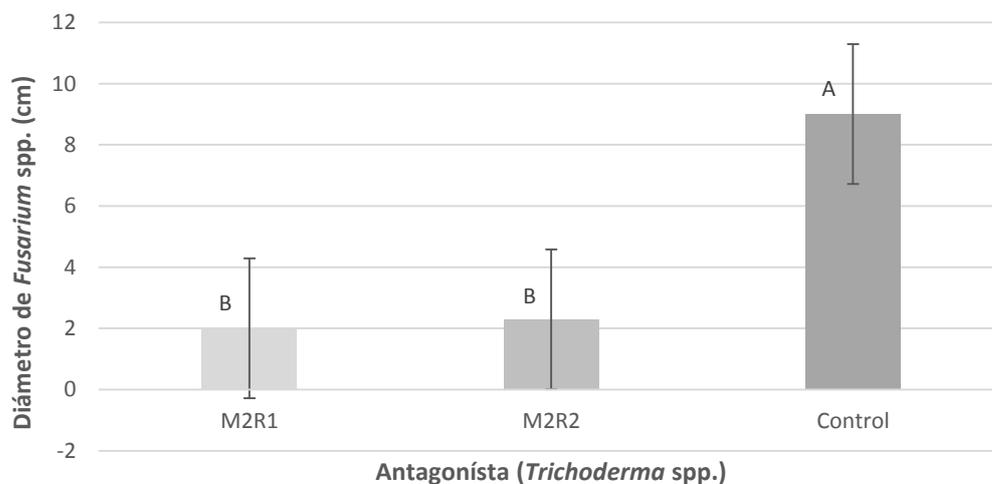
**Figura 3.** Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* spp. frente a las cepas más eficaces de *Bacillus* spp. en prueba antagonista por cultivos duales.

*Bacillus* en *Rosmarinus officinalis* registraron tasas mínimas de crecimiento de hasta 0.17 cm/día.

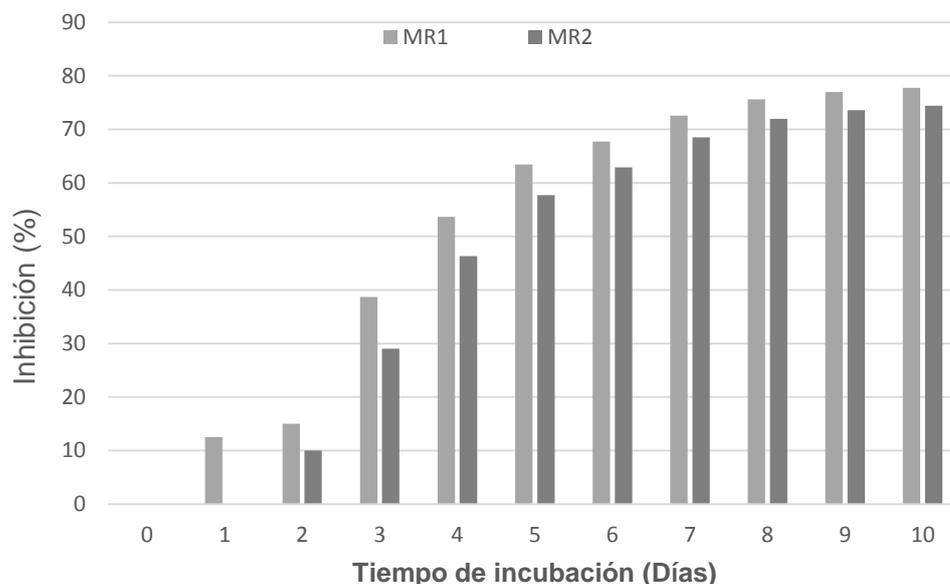
El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las cepas TBa 4, TBa 6, TBa 9, TBa 11 y TBa 18 reportando valores de 91.1%; 88.9%; 92.2%; 93.3% y 91.1% respectivamente, demostrando una alta eficacia en la inhibición de *Fusarium* spp. en condiciones in vitro. Estos datos son similares a los reportados por Constanza *et al.*, (2011), que señala entre 70 a 100% de

inhibición en sus cepas más eficaces. Para poder demostrar la efectividad de la capacidad antagonista de *Bacillus* spp. se realizó una segunda prueba antagonista utilizando un método distinto, la de enfrentamiento por cultivos duales.

Referente al efecto inhibitorio que ejerció *Bacillus* spp. sobre el crecimiento del patógeno; las cepas de *Bacillus* TBa 4, 18, 6, 11, 10, 9 y 5 resultaron con



**Figura 4.** Efecto de cepas de *Trichoderma* en el diámetro de colonia de *Fusarium* spp. en ensayo de antagonismo por cultivos duales, después de diez días de incubación.



**Figura 5.** Efecto de cepas de *Trichoderma* sp. en la inhibición del diámetro de colonia de *Fusarium* spp. en ensayo de antagonismo por cultivos duales, durante diez días de incubación.

mayor afectividad antagónica (Figura 2) con respecto al resto de las cepas.

La eficacia del antagonismo de las cepas de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* spp. se evidencia mediante la inhibición del crecimiento obteniendo un 92.2% para la cepa TBa4.

Comparando ambos métodos de antagonismo empleados en el estudio, contacto directo y cultivos duales (Figura 3), las cepas de *Bacillus* spp. TBa 4, TBa 6, TBa 11 y TBa 18, mantuvieron el mayor efecto antagónico, evidenciándose su capacidad para producir metabolitos fungitóxicos y su rapidez de crecimiento para competir por espacio y nutrientes, debido al alto nivel de inhibición y crecimiento de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*. Las cepas TBa 9 y TBa 10 tuvieron una buena capacidad antagónica en una de las pruebas, no manteniendo la eficacia en la otra prueba.

Por otro lado, también se demostró la eficacia de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Fusarium* spp. (Figura 4). Las dos cepas de *Trichoderma* M2R1 y M2R2 ensayadas, inhibieron el crecimiento de la colonia del patógeno a un diámetro de 2.0 y 2.3 cm, respectivamente, equivalente a niveles de inhibición de 77.7% para M2R1 y 74.4% para M2R2 (Figura 5), con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las cepas de *Trichoderma* y el tratamiento control.

Respecto a la actividad inhibitoria de especies de *Trichoderma*, en investigaciones como las de Bonilla (1990), empleando cepas de *T. harzianun*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* sobre *F. subglutinans* alcanzaron rangos de inhibición desde 10 a 85%, en donde *T. harzianun*, *T. koningii* y *T. pseudokoningii* particularmente alcanzan de 48 a 85%, y *T. viride* entre 10 y 48%, además de especificar que aislamientos de *T. harzianun* alcanzaron valores hasta de 84%. Sin

embargo, en las investigaciones de Hernández *et al.* (2006) reportan la inhibición para *F. subglutinans*, donde los mayores niveles de inhibición fueron por *T. atroviride* y *T. harzianun* con 48% para ambos antagonistas.

La capacidad antagonista de las especies de *Trichoderma* está reconocida ampliamente, siendo buenos competidores por el sustrato y con una actividad metabólica particular que los capacita como eficacia hiperparásitos de las estructuras fúngicas de los hongos (Ghisalverti & Savisithaparam, 1991; Huang *et al.*, 1996). En esta investigación, se verificó una mayor eficacia antagónica frente a *Fusarium* spp., de las cepas de *Bacillus* spp. sobre las de *Trichoderma* spp.

### Conclusiones

El agente patógeno causante de la enfermedad del marchitamiento vascular progresivo (seca seca) en plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) es *Fusarium* spp. Cepas nativas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. demostraron en condiciones *in vitro* capacidad antagónica frente a *Fusarium* spp. siendo las cepas de *Bacillus* spp. los que presentan mayor efecto de inhibitorio en el crecimiento micelial del patógeno.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento para la ejecución de la investigación a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

**Literatura citada**

- Acosta T., Avellaneda A., Cuervo J. & Sánchez L. 2007. Evaluación de microbiota de tomillo (*Thymus vulgaris*) como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos. Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales. Universidad Nacional de Colombia.
- Astorga K., Meneses K., Zúñiga C., Brenes J. & Rivera W. 2013. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha, 27(2): 82-91.
- Benítez T., Rincón A., Limón M. & Codón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249-260.
- Bonilla M. 1990. Utilización de especies de *Trichoderma* no controles biológico de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *Subglutinans* Wr. & Rg. En: Abacaxi E. *Ananas comosus* (L.) Merrill. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Federal da Bahía. Brasil.
- Calvo P. & Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). Ecol. apl., 9(1): 31-39.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina.
- Coca M. 2009. Enfermedades de la tara (*Caesalpinia spinosa*). Universidad Mayor de San Simón (UMSS). Departamento de Fitotecnia y Producción Vegetal. Laboratorio de Fitopatología. Serie de Publicaciones Fitopatológicas, 3(2): 1-5. Cochabamba, Bolivia.
- Constanza L., Sánchez L., Cuervo J., Bautista D., González L. & Guevara M. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* sp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Colombia.
- Corrales L., Sánchez L., Cuervo J., Joya A. & Márquez K. 2012. Efecto biocontrolador de *Bacillus* sp. frente a *Fusarium* sp. bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). NOVA, 10(17): 64-82.
- De La Cruz P. 2004. Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. Revista del Instituto de Investigación FIGMMG, 7(14): 64-73.
- Fox F. 1993. Principles of diagnostic techniques in plant pathology. Wallingford: CAB International.
- French E. & Herbert T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Libros y Materiales Educativos N 43. San José, Costa Rica. IICA.
- Ghisalverti E. & Sivasithamparam K. 1991. Antifungal Antibiotics Produced by *Trichoderma* sp. Soil Biol. Biochem., 23: 1010-1020.
- Hernández A., Sierra A. & Carr A. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) Fitosanidad, 10 (2): 105-108.
- Huang Q., Tezuka Y., Kikuchi T., Nishi A., Tubaki K. & Tanaka K. 1996. Studies on Metabolites of *Mycoparasitic fungi*, Metabolites of *Trichoderma Koningii*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 44(3): 590-593.
- Injante P. & Joyo G. 2010. Guía Técnica Manejo integrado de maíz amarillo duro. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
- Layton C., Maldonado E., Monroy L., Constanza L. & Consuelo L. 2011. *Bacillus* sp.; Perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Colombia.
- Mitidieri L. 1988. Control biológico de hongos de suelo con *Trichoderma in vitro*. IDIA, 44: 45-49.
- Monzón J. 2000. Infecciones causada por el género *Fusarium* sp. Tercera Edición. Centro de Investigaciones Microbiológicas. España.
- Ogata K. & Zúñiga D. 2008. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huánuco. Zonas Áridas, 12(1): 191-208.
- Pitt J. & Hocking A. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2° ed. Blackie Academic & Professional, London, New York.
- Valencia-Botín A. 2002. Etiología de la enfermedad "ojo de pescado" en pitahaya (*Hylocereus undatus* H). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho - Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho - Perú. Correo electrónico: [paulagga30@hotmail.com](mailto:paulagga30@hotmail.com).