

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD
INBio

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DEL GÉNERO *Hypocrea* CONTRA 2
HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA (*Fusarium sp* y
Mycena citricolor)

Informe del Proyecto de Graduación para optar por el grado de Bachiller en
Ingeniería en Biotecnología

Andrea Porras Alfaro

Cartago , 2000

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DEL GÉNERO *Hypocrea* CONTRA 2
HONGOS FITOPATÓGENOS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA (*Fusarium sp* y
Mycena citricolor)

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica
por Andrea Porras Alfaro como requisito parcial para optar por el título de bachiller en
Ingeniería en Biotecnología

Miembros del Tribunal

Dra. Virginia Montero
Profesora guía

Dra. Rosaura Romero
Lectora

M.Sc. Johnny Peraza
Lector

RESUMEN

El género *Hypocrea sp* se ha caracterizado en los últimos años por tener gran importancia como antagonista de diferentes hongos fitopatógenos. Los hongos *Mycena citricolor* y *Fusarium sp* son patógenos de plantas que causan múltiples pérdidas a nivel nacional y mundial.

Se realizó una evaluación preliminar de la actividad de la colección del género *Hypocrea sp* con que cuenta el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) contra los fitopatógenos mencionados. La evaluación se realizó para tres variables: confrontación directa hongo con hongo, metabolitos no volátiles y metabolitos volátiles.

Se demostró actividad contra ambos fitopatógenos en los diferentes ensayos. En la evaluación de hongo contra hongo, alrededor de un 70% de la colección presenta un nivel alto de antagonismo para ambos. Así mismo se observó la inhibición del crecimiento por la producción de metabolitos volátiles y no volátiles. Los hongos con los códigos 247, 185, 824 y 820 presentaron la mayor actividad en general para todas las pruebas realizadas.

Palabras clave: *Hypocrea sp*, *Trichoderma sp*, *Fusarium sp*, *Mycena citricolor*, Hongo, control biológico.

ABSTRACT

The genus *Hypocrea* has had much importance, because this is an antagonism to different phytopathogen fungi. The fungi *Mycena citricolor* and *Fusarium sp* are plants pathogen fungi and cause many losses to national and international level.

The objective was to determine the antagonistic activity in the *Hypocrea* collection (23 strains) of the Instituto Nacional de Biodiversidad against *M. citricolor* and *Fusarium sp*. The evaluation included 3 variables: fungi against fungi, non volatile metabolites and volatile metabolites.

In this research, there was activity against the plants pathogens in the different assays found. In the evaluation fungi against fungi, about 70% showed high antagonism level to pathogens. For volatile and no volatile metabolites assays the growth inhibition was observed. The samples with the numbers 247, 185, 824 and 820 showed highest activity level in the collection for all assays.

Key words: *Hypocrea sp*, *Trichoderma sp*, *Fusarium sp*, *Mycena citricolor*, Fungus, Biological Control

DEDICATORIA

A quienes me dieron la vida

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer especialmente al personal del INBio por todo su apoyo y colaboración en el desarrollo de esta investigación.

Al grupo de docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, ya que gracias a su esfuerzo y dedicación fue posible concluir con éxito el inicio de esta nueva carrera.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Importancia del metabolismo secundario.....	6
Orden Hypocreales.....	8
<i>Trichoderma</i> y su papel en el control biológico.....	10
<i>Trichoderma</i> como recurso de enzimas industriales.....	14
<i>Mycena citricolor</i>	16
<i>Fusarium sp.</i>	18
METODOLOGÍA	22
I PARTE.Activación y evaluación de la viabilidad de los hongos del género <i>Hypocrea</i> de la micoteca del INBio	23
II PARTE Hongos fitopatógenos a evaluar.....	23
III PARTE Evaluación del género <i>Hypocrea</i> mediante un sistema comparativo en platos.	24
IV PARTE Evaluación de metabolitos no volátiles producidos por <i>Hypocrea</i> en medio líquido.	26
V PARTE.Evaluación del efecto de la producción de metabolitos volátiles por <i>Hypocrea</i> sobre <i>M. citricolor</i>	27
VI PARTE Análisis de resultados.....	28
RESULTADOS.....	29
Evaluación de <i>Hypocrea sp</i> mediante un sistema comparativo en platos.....	30
Evaluación de los metabolitos no volátiles producidos por <i>Hypocrea sp</i> en medio líquido	37
Evaluación del efecto de la producción de metabolitos volátiles por <i>Hypocrea sp</i> sobre <i>M. citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i>	42
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXO I Información general sobre la colección del género <i>Hypocrea</i> utilizada en este trabajo.....	72
ANEXO II. Análisis estadístico de los resultados obtenidos de la evaluación de varias cepas del género <i>Hypocrea</i> mediante el sistema comparativo en platos para <i>M. citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i>	75
ANEXO III. Análisis estadístico del efecto de los metabolitos no volátiles producidos por <i>Hypocrea sp.</i> sobre los hongos fitopatógenos en medio líquido.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis general de la colección de <i>Hypocrea</i> utilizando la escala planteada por Bell <i>et al</i> (1982)	31
Tabla 2. Efecto de <i>Hypocrea sp</i> en el crecimiento de <i>Mycena citricolor</i>	33
Tabla 3. Efecto de <i>Hypocrea sp.</i> en el crecimiento de <i>Fusarium sp</i>	35
Tabla 4. Efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> en el crecimiento de	39
<i>Mycena citricolor</i>	39
Tabla 5. Efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> en el crecimiento de	40
<i>Fusarium sp</i>	40
Tabla 6. Efecto de los metabolitos volátiles sobre <i>Mycena citricolor</i>	43
Tabla 7. Efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento de <i>Fusarium sp</i> .46	
Tabla 8. Radio de crecimiento de <i>Mycena citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i> y análisis utilizando la escala planteaba por Bell, <i>et al.</i> (1982)	76
Tabla 9. Análisis de varianza y prueba de Tukey para el radio de crecimiento (cm) de <i>Mycena citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i> (Datos al sexto día)	77
Tabla 10. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp</i> producidos en el medio Czapeck - Dox, extracción por microfiltración para <i>M. citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i> (Datos al día 6 de montado el ensayo)	80
Tabla 11. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> producidos en el medio Czapeck - Dox, extracción por autoclavado para <i>Mycena citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i> (Datos al día 6 de montado el ensayo)	82
Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> producidos en papa dextrosa agar, extracción por microfiltrado para <i>Mycena citricolor</i> (Datos al día 6 de montado el ensayo)	83
Tabla 13. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> producidos en el medio PDA, extracción por microfiltrado para <i>Fusarium sp.</i> (Datos al día 6 de montado el ensayo).....	84

[Continua...](#)

Tabla 14. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> producidos en el medio PDA, extracción por autoclavado para <i>Mycena citricolor</i> (Datos al día 6 de montado el ensayo).....	85
Tabla 15. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> medio PDA, extracción por autoclavado para <i>Fusarium sp.</i> (Datos al día 6 de montado el ensayo).....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ataque de <i>Trichoderma sp.</i> sobre las hifas del hospedero	13
Figura 2. Nivel de antagonismo presentado por <i>Hypocrea sp.</i> sobre los hongos fitopatógenos, sistema comparativo en platos, escala Bell <i>et al</i> (1982).	32
Figura 3. Efecto antagónico de <i>Hypocrea spp.</i> sobre <i>Mycena citricolor</i>	34
Figura 4. Efecto antagónico de <i>Hypocrea spp.</i> sobre <i>Fusarium sp.</i>	36
Figura 5. Inhibición causada por los extractos de <i>Hypocrea sp.</i> sobre <i>Mycena citricolor</i> y <i>Fusarium sp.</i>	41
Figura 6. Efecto de los metabolitos volátiles en el crecimiento de <i>Mycena citricolor</i>	44
Figura 7. Inhibición del crecimiento de <i>Mycena citricolor</i> por metabolitos volátiles de <i>Hypocrea sp.</i>	45
Figura 8. Efecto de los metabolitos volátiles en el crecimiento de <i>Fusarium sp.</i>	47
Figura 9. Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium sp.</i> por metabolitos volátiles de <i>Hypocrea sp.</i>	48
Figura 10. Efecto general de la colección de <i>Hypocrea sp.</i> sobre los hongos fitopatógenos.....	49

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Actualmente la necesidad de solucionar los múltiples problemas alimentarios y del área de la salud ha generado una gran demanda por fungicidas, lo que hace imprescindible el desarrollo y la búsqueda de nuevas fuentes que provean de los mismos.

Dentro de la problemática mundial, la necesidad de generar herramientas que permitan incrementar la protección de cultivos ha generado el desarrollo de múltiples investigaciones, ya que se estima que los patógenos de plantas producen pérdidas de al menos 20% en todo el mundo (Hadacek *et al.*; 2000).

Nuestro país no está exento de este problema, ya que siendo un país agrícola en gran parte, es necesario buscar medidas que aminoren los perjuicios y pérdidas económicas causados por las múltiples plagas en los cultivos.

Es claro que el área agrícola tiene un fuerte impacto en la economía nacional, ya que solamente las exportaciones de cultivos abarcan un 18.33% de las exportaciones nacionales; sin incluir las ventas y consumo nacional (Procomer, 1999).

Y precisamente los recursos para disminuir este problema se encuentran muy probablemente en nuestra naturaleza, debido a que Costa Rica cuenta con una gran biodiversidad que no se ha explotado al máximo.

Una idea del potencial que implica contar con una gran variedad de organismos se refleja en el siguiente dato: por ejemplo alrededor de 40% de los hongos filamentosos y actinomicetes producen antibióticos en el momento en que son aislados de la naturaleza (Demain, 1995).

El género *Hypocrea* y sus anamorfos han adquirido gran importancia en los últimos años, debido que a este género pertenecen diversas especies que se caracterizan por su aplicabilidad en control biológico, y a su vez son productores de múltiples antibióticos y toxinas de gran utilidad, no sólo para el control de hongos, sino bacterias y otros organismos. Uno de los anamorfos más conocidos y explotados de este género corresponde al género *Trichoderma*.

La presente investigación permitirá realizar un estudio de la actividad que presentan la colección del género *Hypocrea* que posee la micoteca del INBio, el cual fue recolectado en suelos silvestres, principalmente de áreas protegidas, y que aún no han sido evaluadas en este aspecto.

Al evaluar la actividad de las especies del género *Hypocrea*, se abre la posibilidad de realizar estudios posteriores, con el fin de determinar compuestos activos generados por los hongos que favorezcan el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, que generan tantas pérdidas económicas, no sólo al país sino a nivel mundial. Además se debe considerar el impacto positivo que tendría sobre el medio ambiente, ya que actualmente el uso de fungicidas en altas dosis y frecuencias de aplicación han generado un deterioro acelerado del ecosistema y por ende se hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas para el control de estos fitopatógenos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la actividad *in vitro* de las especies del género *Hypocrea* de la micoteca del INBIO contra 2 hongos fitopatógenos que atacan cultivos de interés comercial en el país.

Objetivos Específicos

Determinar las condiciones de crecimiento y evaluar la viabilidad de la colección del género *Hypocrea*.

Evaluar el efecto de *Hypocrea* sobre los hongos fitopatógenos por medio del sistema comparativo en platos.

Evaluar el efecto de la producción de metabolitos no volátiles por *Hypocrea* en medio líquido contra los hongos fitopatógenos

Evaluar el efecto de la producción de metabolitos volátiles por *Hypocrea* sobre los hongos fitopatógenos

REVISIÓN DE LITERATURA

IMPORTANCIA DEL METABOLISMO SECUNDARIO

Los metabolitos secundarios son parte de los compuestos más importantes que los organismos producen principalmente en la fase estacionaria de crecimiento, como por ejemplo algunos antibióticos y enzimas. Estos están ligados fuertemente a las condiciones de cultivo y algunos de ellos han tenido gran importancia a nivel industrial (Madigan, 1991).

En la naturaleza estos actúan como agentes en una guerra química. Esto es fácil de entender, si se piensa que las fuerzas selectivas que han generado su producción han existido desde antes de la primera célula (Demain, 1995).

Se considera que la producción de antimicrobianos es debido a que estos mejoran la sobrevivencia de los microorganismos que los generan, cuando se encuentran en competencia con otras especies vivas. Estos compuestos actúan vía receptores específicos como por ejemplo: ADN, enzimas sintetizadas a nivel de pared celular, etc (Demain, 1995, Trigos, 1998). Por ejemplo durante los últimos tres años se aislaron más de 800 cepas de microorganismos, las cuales fueron obtenidas de plantas enfermas, de los cuales cada uno fue capaz de producir un antibiótico en cultivo (Demain, 1995).

Además de la importancia que pueden tener estos organismos para la obtención de antimicrobianos y su uso en el control biológico, actualmente se están implementando nuevas técnicas no solo para hacer más efectivo su uso, sino para obtener un mayor potencial de estos organismos.

Por ejemplo, la transformación de las cepas utilizadas haciendo uso de genes marcadores se vislumbra como una herramienta de gran utilidad para detectar y rastrear las cepas utilizadas en campo y de esta forma conocer mejor su ecología y a la vez evitar que se confundan con cepas endógenas (Lo *et al.*; 1998).

También el uso de la biotecnología ha permitido la generación de cepas que sobreexpresen algunas características de interés, como por ejemplo la producción de enzimas, con el fin de obtener mejores resultados y mayor agresividad contra los hongos fitopatógenos.

Limón *et al.*; (1999) y Micheli *et al.*; (1998) generaron transformantes que mostraron un nivel altamente significativo de expresión de los genes y producción de endoglucanasas o quitinasas, comparadas con el tipo silvestre y por lo tanto tuvieron un efecto mayor en el biocontrol (Harman, 2000).

Asociado al uso de estos organismos en el control biológico, se han venido desarrollando técnicas que permitan el uso de estos agentes controladores como donadores de material genético para generar plantas resistentes a diferentes enfermedades. Es así como el potencial de estos organismos se ve incrementado día a día.

ORDEN HYPOCREALES

Dentro de los Ascomycetes, este orden y sus anamorfos incluyen organismos de gran importancia económica, algunos como patógenos de plantas y otros con un fuerte impacto como controladores biológicos (productores de antibióticos y micotoxinas). Dentro de este orden se incluye el género *Hypocrea* que generalmente se ha caracterizado como un agente de control biológico, que actúa sobre hongos patógenos de plantas e insectos (Rossman, 1996).

Dentro del género *Hypocrea* el anamorfo que ha demostrado tener gran efectividad contra diversos hongos fitopatógenos corresponde al género *Trichoderma sp.*

Trichoderma sp es un hongo Deuteromicete perteneciente al orden Moniliales, que se caracteriza por poseer conidióforos hialinos, erectos, muy ramificados y sin verticilos, las ramas son sencillas o están agrupadas y los conidios son hialinos, unicelulares, de forma ovoide y se originan en pequeños racimos terminales. Se puede identificar fácilmente en medio de cultivo por su rápido crecimiento y por las masas de conidios verdes. Es un saprófito común de suelo y madera (Domsch *et al.*;1993; Hidalgo, 1989).

La temperatura óptima para su crecimiento linear en agar y producción de micelio está entre 20 y 28 °C, aunque crece bien entre 6 a 32 °C. El contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo es del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente azul y la violeta. La luz promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración (Hidalgo, 1989; Domsch *et al.*;1993).

Trichoderma abarca un sin número de habitats pero en especial se localiza en materia orgánica en descomposición, ya que estos organismos son colonizadores secundarios, por lo tanto se aislan de materia orgánica descompuesta (Curling 1989; Madriz, 1987).

Los aislados de *Trichoderma* a menudo pueden reconocerse por características macroscópicas, las cuales incluyen: un rápido crecimiento en cultivo, micelio aéreo no muy denso y la producción de pústulas de conidios blancos y verdes.

El telomorfo conocido de *Trichoderma*, como ya se mencionó es *Hypocrea* y muchas de las especies de *Hypocrea* producen el anamorfo típico *Trichoderma* en cultivo (Bissett, 1991).

Las especies del género *Hypocrea* (anamorfo *Trichoderma*) han probado tener gran efectividad contra múltiples patógenos del suelo como por ejemplo: *Phyitium sp*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae* que atacan los cultivos. Más recientemente se ha demostrado su efectividad contra hongos que ocasionan pudrición en la raíz de especies forestales y también como medio de protección contra la pudrición en el almacenamiento de fresas ocasionado por *Botrytis cinerea* (Rossman, 1996; Lewis *et al.*; 1985; Elad *et al.*;1981).

Otra característica importante de este género es que se ha estudiado su potencial para incrementar el crecimiento de varios cultivos de flores y hortalizas. Chang *et al.*; (1986), demostraron el efecto positivo de la presencia en el suelo de *T. harzianum* para cultivos como crisantemos y chile, entre otros, donde estos tratamientos pueden ser combinados con pesticidas utilizados comúnmente. También Windham *et al.*; (1986), demostraron el efecto positivo de *Trichoderma sp.* en cultivos como tabaco, tomate y rábano, actuando como un factor regulador del crecimiento que incrementa el rango de germinación y el peso seco de tallos y hojas.

***Trichoderma* Y SU PAPEL EN EL CONTROL BIOLÓGICO**

El control biológico consiste en una medida para reducir la densidad del inóculo o de las actividades del patógeno o parásito en su estado activo o latente, por un organismo. En esta relación hay múltiples factores involucrados, como: el hospedante, el parásito y el ambiente (Curling, 1989, Madriz, 1987).

Es necesario considerar que a pesar de que el control biológico se ha implementado comercialmente en un nivel práctico, es primordial el realizar estudios que permitan entender la ecología del biocontrol de estos organismos y sus interacciones con los diferentes factores involucrados como: el patógeno, la planta hospedera, el suelo que lo rodea y las comunidades microbianas de la rizosfera (Larkin *et al.*;1999)

Curling (1989) y Madriz (1987) resumen algunos de los principales mecanismos antagonistas generados por los organismos que se utilizan en el control biológico:

- a. Antibiosis:** se refiere a la inhibición de un organismo por un producto metabólico de otro. El metabolito puede penetrar la pared celular o inhibir su actividad por toxicidad química.

- b. Lisis:** produce la destrucción, desintegración, dilución o descomposición de materiales biológicos, y se divide en dos tipos: la exolisis que se refiere a la digestión parcial por enzimas de células vivas por otros organismos y la endolisis se genera por la dilución del protoplasma celular, sin digestión de la pared.

- c. Competencia:** suprime el desarrollo de un microorganismo, ya sea, por la lucha por espacio, nutrientes o cualquier otro factor ambiental que limite su desarrollo.

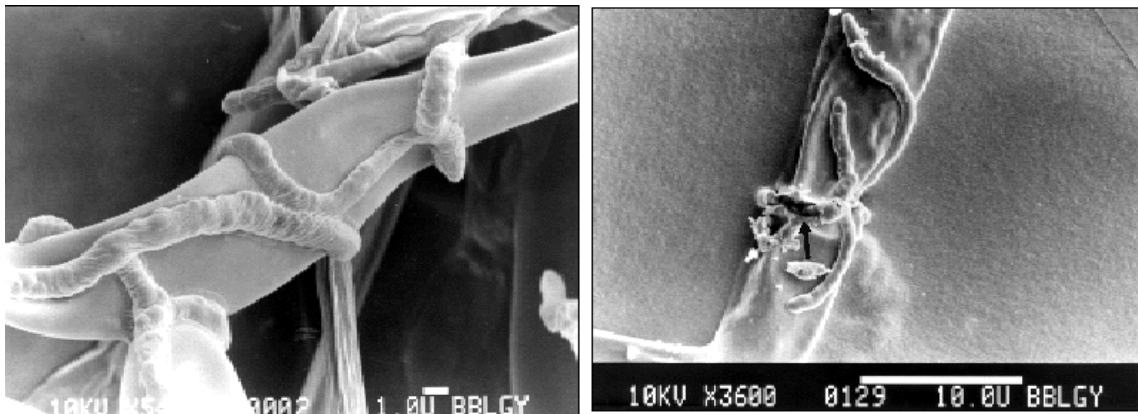
- d. Parasitismo:** se genera cuando un hongo utiliza a otro para su sobrevivencia, causando un deterioro en el hospedero.

Las dos formas típicas de ataque por parte de *Trichoderma* pueden ser:

a. Aéreo con íntimo contacto o arrollamiento alrededor de la hifa. Este tipo de ataque parece indicar que el parásito busca nutrientes que están dentro del hospedero. En esta relación surgen efectos en ambos, pues el parásito posteriormente sufre autólisis (Hidalgo, 1989).

b. Por acción de las hifas sumergidas a corta distancia más que por contacto. En este caso *Trichoderma* actúa como competidor de alimentos y destruye algunas hifas sumergidas a corta distancia más que por contacto (Hidalgo, 1989).

Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que las hifas de *Trichoderma sp.* se arrollan fuertemente alrededor de las hifas de *Rhizoctonia solani* o crecen sobre ellas (ver figura 1); produciendo la coagulación del protoplasma. Posteriormente las hifas del hospedero se revientan y exudan un contenido granular, el cual estimula el crecimiento del hiperparasitismo. El crecimiento de las hifas del hospedero se detiene apenas se inicia el ataque y conforme este avanza, el micelio se vuelve más pálido y es más notable la tinción de las hifas con hematoxilina (Hidalgo, 1989).



Adobe

Figura 1. Ataque de *Trichoderma sp.* sobre las hifas del hospedero
(Soares de Melo *et al.*; 2000)

Pero como se mencionó, la forma de acción de estos hongos no sólo se limita al ataque directo sobre hifas o competencia por nutrientes, sino que incluye a su vez la producción de micotoxinas, enzimas y algunos antibióticos.

Dentro de los múltiples ejemplos se citan algunas de las toxinas y antibióticos producidos por un hongo de este género, *Trichoderma viride* como son: la gliotoxina, el viridin, la tricodermina y diferentes polipéptidos cíclicos: suzukacillinm, alametacina un péptido con actividad antibacterial y el ácido dermadin, el cual es muy activo con bacterias gram negativas y gram positivas (Domsch *et al.*;1993; Hidalgo, 1989; Curling, 1989).

A su vez para *Trichoderma viride* se ha reportado actividad en un sin número de especies, por ejemplo *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor hiemalis*, *Verticillium sp.*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Phytium ultimun*, *Sclerotinia sp.*, *Phytophthora parasitica*, etc. (Domsch *et al.*; 1993).

Otro ejemplo del potencial de este género se evidencia en *Trichoderma harzianum* Rifai, el cual ha sido usado como un agente de biocontrol para la protección de plantas tanto para raíces, semillas, enfermedades foliares y cultivos almacenados. Diferentes cepas aisladas indican que este agente actúa bien bajo condiciones ambientales variadas y su habilidad de sobrevivencia va a estar determinada por la amplitud de la población, el periodo de sobrevivencia y la distribución en el cultivo (Lo *et al.*; 1998).

Trichoderma pers es de las especies que se encuentran con frecuencia en el suelo y ha sido probada como controlador biológico foliar y del suelo de patógenos y también ha sido usado en diferentes aplicaciones biotecnológicas (Leuchtman *et al.*; 1996).

***Trichoderma* COMO RECURSO DE ENZIMAS INDUSTRIALES**

La actividad directa de micoparasitismo por *Trichoderma spp.* es uno de los mejores mecanismos para explicar la actividad de antagonismo contra hongos patógenos de plantas presentes en el suelo. Un importante número de estos son capaces de excretar enzimas hidrolíticas al medio como por ejemplo: las quitinasas, proteasas y β -glucanasas, especialmente cuando están presentes laminarina, quitina o la pared celular de algunos hongos fitopatógenos (De la Cruz *et al.*; 1992).

En cultivos en plato los halos de inhibición pueden ser resultado de la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares utilizadas por *Trichoderma spp* para colonizar el sustrato y degradar la pared celular de los competidores (Moino *et al.*; 1998). Esas enzimas ya fueron caracterizadas para *T. harzianum* como 1-6 glucanasas extracelulares que degradan azúcares solubles y producen halos hidrolíticos en levaduras (Moino *et al.*; 1998).

Los hongos Hypocreales particularmente en lo que se refiere al anamorfo *Trichoderma reesi* producen celulasas que son utilizadas con propósitos industriales (Samuels *et al.*; 1996).

Una cepa obtenida de las islas Solomon ha sido uno de los mejores recursos de celulasas desde los años 40's. Recientemente se han aislado ascosporas de *Hypocrea sp.* donde al menos dos colonias que producen celulasas en mucho mayor cantidad que las colonias que se han usado comúnmente (Samuels *et al.* 1996, Rossman, 1996).

Diferentes colonias de *Trichoderma spp.*, que tiene un control efectivo contra *Rhizoctonia solani*, producen 1,3 β - glucanasa y quitinasa en cultivos que tienen la pared celular de este patógeno como único recurso de carbono (Sivan *et al.*; 1989; Curling, 1986).

Martins-Corder *et al.*; (1997) demostraron mediante pruebas de sistema comparativo en plato (competencia por sustrato e hiperparasitismo) la alta potencialidad *in vitro* de *T. viride* y *T. koningii* como antagonista de *V. dahliae*.

Mycena citricolor

Mycena citricolor es un hongo de la clase Basidiomycetes del orden Agaricales. El estado telomórfico ocurre muy poco en la naturaleza y no tiene importancia en el ciclo de la enfermedad. Las cabecitas o estado anamórfico, se desarrollan cuando alcanzan el estado de madurez y se desprenden del pedicelo con facilidad, especialmente con el impacto del golpeteo causado por las lluvias. Estas se forman únicamente durante la época lluviosa sobre las superficies de las lesiones e incluso del grano y tallos (Quesada, 1996; Vargas, 1994).

En la fase sexual el hongo desarrolla un cuerpo fructífero llamado gema o cabecita, la cual es una masa compacta de hifas de forma esferoidal con un diámetro aproximado de 0.36 mm unida a un pedicelo de 1 a 3 mm de largo (Vargas, 1994).

En condiciones *in vitro*, el hongo presenta un crecimiento micelial blanco, algodonoso y en forma irregular; las hifas son septadas incoloras y de distinto grosor (Vargas, 1994).

En el campo, la fructificación del hongo se favorece en condiciones de alta humedad y excesiva sombra. El transporte de las cabecitas ocurre básicamente hacia abajo y a cortas distancias, por lo que las hojas inferiores son las más afectadas. La diseminación a largas distancias ocurre por medio del hombre, insectos y otros animales (Quesada, 1996).

Las lesiones causadas por *Mycena citricolor* son de forma circular a ovalada en las hojas, alargada en las venas y tallos tiernos. Son de color café pajizo o rojizo desde el inicio y se expanden hasta adquirir su tamaño definitivo en unos siete días. Poseen un diámetro de 0.5-1.0 cm, son algo hundidas, con poca o ninguna clorosis alrededor. Cuando las hojas están severamente afectadas o tienen algunas lesiones ubicadas sobre o cerca de las venas, provocan su caída prematura ocasionando el debilitamiento de la planta al reducir significativamente el área fotosintética (Quesada, 1996).

Las pérdidas se deben al debilitamiento de la planta, producto de una excesiva defoliación, caída prematura del fruto y las manchas del mismo en el momento del beneficiado (Quesada, 1996).

El ojo de gallo es una enfermedad del café, y debido al impacto que tiene este cultivo en la economía nacional, se justifica la necesidad de realizar abundante investigación en esta área, ya que este cultivo constituye un 4.51% de participación dentro de las exportaciones que realiza Costa Rica (Procomer, 1999).

Dentro de algunas prácticas que se realizan para el control de esta enfermedad, se pueden citar: las prácticas comunes de combate cultural, donde se evita condiciones de alta humedad (dada muchas veces por excesiva sombra o suelos mal drenados). Asimismo se hace uso de fungicidas, pero el problema que presenta este tipo de combate, es que actualmente el control de aduanas y restricciones de importación de algunos países, regulan el uso excesivo de estos químicos.

El combate biológico se presenta como otra opción para el control de la enfermedad. En el país se han realizado algunos estudios sobre el uso de *Trichoderma spp.*, demostrando la inhibición en la formación de cabecitas y donde el hongo utiliza como sustrato las cabecitas ya formadas (Arroyo, 1975; Paez, 1976; Vargas, 1994).

Arroyo (1975) realizó la evaluación del efecto de *Trichoderma spp.* sobre el ojo de gallo (*Mycena citricolor*) observando una acción positiva de los aislamientos, donde se evidencia destrucción de hifas, tanto en evaluaciones en plato, como en los extractos obtenidos en suspensiones.

Fusarium sp.

Fusarium es un Hyphomycete, perteneciente al Orden Moniliales que se caracteriza por presentar usualmente un rápido crecimiento. Las colonias son generalmente pálidas o poseen coloración muy notoria, rosada, púrpura o amarillas, el micelio es extensivo y similar a algodón y los conidióforos son variables, delgados o simples (Domsch, 1993; Barnett *et al.*; 1998).

Muchas especies de *Fusarium* ocasionan marchitamientos en varias plantas. Los síntomas de la enfermedad que provocan se manifiestan en epinastia, obstrucción y empardecimiento de los vasos xilemáticos, necrosis, marchitamiento y finalmente en la muerte de la planta (Agrios, 1989)

Dentro de la sintomatología del hongo *Fusarium sp*, transmitido a través de semillas, se observa una reducción en la germinación en un alto rango de cultivos en el mundo, es común encontrar estos hongos (*F. moniliforme*) en semillas de maíz (Murillo *et al.*; 1999).

Este hongo tiene un efecto muy serio, principalmente en cultivos como hortalizas postcosecha y especialmente en cultivos de raíces, tubérculos y bulbos. Pero las plantas de mediana altura como tomate y algunas cucurbitáceas son afectadas a menudo (Agrios, 1989). El ingreso del patógeno a la planta se inicia por heridas causadas por insectos o pájaros.

En Costa Rica muchos cultivos se ven afectados por el ataque de diferentes especies de este hongo. Un reporte del Ministerio de Agricultura, contabiliza un total de 21 cultivos atacados por *Fusarium spp*, entre los cultivos de consumo local y los de exportación. Algunos ejemplos de los cultivos que son atacados comúnmente por las especies de *Fusarium* son: el maíz (*Zea mays*), la piña (*Ananas comosus*), la caña de azúcar (*Saccharum spp*), el chayote (*Sechium edule*), la papa (*Solanum tuberosum*), el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la papaya (*Carica papaya*), entre otros (MAG, 1991).

Es claro que los problemas causados por este género a nivel agrícola en nuestro país son bastante significativos, ligados a su vez a múltiples factores ambientales que benefician la contaminación. Pero además de ello, este género se ha asociado a un fenómeno de gran importancia en lo que se refiere a seguridad alimentaria, debido a que tiene la facultad de producir micotoxinas que se almacenan en los alimentos. Se mencionan a continuación algunas de las especies de *Fusarium* que generan problemas significativos en algunos cultivos de interés.

La mayor parte de la enfermedad que causa la pudrición de las espigas en maíz (*Zea mays*) es causada por *Fusarium spp.* Tres especies de *Fusarium* son predominantemente responsables de la enfermedad: *F. moniliforme*, *F. graminearum* y *F. subglutinans*, siendo *F. moniliforme* una de las de mayor relevancia. Estas especies además producen micotoxinas. (Reid *et al.*; 1999; Marin *et al.*; 1995; Cotten *et al.*; 1998). Al menos 5 micotoxinas de *Fusarium* se producen naturalmente en maíz: moniliformin, zearalenone, deoxinivalenos, fusarin C y fumonisin (Demain, 1995).

Una de las más serias enfermedades que afectan al fruto del banano, es la llamada pudrición de la corona y se ha concluido que esta es causada por dos especies de hongos, de las cuales una es *Fusarium semitectum*.

Las especies que en banano, en términos de toxicidad, causan los mayores problemas son: *F. camptoceras*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. acuminatum* y *F. equiseti* (Jiménez *et al.*; 1997). Particularmente *F. oxysporum* es un hongo causante de serios problemas en plantas vasculares en variedad de cultivos en todo el mundo (Nelson *et al.*; 1997).

El control biológico con diferentes organismos se ha aplicado para este hongo que causa innumerables pérdidas. Larkin *et al* (1999) reportan el control sobre *Fusarium oxysporum* por algunos organismos antagonistas como *Fusarium spp.* no patogénicos. Así mismo se reportan algunas colonias de pseudomonas, las cuales pueden suprimir el crecimiento de *Fusarium sp.* si se aplican sobre las raíces y semillas de varios cultivos (Duijff *et al.*; 1999).

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

I PARTE.

Activación y evaluación de la viabilidad de los hongos del género *Hypocrea* de la micoteca del INBio

Se generó la lista de los hongos a partir de la base de datos del INBio y se corroboró ésta con la información contenida en las bitácoras. Se recuperó un total de 23 viales con el material almacenado en agua estéril. La siembra del material se realizó en el medio papa dextrosa agar (PDA) en tubos de ensayo.

El material que presentó contaminación por bacterias se cultivó en medio Martín (10 g glucosa, 5g/l peptona, 1 g/l K_2HPO_4 , 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,03 g/l Rosa Bengala, 15 g/l Agar para un 1L H_2O . Luego se autoclava y se adicionan 3 ml de estreptomicina 2%).

II PARTE.

Hongos fitopatógenos a evaluar

Se seleccionaron 2 hongos fitopatógenos, con el fin de determinar la actividad del género *Hypocrea* sobre los mismos. La selección se realizó tomando en consideración la publicación del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Extensión Agrícola (1991) y con la asesoría de la Ing. Agrónoma, Ana Lorena Guevara, Coordinadora General del Programa de Bioprospección del INBio.

Los géneros seleccionados fueron *Mycena citricolor* y *Fusarium sp.* El material fue facilitado por el Ing. Luis Cartagena del área de protección de cultivos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Los cultivos fueron aislados de material vegetal contaminado por los mismos. El material se mantuvo y se multiplicó en medio PDA.

III PARTE.

Evaluación del género *Hypocrea* mediante un sistema comparativo en platos

Se colocaron segmentos de 5 mm de diámetro del micelio del hongo fitopatógeno a 1 cm de distancia del borde del plato. Trascorridas 24 horas, se colocó un segmento similar de *Hypocrea* al lado opuesto del fitopatógeno. Se utilizaron placas petri de vidrio de 9 cm de diámetro.

La evaluación del material se realizó simultáneamente y para cada prueba se realizaron 4 repeticiones. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 26 °C. Las evaluaciones se realizaron cada 3 días y se mantuvieron hasta el décimo día.

Para realizar la evaluación del material se midió el diámetro de crecimiento (cm) de ambos hongos y el sexto día se aplicó la escala planteada por Bell *et al* (1982).

La escala utilizada va de 1 a 5 donde,

1. *Hypocrea sp.* crece por completo sobre el patógeno y cubre la superficie del plato.
2. *Hypocrea sp.* cubre al menos 2/3 partes de la superficie del medio respecto al fitopatógeno.
3. Ambos hongos cubren la mitad de la superficie del plato.
4. El patógeno coloniza 2/3 partes del plato respecto a *Hypocrea sp.*
5. El patógeno rodea por completo a *Hypocrea sp.* y cubre la superficie del plato.

Se consideró que hay un nivel alto de antagonismo, si la evaluación de *Hypocrea sp* es menor o igual a 2 y se consideró que no es antagonista si es mayor o igual a 3.

Los controles de crecimiento mantuvieron las mismas condiciones pero sin realizar la siembra del hongo al lado opuesto. El número de repeticiones para el control fue de 4.

IV PARTE.

Evaluación de metabolitos no volátiles producidos por *Hypocrea* en medio líquido.

A) Cultivos en medio líquido

En enlenmeyer de 250 ml con 60 ml de medio Czapek – Dox (Medio CZA: 3g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0.5g MgSO₄. 7H₂O, 0.5 g KCl, 0.01 g FeSO₄.7 H₂O, 30 g Sacarosa, 1 L H₂O destilada) + 0.05% de extracto de levadura y pH: 4.0, se inocularon 3 segmentos de 5 mm de diámetro del *Hypocrea sp.* a evaluar. Se incubaron durante 7 días a 21 ° C a 150 rpm.

Se realizó el cultivo en medio papa dextrosa líquido (pH: 5.0) para una parte de la colección de los hongos (que dieron actividad positiva en el ensayo anterior).

B) Obtención del extracto

Se separó el micelio por centrifugación a 9.150 g (2 500 rpm, SA 600) por 20 minutos a 4 °C, el supernatante se filtró en un Watman 40 y posteriormente en un milipore 0,45 µm. Se almacenó a 0 °C para su uso posterior

Para una parte de los hongos también se preparó el extracto autoclavando parte del cultivo en medio líquido (121 °C por 20 minutos)

C) Evaluación del extracto en platos petri.

En cada plato petri con PDA, se realizaron cuatro agujeros (5 mm de diámetro) en puntos equidistantes con ayuda de un sacabocados, a 1.5 cm de borde del plato. Se adicionó 1 ml del filtrado, distribuido en los 4 agujeros (alrededor 250 µl por agujero). El centro del plato petri se inoculó con un segmento de 5 mm de diámetro del fitopatógeno y se midió el diámetro de crecimiento del mismo cada tres días, para un total de 9 días. Las pruebas se realizaron por triplicado.

A los controles se les adicionó agua estéril en los agujeros. El ensayo se incubó a 26 °C.

V PARTE.

Evaluación del efecto de la producción de metabolitos volátiles por *Hypocrea* sobre *M. citricolor*

Se utilizaron cultivos de *Hypocrea sp.* con diferentes fechas de siembra (entre 5 días y 1 mes) en platos petri con medio PDA. Después del periodo de incubación se retiró la tapa del plato petri y se reemplazó por un plato con PDA, que fue inoculado previamente (dos días antes) con un segmento de 5 mm de diámetro del fitopatógeno.

Para el control se colocó el plato con el fitopatógeno sobre un plato petri con PDA sin inocular con *Hypocrea sp.* Los platos se sellaron con *parafilm*.

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada *Hypocrea*, a 26 °C y se realizaron mediciones del diámetro de crecimiento del fitopatógeno cada 3 días, para un total de nueve días.

VI PARTE

Análisis de resultados

Para el análisis de resultados se utilizó el programa SPSS, y se realizó un análisis de varianza. Se aplicó el Test de Tukey para definir la diferencia mínima significativa entre los datos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Se logró activar el total de la colección del género *Hypocrea* (23 cepas), los cuales se denominaron con el código de la colección (ver descripción de la misma en el anexo I).

Se resumen los principales resultados y se presenta un análisis general de la colección de *Hypocrea* y su efecto sobre los dos hongos fitopatógenos evaluados.

EVALUACIÓN DE *Hypocrea sp* MEDIANTE UN SISTEMA COMPARATIVO EN PLATOS

La evaluación estadística se realizó con los datos al sexto día de iniciado el ensayo. El análisis de varianza tanto para *M. citricolor* como para *Fusarium sp* muestra que existe diferencia significativa entre los datos, así mismo se utilizó la escala planteada por Bell *et al* (1982). En el tabla 1 se muestra el comportamiento general de la población para *Fusarium sp.* y *M. citricolor* (anexo II).

Tabla 1. Análisis general de la colección de *Hypocrea* utilizando la escala planteada por Bell *et al* (1982)¹

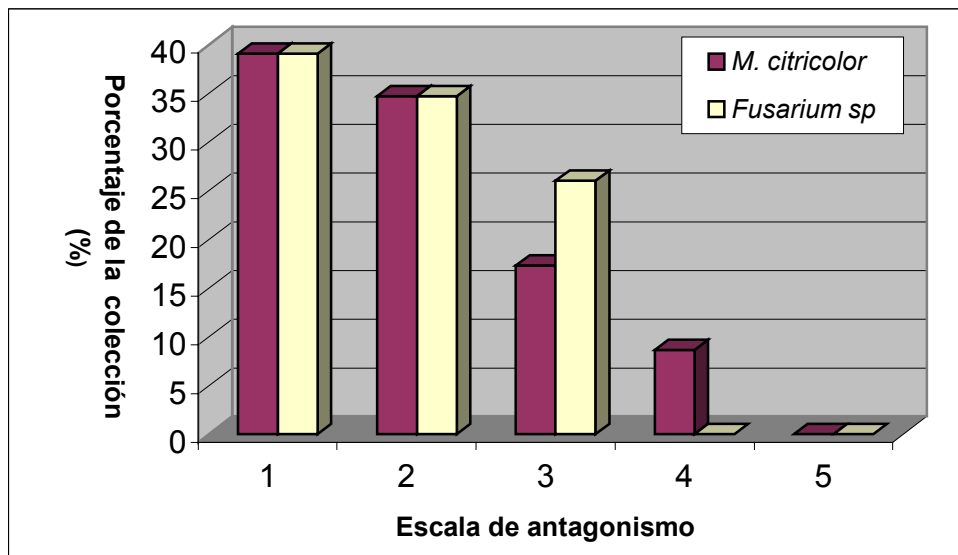
Escala	<i>M. citricolor</i> (%)	<i>Fusarium sp</i> (%)
1	39.13	39.13
2	34.78	34.78
3	17.39	26.09
4	8.70	0.00
5	0.00	0.00

Los datos anteriores se muestran en la figura 2, como se observa alrededor de 73% de los hongos evaluados presentan un nivel de antagonismo alto, donde *Hypocrea sp.* crece sobre el fitopatógeno o lo rodea por completo.

Se seleccionaron los hongos que presentaron mayor actividad tomando en cuenta los datos anteriores y el análisis estadístico de los radios de crecimiento de los fitopatógenos (ver anexo II).

En el tabla 2 se muestra el porcentaje de inhibición de *M. citricolor* respecto al control. Todos los datos presentan diferencia mínima significativa con el control, y cabe recalcar el efecto de los dos primeros hongos correspondientes a los códigos 247 y 801 (ver figura 3).

¹ El porcentaje calculado corresponde al número de *Hypocrea spp* que presentaron ese valor (tabla 1 del anexo II)



Excel

Figura 2. Nivel de antagonismo presentado por *Hypocrea sp* sobre los hongos fitopatógenos, sistema comparativo en platos, escala Bell *et al* (1982).

Se realizó el mismo ensayo en el caso de *Fusarium sp.* con el fin de definir cuales son los grupos que presentaron el mayor grado de antagonismo. En el tabla 3, se muestran los principales resultados del análisis estadístico y la aplicación de la escala.

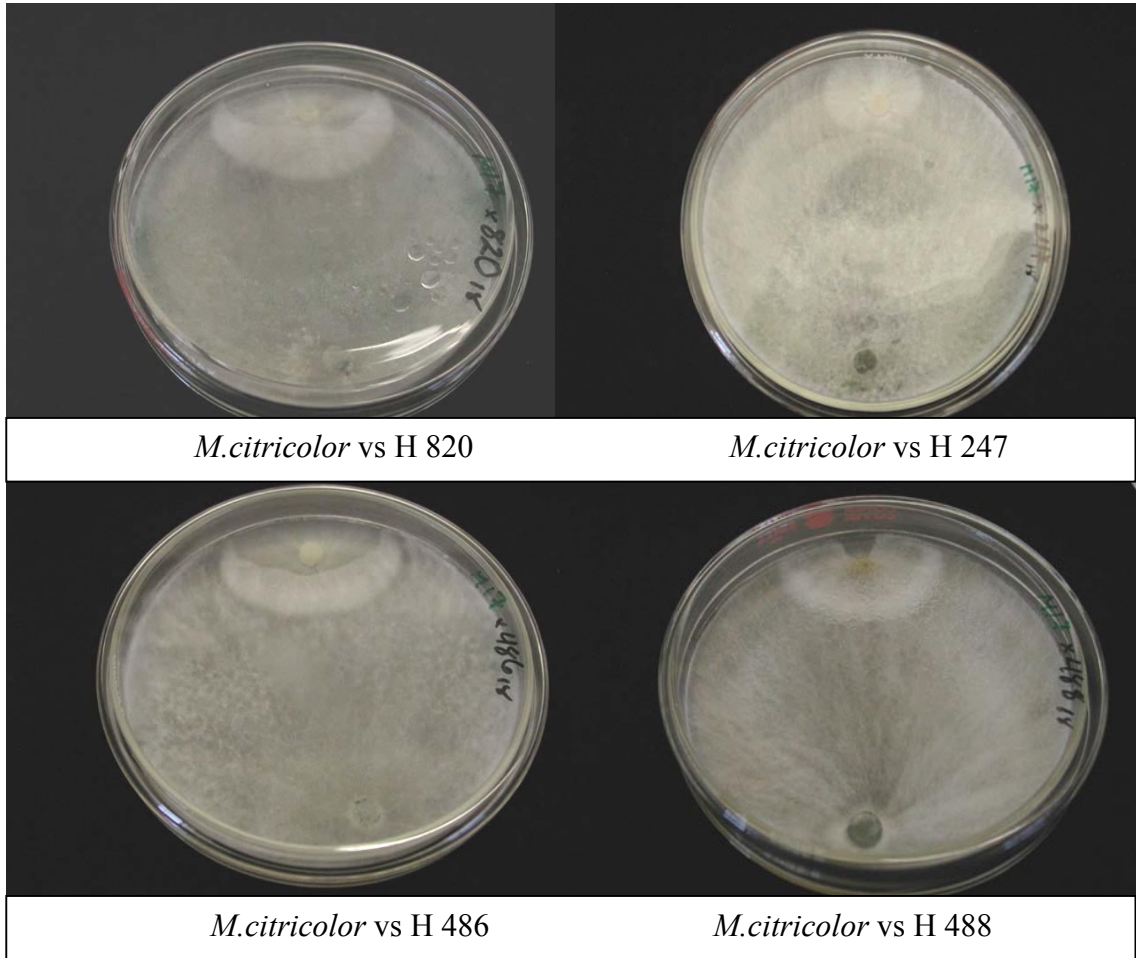
Al igual que en *M. citricolor*, en este caso el antagonismo que genera *Hypocrea sp.* detiene por completo el crecimiento de *Fusarium sp* en el medio de cultivo (ver figura 4). Se observaron cambios de color en el micelio y para *M.citricolor* se observa necrosamiento de las cabecitas y en algunos casos un cambio evidente en la coloración del micelio.

Tabla 2. Efecto de *Hypocrea sp* en el crecimiento de *M. citricolor*

Código de <i>Hypocrea sp</i>	Porcentaje de inhibición ^{2,3}	Antagonismo (escala 1 - 5)
247	45.6 ^a	1
801	44.6 ^a	1
519	41.9 ^b	2
488	41.3 ^{bc}	1
185	40.2 ^{bc}	1
886	38.5 ^{bcd}	1
824	37.5 ^{bcd}	2
486	37.0 ^{bcd}	1
497	36.4 ^{bcd}	1
245	34.8 ^{bcd}	1
820	32.6 ^{bcde}	1
261	32.6 ^{bcde}	2
498	24.5 ^{bcde}	2
826	23.4 ^{cde}	2
572	23.4 ^{cde}	2
47	20.6 ^{de}	2
244	15.8 ^e	2

² El porcentaje de inhibición se define como: $(CC-CF)/CC * 100$, donde CC: crecimiento del control, CF: crecimiento del fitopatógeno en dirección a *Hypocrea sp*.

³ Los datos que tienen la misma letra, no presentan diferencia significativa entre ellos.



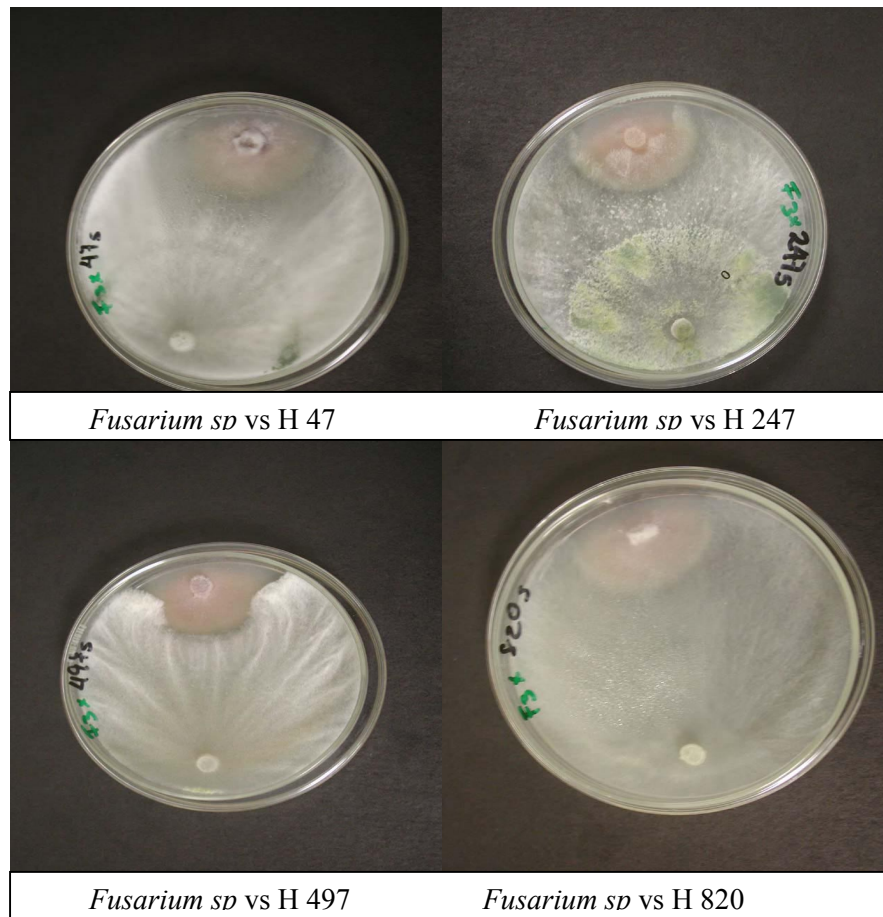
Adobe

Figura 3. Efecto antagónico de *Hypocrea* spp. sobre *M. citricolor*⁴.

⁴ Las colonias en el área superior de las fotos corresponden a *M. citricolor*

Tabla 3. Efecto de *Hypocrea sp.* en el crecimiento de *Fusarium sp.*

Código de <i>Hypocrea sp</i>	Porcentaje de inhibición ^{2,3}	Antagonismo (escala 1 - 5)
245	31.43 ^a	1
47	30.00 ^a	1
486	28.57 ^a	1
820	28.57 ^a	1
886	28.57 ^a	2
251	27.71 ^a	1
488	27.71 ^a	1
185	26.29 ^b	1
497	25.71 ^{bc}	2
801	25.71 ^{bc}	1
186	22.86 ^{bc}	1
247	22.86 ^{bc}	1
572	14.29 ^{bcd}	2
824	14.29 ^{cd}	2
261	5.71 ^d	2
826	4.29 ^d	2



Adobe

Figura 4. Efecto antagónico de *Hypocrea spp.* sobre *Fusarium sp.*

EVALUACIÓN DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES PRODUCIDOS POR *Hypocrea sp* EN MEDIO LÍQUIDO

Se presentaron diferencias importantes respecto al medio de cultivo líquido utilizado, en PDA hay una mayor producción de micelio y un crecimiento más acelerado respecto a Czapeck - Dox. En algunos casos se tuvieron problemas de contaminación principalmente por bacterias, y para algunos hongos el procedimiento de filtración no fue posible debido a su consistencia.

Se eligieron un total de 10 hongos para hacer los cultivos en PDA líquido, tomando en consideración los resultados obtenidos en la evaluación del sistema comparativo en platos y los resultados preliminares de esta evaluación con el medio de cultivo Czapeck - Dox.

Se resumen a continuación los resultados principales de los tratamientos y en el anexo III se muestra el análisis estadístico para los mismos.

En general los hongos que fueron cultivados inicialmente en Czapeck - Dox muestran mayores diferencias significativas respecto al control.

En el tabla 4 y 5 se presentan los resultados del efecto de los extractos de *Hypocrea sp* sobre *M. citricolor* y *Fusarium sp*. Los datos en negrita indican que existe una alta diferencia significativa con el control. Por problemas de contaminación o por el tipo de suspensión obtenida no se tienen datos para algunos de los tratamientos. Se indican los datos que presentaron el mayor porcentaje de inhibición, y la forma como se obtuvo el extracto.

La inhibición del crecimiento se evidencia de diferentes formas, en algunos casos hay una reducción en la producción de micelio como en el hongo con el código 820 respecto a *M. citricolor*, pero principalmente se observa una disminución en el diámetro de crecimiento del hongo evaluado (ver figura 5).

Tabla 4. Efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* en el crecimiento de *Mycena citricolor*

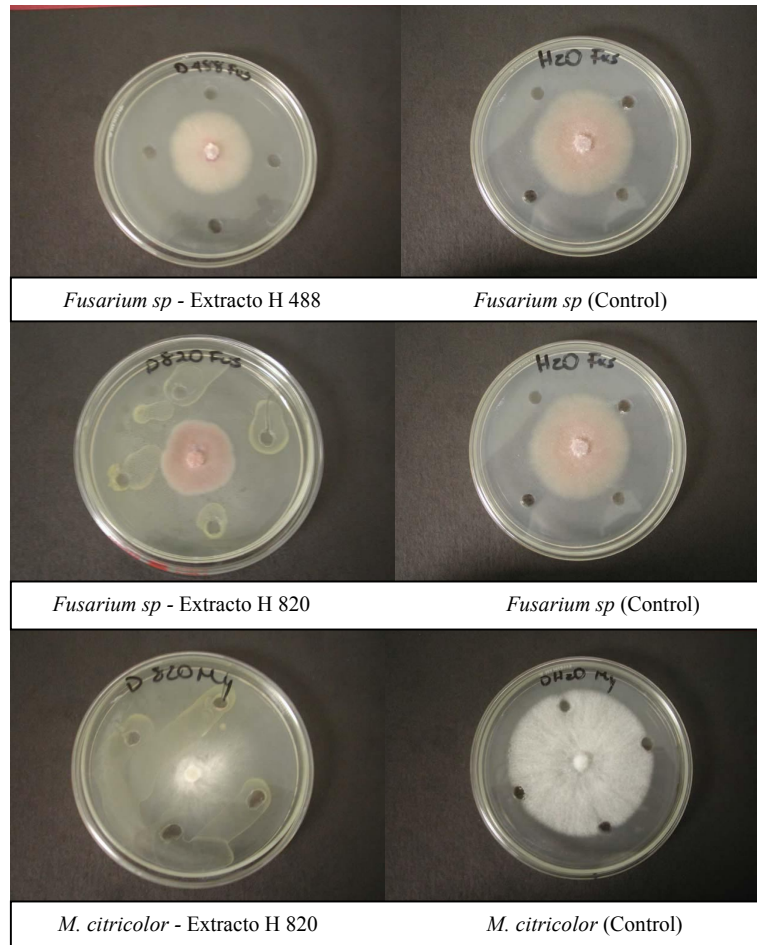
Código de <i>Hypocrea sp</i>	Porcentaje de inhibición ^{2,5}	Datos del extracto ⁶	
		Medio	Extracción
245	26.47^x	CD	A
820	17.65^a	CD	F
185	16.42^m	PDA	F
251	15.09 ⁿ	PDA	F
244	14.71^y	CD	A
247	8.82 ^b	CD	F
473	8.82 ^{yz}	CD	A
826	5.88 ^z	CD	A

⁵ Los datos que presentan como superíndices la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos. Corresponden a análisis estadísticos diferentes: a - b, m - n, x-y-z

Tabla 5. Efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* en el crecimiento de *Fusarium sp.*

Código de <i>Hypocrea sp</i>	Porcentaje de inhibición ^{2,5}	Datos del extracto ⁶	
		Medio	Extracción
820	43.40^a	CD	F
488	18.24^b	CD	F
304	16.14^x	CD	A
824	9.85 ^d	CD	F
245	7.76 ^b	CD	F
47	7.76 ^y	CD	A
826	5.66 ^y	CD	A

⁶ CD: Medio Czapeck- Dox, PDA: Papa dextrosa agar, F: Filtrado, A: Autoclavado



Adobe

Figura 5. Inhibición causada por los extractos de *Hypocrea sp.* sobre *M. citricolor* y *Fusarium sp.*

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS VOLÁTILES POR *Hypocrea sp* SOBRE *M. citricolor* y *Fusarium sp*.

Se diseñaron los ensayos de tal manera que se lograran evaluar los hongos en diferentes estadios de crecimiento. Se utilizaron placas de *Hypocrea sp.* que fueron sembradas a 5 y 30 días de iniciado el cultivo. Los resultados mostraron diferencias en el efecto que tienen los *Hypocrea spp.* en el crecimiento del fitopatógeno respecto a la edad del cultivo.

Los porcentajes de inhibición fueron calculados para el sexto día de crecimiento, pero aún transcurridos 10 días se mantiene la inhibición de *Hypocrea sp.* sobre el fitopatógeno, principalmente para el hongo con el código 247, el cual inhibe por completo el crecimiento de *M. citricolor*.

En el tabla 6 y 7, figura 6 y 8, se muestran los resultados para los hongos que tuvieron un mayor efecto sobre los fitopatógenos evaluados. La inhibición fue más evidente en cultivos de *Hypocrea spp* que tenían entre 15 días y un mes de sembrados para ambos fitopatógenos

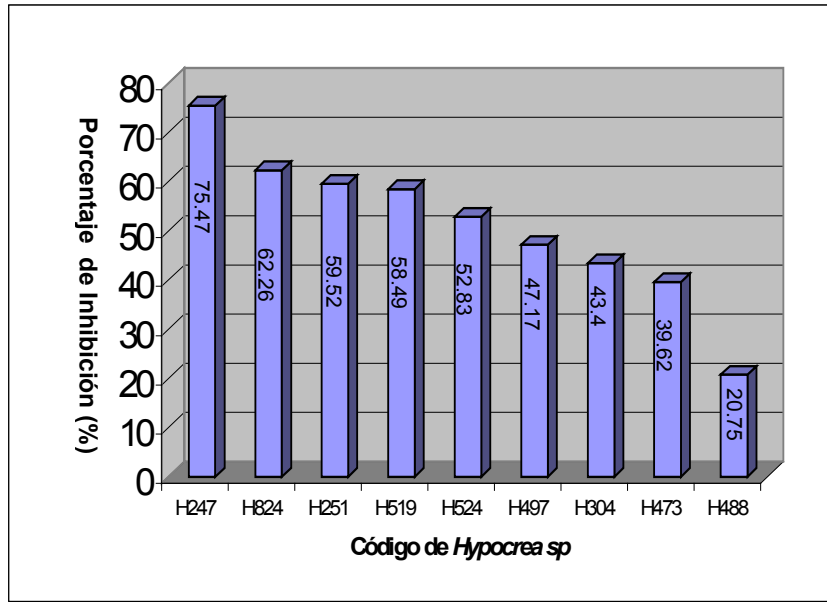
La inhibición del crecimiento fue mucho más evidente y prolongada en *M. citricolor* (ver figura 7 y 9). Como se mostró alcanza niveles de un 75 % al sexto día para el hongo código 247. No fue posible realizar el análisis estadístico de los datos debido a que no se tenían suficientes repeticiones por limitaciones del ensayo (alta contaminación).

Se resume en la figura 10 un análisis, en orden de importancia, del efecto de *Hypocrea spp.* sobre los fitopatógenos. El gráfico se elaboró asignando el valor numérico de cada ensayo al código del hongo y para ambos fitopatógenos, de tal manera que los hongos con un efecto más evidente presentarán un valor más alto que los que no lo presentan.

Se puede resumir de esta figura, que hay mayor espectro de acción en los hongos con los códigos 247,185, 824, 820, 245, ya que en general estos hongos presentan la mayor actividad en las diferentes pruebas realizadas para ambos hongos fitopatógenos.

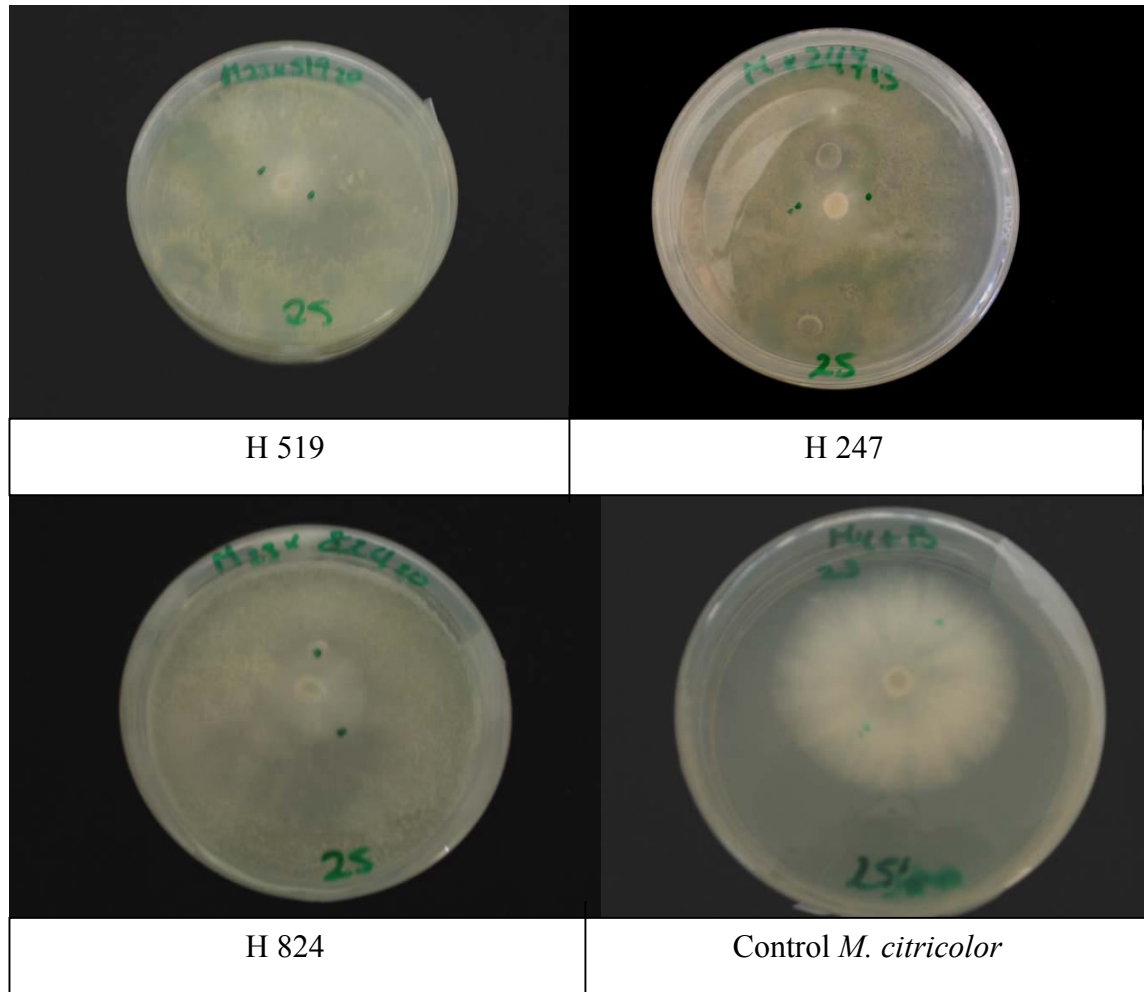
Tabla 6. Efecto de los metabolitos volátiles sobre *M. citricolor*

Código de <i>Hypocrea sp</i>	Porcentaje de Inhibición ²
H247	75.47
H824	62.26
H251	59.52
H519	58.49
H524	52.83
H497	47.17
H304	43.40
H473	39.62
H488	20.75



Excel

Figura 6. Efecto de los metabolitos volátiles en el crecimiento de *M. citricolor*

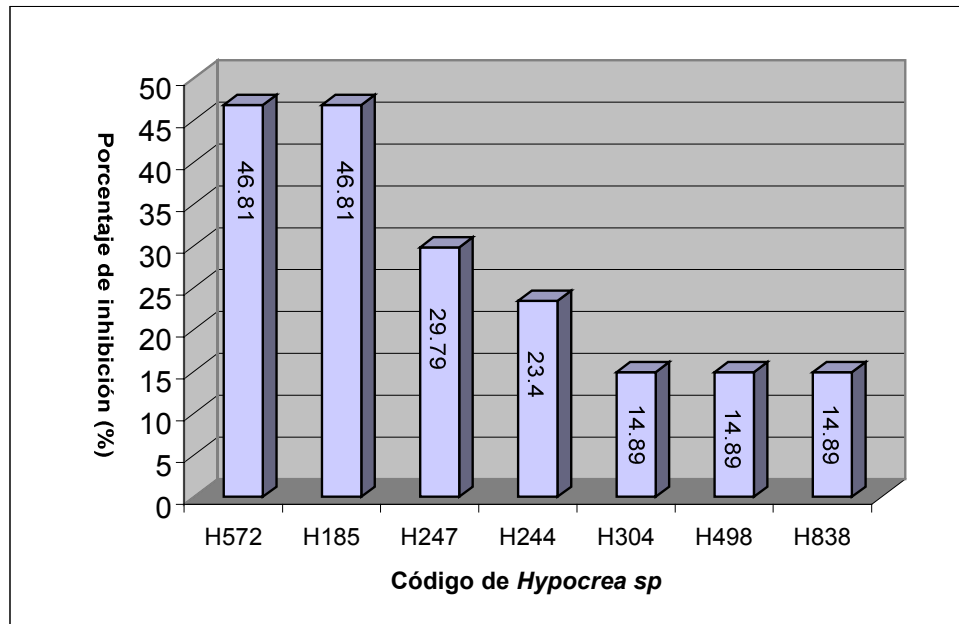


Adobe

Figura 7. Inhibición del crecimiento de *M. citricolor* por metabolitos volátiles de *Hypocrea sp.*

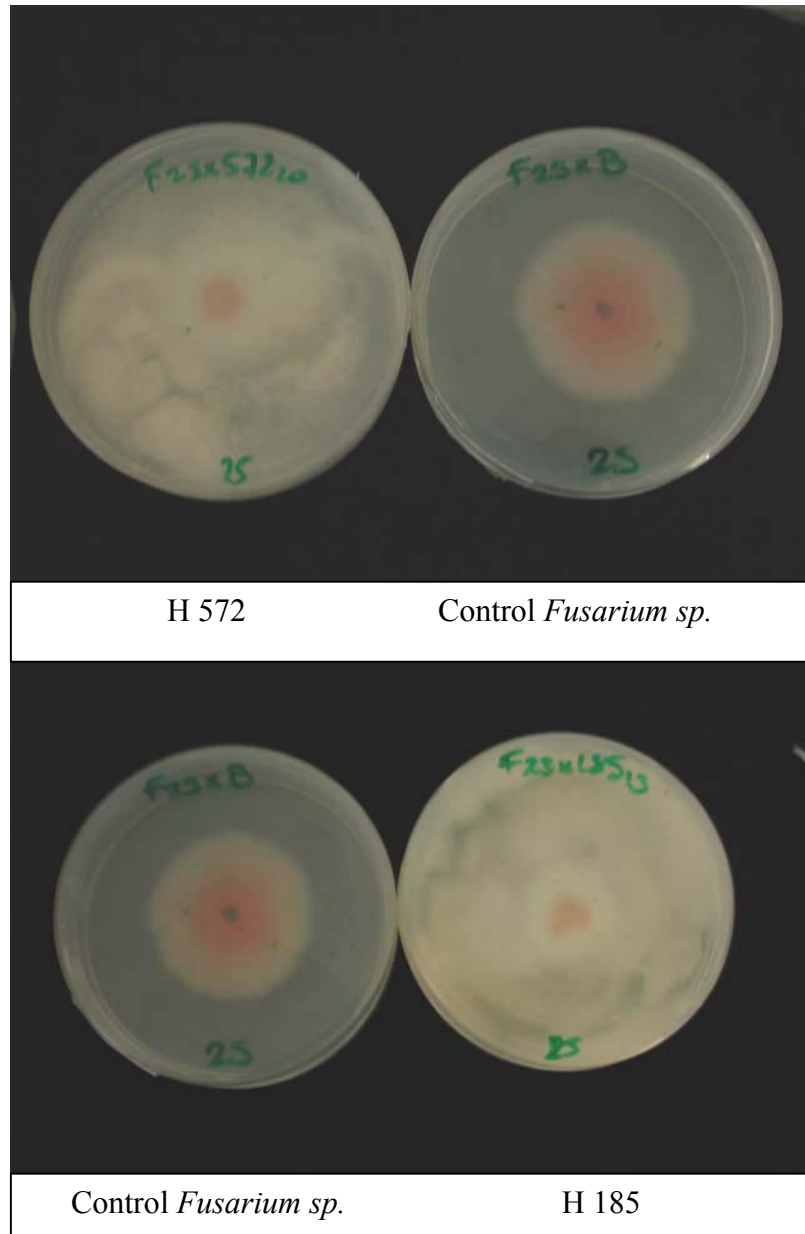
Tabla 7. Efecto de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*

Código de <i>Hypocrea sp</i>	Porcentaje de Inhibición ²
572	46.81
185	46.81
247	29.79
244	23.40
304	14.89
498	14.89
838	14.89



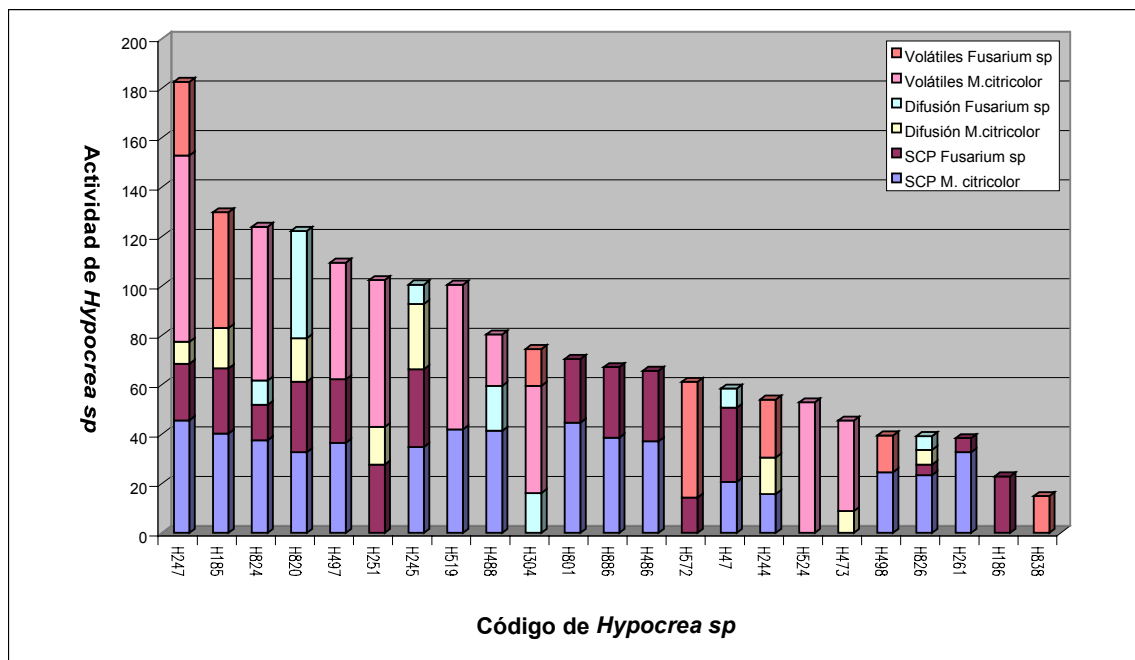
Excel

Figura 8. Efecto de los metabolitos volátiles en el crecimiento de *Fusarium* sp.



Adobe

Figura 9. Inhibición del crecimiento de *Fusarium sp.* por metabolitos volátiles de *Hypocrea sp.*



Excel

* SCP: Corresponde al sistema comparativo en platos. Difusión: evaluación de los extractos de *Hypocrea sp*

Figura 10. Efecto general de la colección de *Hypocrea sp.* sobre los hongos fitopatógenos

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En general se observa un antagonismo bastante alto de algunos hongos de la colección y una respuesta similar de *Hypocrea spp.* para ambos fitópatógenos, especialmente en el ensayo comparativo en platos donde alrededor de un 70% presenta un nivel alto de antagonismo y hay coincidencia entre los datos.

Es importante considerar los hongos con los códigos 247, 824, 185 y 820 (figura 10), ya que su actividad comprende un amplio rango de acción para la mayoría de las pruebas realizadas.

El planteamiento de las evaluaciones se realizó intentando abarcar las diferentes posibilidades que se le han reportado a este género, especialmente a su anamorfo *Trichoderma* donde Martins-Corder *et al* (1997) reportan que puede darse un efecto antagónico por parte de este hongo mediante la producción de metabolitos volátiles, no volátiles, hiperparasitismo, competencia por nutrientes, espacio u oxígeno.

La mayoría de los hongos analizados que mostraron un alto grado de antagonismo en el sistema comparativo en platos tienen un patrón de crecimiento y características propias del anamorfo *Trichoderma*. Se citan a continuación varios resultados reportados para este tipo de ensayo.

Moino y Batista (1998) demostraron el efecto antagónico de *Trichoderma sp.* contra los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliaea*, donde se observó disminución del crecimiento micelial de los dos entomopatógenos. La evaluación fue realizada mediante un sistema comparativo en platos.

Soares de Melo *et al* (2000) obtuvieron inhibición de *Rhizoctonia solani* por parte de colonias de *Trichoderma harzianum* mediante un sistema comparativo en plato. Se realizaron también estudios de microscopía electrónica donde se demostró el parasitismo y destrucción de las hifas de *R. solani*.

Es importante recalcar que además de la producción de metabolitos volátiles y no volátiles, a este género se le han atribuido la producción de enzimas de gran importancia industrial. Lo *et al* (1998) reportan la producción de estas por parte de *T. harzianum*, las cuales degradan la pared celular de los hospederos, entre estas se mencionan: β -1,3 glucanasas, quiitinasas y celulasas.

A pesar de que estas no se evalúan directamente en este ensayo, debe considerarse que podrían estar contempladas en el efecto antagónico observado en el sistema comparativo en platos.

Asimismo, el uso de la colección para diferentes fines está sujeta al interés que se busque en la misma, ya que algunos hongos que presentan lento crecimiento como es el caso del código 304; muestra actividad en lo que se refiere al efecto de los extractos obtenidos y en la evaluación de metabolitos volátiles, por lo tanto la importancia de este organismo se dirigiría a la búsqueda de algún químico de interés y no directamente a control biológico en campo.

Es importante tomar en cuenta que la producción de un metabolito por parte de un hongo está ligado a una serie de factores. Al ser esta una evaluación preliminar no se consideraron muchos de ellos, por lo tanto debe tenerse presente que si un hongo da negativo algún ensayo, no significa que no tiene actividad. Este resultado puede deberse a que el tipo de extracción, el medio de cultivo o simplemente la forma de evaluación, no permitan ver el efecto.

Se observó en general una mayor actividad de los extractos producidos en el medio Czapeck – Dox, el cual es reportado como el mejor medio para la extracción de toxinas para este género (Moino *et al.*;1998; Hidalgo, 1989). El uso del medio PDA, sirvió como control para mantener las condiciones iniciales de crecimiento en las que se realizó el cultivo y en las que se obtuvieron los resultados de antagonismo.

En el caso de la evaluación de metabolitos volátiles, es claro que existe un efecto de *Hypocrea spp.* sobre los fitopatógenos evaluados, especialmente sobre *M. citricolor*. Se ha reportado actividad importante en la producción de metabolitos volátiles en medio de cultivo por *T. viride* y *T. koningii* y otros hongos aislados. Dicha influencia se da a través de una inhibición del crecimiento micelial y es importante considerar que no siempre un hongo que produzca metabolitos volátiles produce sustancias no volátiles de interés (Martins-Corder et al.;1997), como se observó en esta evaluación.

A pesar de los resultados obtenidos es necesario optimizar el procedimiento para la identificación y extracción de metabolitos volátiles, que permita una evaluación más precisa de los mismos, y disminuir la contaminación del plato superior.

Se recomienda el uso de filtros 0.22 μm para la obtención del extracto, ya que a pesar de las condiciones asépticas con que se trabajó, se presentaron problemas de contaminación por bacterias.

Evaluar los cultivos de *Hypocrea sp.* en diferentes edades de crecimiento para el ensayo de metabolitos volátiles y no volátiles es necesario para corroborar que la producción de los compuestos está ligado a este factor y también para abarcar la posibilidad de que se produzca algún compuesto de interés fuera del rango tiempo en que se evaluó.

En general puede decirse que la colección presenta un efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos, especialmente sobre *M.citricolor*, el cual se ve afectado por una mayoría de hongos en las diferentes variables y en forma mucho más evidente. Esto no resta importancia a los resultados obtenidos para *Fusarium sp.*, ya que este hongo es sumamente agresivo y los resultados en algunas investigaciones no han sido muy satisfactorias.

Por ejemplo, se reportan algunas pruebas de selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* para el combate de *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia solani* en clavel. Las cepas de *Trichoderma sp.* fueron aisladas de suelo costarricense donde se produce clavel. En las pruebas *in vitro* con *Fusarium sp.* no se encontró ninguna cepa con una acción directa sobre *Fusarium sp.* se cree que el efecto es debido a una competencia por nutrientes (Hidalgo, 1989).

No debe olvidarse que el análisis *in vitro* solamente permite entender un pequeño sector de la sistemática del control biológico, por lo cual no es posible hacer conclusiones determinantes sobre el efecto antagónico de este material, ya que si se desea utilizarlo como un potencial controlador biológico deben realizarse múltiples ensayos.

Es necesario trabajar en la taxonomía de la colección para realizar un análisis de los reportes hechos para las diferentes especies, así como la identificación y evaluación de los posibles metabolitos presentes. Esto es de suma importancia ya que se reporta que la caracterización de estos metabolitos puede ser utilizada para estudios quimiotaxonómicos, especialmente cuando la diferenciación morfológica entre las especies no es muy clara (Demain, 1995; Trigos, 1998).

Así mismo es necesario definir la forma más precisa de almacenamiento para este tipo de colección. En algunos organismos se reporta la pérdida de la habilidad de producir compuestos por el almacenamiento en medio sólido a 6°C, ya que la producción de antibióticos eleccionada en la naturaleza se va perdiendo en los tubos (Demain, 1995).

Además de utilizar diferentes periodos de tiempo en los cultivos para posteriores evaluaciones y las variaciones que se puedan dar en los protocolos, podría incluirse el uso de elicitores, ya que es reportado que la síntesis de enzimas producidas por *Trichoderma sp.* es inducida por la presencia del hongo hospedero o componentes de la pared celular del hongo (Lo *et al.*;1998), lo cual podría generar otro tipo de componentes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se logró determinar la viabilidad de toda la colección y una actividad *in vitro* positiva por parte de un porcentaje de la colección contra ambos fitopatógenos, donde se observó un efecto más evidente sobre el hongo *M. citricolor*.

La evaluación de la colección mediante un sistema comparativo en platos, demostró el posible potencial de estos organismos para control biológico, donde alrededor de un 70 % de la misma presenta un nivel alto de antagonismo tanto para *M. citricolor* como para *Fusarium sp.*

La evaluación de la producción de metabolitos no volátiles brindó una idea general del potencial que podría tener la colección en la producción de algún químico de interés, pero es necesario trabajar mucho más en esta área debido a las dificultades que se tuvieron en los ensayos.

Se demostró la presencia de actividad importante en la producción de metabolitos volátiles y la inhibición del crecimiento para ambos fitopatógenos, donde la inhibición está dada principalmente por una reducción en la velocidad de crecimiento y en algunos casos la detiene por completo.

Al ser esta una evaluación preliminar, solo brinda una idea del potencial que eventualmente podría tener la colección analizada. Es necesario realizar más pruebas especialmente en ensayos en invernadero y campo, así mismo trabajar a un nivel más cuantitativo en el caso de los metabolitos no volátiles mediante extracción química.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Es de suma importancia definir un protocolo de evaluación para el material que ingresa del campo al laboratorio, identificado para este género, de tal manera que no sea almacenado por demasiado tiempo y se de la posibilidad de que este pierda actividad.

Debe así mismo definirse un protocolo de almacenaje para la colección, ya que parte del material a recuperar se encontraba muy deteriorado.

En el caso del protocolo para la evaluación de metabolitos no volátiles se recomienda el uso de diferentes periodos y medios de cultivo. Así mismo el uso de extracción química para los hongos que dieron actividad positiva en los ensayos, de tal manera que puedan realizarse escalas para determinar la concentración mínima de acción del componente que potencialmente pueda estar aislándose.

En estudios posteriores puede hacerse uso de elicitores para estimular la producción de metabolitos por parte del género *Hypocrea*.

Es necesario analizar diferentes protocolos para evaluar el efecto de los metabolitos no volátiles con el fin de determinar cual de ellos es más sensible para el análisis y así evitar que se excluyan compuestos activos que estén en baja concentración.

Debe realizarse la clasificación y corroboración taxonómica de los diferentes hongos, para realizar un estudio más detallado de los documentos reportados para los mismos y en caso de ser un hongo reportado determinar si presenta una mayor actividad que los ya analizados.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 1989. Fitopatología. Editoria Limusa. México, LIMUSA. 756 p.

ARROYO, H. 1975. Control Biológico del Ojo de Gallo en el café causado por *Mycena citricolor* en época seca. Escuela de Fitotecnia, Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 65 p.

BARNETT, L. HUNTER, B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 ed. Minnesota APS PRESS, The American Phytopathological Society, 218 p.

BELL, O. WELLS, H. MARKHAM, C. 1982. In vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. Ecology and Epidemiology. 72(4): 379-381.

BISSETT, I. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* II Infrageneric classification. Canadian Journal Botanical. 69: 2357-2372.

CHANG, Y. CHANG, Y. and BAKER, R. 1986. Increase Growth of Plants in the Presence of the Biological Control Agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease. 70(2): 145-147.

- COTTEN, T. MUNKVOLD, O. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in Maize Stalk Residue. *Phytopathology*. 88: 550-555.
- CURLING, C. 1989. Combate Biológico del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) por medio de *Trichoderma harzianum* en cafeto. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 48 p
- DE LA CRUZ, S. HIDALGO-GALLEGO, A. LORA, J. BENITEZ, T. PINTOR-TORO, J. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal Biochemistry*. 200: 859-867.
- DEMAIN, A. 1995. Why do microorganisms produce antimicrobials? En: Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. Society of General Microbiology, Symposium 53. Cambridge University Press. 206 - 228 pp.
- DOMSCH, K. GAMS, W. ANDERSON, O. 1993. Compendium of Soil Fungi: *Trichoderma*. Germany, IHW-Verlag. 794 – 809. Vol II.
- DUIJFF, B. RECORBET, G. BAKKER, P. LOPER, J. LEMANCEAU, P. 1999. Microbial Antagonism at the Root Level Is Involved in the Suppression of *Fusarium* Wilt by the Combination of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology* 89(11):1073-1079.

- ELAD, Y. HADAR, Y. 1981. Biological Control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in Carnation. *Plant Disease* 65 (8): 675-677.
- HADACEK, F, GREGER, H. 2000. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, comparability of Results and Assay Choice. *Phytochemical Analysis*. 11: 137-142.
- HARMAN, G. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4): 377-393.
- HIDALGO A. 1989. Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 89 p
- JIMENEZ, M. HUERTA, T. MATEO, R. 1997. Mycotoxin Production by *Fusarium* Species Isolated from Bananas. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2): 364-369.
- LARKIN, R. FRAVEL, D. 1999. Mechanisms of Action and Dose Response Relationships Governing Biological Control of *Fusarium* Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*. 89: 1152-1161.

- LEWIS, J. PAPAIVIZAS, J. 1985. Effect of Mycelial Preparations of *Trichoderma* and *Gliocadium* on Population of *Rhizoctonia solani* and the Incidence of Damping-Off. *Phytopathology*. 75(7): 812-817
- LIMON M, PINTOR-TORO, J. BENÍTEZ, T. 1999. Increased Antifungal Activity of *Trichoderma harzianum* Transformants That Overexpress a 33-kDa Chitinase. *Phytopathology* 89 (3): 254-261.
- LO. C, NELSON, E. HAYES, C. HARMAN, G. 1998. Ecological Studies of Transformed *Trichoderma harzianum* Strain 1295-22 in the Rhizosphere and on the Phylloplane of Creeping Bentgrass. *Phytopathology*. 88(2):129-136.
- LEUCHMANN, A. PETRINI, O. SAMUELS, G. 1996. Isozyme subgroups in *Trichoderma* section, Longibrachiatum. *Mycologia*. 88(3): 384 - 394
- MADRIZ C.M. 1987. Combate Integrado del mal del talluelo causado por *Fusarium* y *Rhizoctonia* en semillero de café mediante el calentamiento solar del suelo y el antagonismo de *Trichoderma harzianum*. Tesis presentada a la escuela de Fitotecnia para el grado de Ingeniero Agrónomo, escuela de Agronomía. Universidad de Costa Rica. 82 p.

- MADIGAN, M. 1991. Biology of Microorganisms. 6 ed. New Jersey, PRENTICE HALL, 874 p.
- MARIN, S. SANCHIS, V. MAGAN, N. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. Canadian Journal Microbiology. 41: 1063-1070.
- MARTINS-CORDER, M. MELO, I. 1997. Antagonism *in vitro* de *Trichoderma spp A Verticillium dahliae* KLEB. Revista Scientia Agricola. 55(1). <http://www.scielo.br>.
- MIGHELI Q, GONZÁLEZ-CANDELAS L, DEALESSI, CAMPONOGARA and RAMON -VIDAL. 1998. Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* Overexpressing the β - 1,4- Endoglucanase Gene eg11 Show Enhanced Biocontrol of *Phythium ultimum* on Cucumber. Phytopathology 88(7). 673-677.
- MAG, MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN AGRÍCOLA. 1991. Aspectos técnicos sobre 45 cultivos agrícolas de Costa Rica, San José, Costa Rica. 560 p
- MOINO, A. BATISTA, S. 1998. Efeito Antagonico de *Trichoderma sp* no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. Revista Scientia Agricola. <http://www.scielo.br>.

- MURILLO, I. CAVALLARIN, L. SAN SEGUNDO, B. 1999. Cytology of Infection of Maize Seedlings by *Fusarium moniliforme* and Immunolocalization of the Pathogenesis - Related PRms Protein. *Phytopathology*.89 (9): 737-747.
- NELSON, A. ELIAS, K. ARÉVALO, E. DARLINGTON, L. BAILEY, B. 1997. Genetic Characterization by RAPD Analysis of Isolates of *Fusarium oxysporum* y *F. erythroxyli* Associated with an Emerging Epidemic in Peru. *Phytopathology* 87: 1220-1225.
- PAEZ, P. 1976. Factores que afectan el hiperparasitismo de *Trichoderma spp.* en combate biológico de ojo de gallo causado por *Mycena citricolor* (Bert and Curt Sacc) Tesis para optar por el grado de Ingeniero Agrónomo. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 42p.
- PROCOMER, Comercio exterior Costa Rica. <http://www.procomer.com>. Principales productos exportados por Costa Rica. 1999.
- QUESADA R. 1996. Efecto del adherente y época de aplicación de una bacteria antagonista en el combate del ojo de gallo (*Mycena citricolor*) Bert y Curt Sacc. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciada en Ing. Agrónoma con énfasis en Fitotecnia, San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, 41p.

- RAMIREZ V. 1994. Estudio preliminar sobre el efecto del manejo nutricional y de la luz en el contenido de cera cuticular y el uso de coberturas foliares en la infección de *Mycena citricolor* (Berk y Curt) Saac en hojas de cafeto. Tesis presentada para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia. Universidad de Costa Rica. 70p
- REID, L. NICO, R. OUELLET, T. SAVARD, M. MILLE, J. YOUNG, J. STEWART, D. SACHAAFSMA, A. 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass and Mycotoxin Accumulation. *Phytopathology*. 89(11): 1028-1037
- ROSSMAN, A. 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia* 88(1): 1-19.
- SIVAN, A. CHET, I. 1989. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Mycorbiology*. 133: 675-682.
- SAMUELS, G. 1996. *Trichoderma*: a review of biological and systematics of the genus. *Mycological Research*. 100(8): 923-933.
- SOARES DE MELO, I. FAULI, J. 2000 Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma spp.* *Scientia Agricola*. 57(1): Jan/mar. <http://www.scielo.br>.

TRIGOS L. 1998. Química de los Hongos. En: Producción de vitamina D2 a partir de hongos macromicetos. Aspectos científicos, técnicos y económicos. Ed. Rivera A. Santa Fé, Bogota, CYTED. 19-61pp.

VARGAS, E. 1994. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en cafeto. Agronomía Costarricense. 8:91-97.

WINDHAM, M. ELAD, Y. BAKER, R. 1986. A Mechanism for Increased Plant Growth Induced by *Trichoderma spp.* In. Phytopathology. 79(5): 518-521.

ANEXO I

Información general sobre la colección del género *Hypocrea* utilizada en este trabajo

Código	Número Bitácora	Especie	Localidad	Sustrato	Descripción	Fecha de colecta
47	1-079		Los Almendros, Guanacaste	Tronco en descomposición	Peritecios embebidos en un estroma suave como cojín color amarillo fuerte, los peritecios son claros, las ascas son largas y tienen 16 esporas circulares	5/12/96
185	2-120		Alajuela, Cristóbal	Tronco grande podrido	Estroma suave amarillo oscuro o pardo, liso se ven los ostiolo de los peritecios. Las ascas cilíndricas 100 - 110 *56 um, 16 subesporas, algunas están separadas otras aun están unidas. Las subesporas miden 3.54 um sin casi esféricas hiliaas, parecen tener verrugosidades. En YM colonia blancuzca , algo transparente, en algunos puntos se eleva poco. Anamorfo parece ser <i>Trichoderma</i> , luego se torna verdoso.	14/5/97
186	2-139		Alajuela, Cristóbal	Tronco grande podrido	Estroma suave amarillo claro , se ven los ostiolo de los peritecios en algunos se ve el contenido color verde que corresponde a las ascosporas. Ascas cilíndricas 75*5 um ascosporas son verdes y se dividen en dos subesporas esféricas 3.5 - 4 um con verrugosidades.	17/5/97
244	2-189		Guanacaste, Pitilla, La Cruz	Tronco podrido	Estroma amarilllo se ven los ostiolo de los peritecios translúcidos. Ascas de 60 um de largo sub- esporas 3*3 um. YM la colonia es blanco opaco, grumoso.	21/6/97
245	3-017		Guanacaste, Pitilla, La Cruz	Rama podrida	Estroma anaranjado. Peritecios con ostiolo visible. Asca mide 75 um*2.5 um es hialina. Ascospors 8 por asca, circulares hialinas, miden 5 um de largo. Cada subascospora mide 2.5 um de circunferencia. Colonia YM grumosa, compacta y blanca.	
247	18-6-97.2		Rincón			
251	18-6-97.10	cf. flavo-virens	Rincón			
261	18-6-97.1					
304	3-044		Guanacaste, Pitilla, La Cruz	Rama podrida	Estroma pulvinado amarillo pálido, los ostiolo son translúcidos, ascosporas hialinas. YM la colonia es ramificada, aplastada y ligeramente blanca.	27/ 6/97
473	3-176		Guanacaste, Liberia, Rincón de la Vieja	Ramilla muerta	Estroma amarillo pequeño 1 - 1.5 um.	16/9/97

Código	Número Bitácora	Especie	Localidad	Sustrato	Descripción	Fecha de colecta
486	3-252	cf. citrina	Santa María, sendero los Naranjos	Hongo <i>Xylaria sp</i>	Estroma "effuse" blanco sin forma definida	17/10/97
488	4-005		Los Almendros	Corteza de tronco muerto	Estroma café, sin una forma muy definida, al borde del estroma se tienen los peritecios.	16/10/96
497	3-262	cf. gelatinosa	Guanacaste, Cacao, 1000 m	Tronco descortezado	Estroma pequeño amarillento pálido, se ven ascosporas verdes. Estroma aproximadamente de 1 mm diámetro	14/10/97
498	3-278		Los Almendros	Corteza de tronco muerto	Estroma café, 4 mm diámetro	16/10/97
519	3-239		Alajuela, Upala, Cristóbal	Tronco descortezado	Estroma café - amarillento, con estípites cortos, duro 0.5-1 cm ancho	10/10/97
524	3-253		Guanacaste, Liberia Rincón	Ramilla muerta	Estroma amarillo, aproximadamente 0.3 - 0.5 cm de diámetro	12/10/97
572	4-039		Pailas	Corteza de tronco muerto	Estroma un poco aplastado marrón, amarillento, aproximadamente 2 - 3 mm de diámetro.	
801	5-155		Guanacaste, Pailas	Madera expuesta en descomposición	Estroma un poco aplanado de 1-2 mm de día	28/6/98
820	5-154		Guanacaste Pailas	madera expuesta en descomposición	Estroma pequeño aprox 1 mm de diámetro, marrón o anaranjado pálido, ascosporas hialinas.	28/6/98
824	5-124		Guanacaste, La Cruz, Pitilla	madera expuesta en descomposición	Estroma aproximado 1 mm, mucho estroma, color anaranjado, café, ascosporas hialinos.	24/6/98
826	5-193		Guanacaste Pailas, Curubande	Sobre tronco descortezado	Peritecios en estroma color café amarillento 2 mm diámetro. Ascosporas verdes	14/8/98
838	6-027	cf gelatinosa	Guanacaste, Maritza, la Cruz	Ramita en descomposición	Peritecios inmersos en estroma verde amarillento formando estructuras mas o menos redondas. Ascosporas verdes ovoides	20/8/98
886	6-150		Guápiles-húmedo Pococí	Tronco con corteza	Estroma amarillo, peritecios inmersos, ascas y ascosporas hialinas. Estroma suave semi- estipitado. Ascosporas hialinas ovoides	2/10/98

ANEXO II

Análisis estadístico de los resultados obtenidos de la evaluación de varias cepas del género *Hypocrea* mediante el sistema comparativo en platos para *M. citricolor* y *Fusarium sp.*

Tabla 8. Radio de crecimiento de *M. citricolor* y *Fusarium sp.* y análisis utilizando la escala planteaba por Bell, *et al.* (1982)

Código	<i>M citricolor</i> (cm)		<i>Fusarium sp</i> (cm)	
	Media	Antagonismo	Media	Antagonismo
47	3.7	2	2.4	1
185	2.8	1	2.6	1
186	4.2	4	2.7	3
244	3.9	2	3.4	3
245	3.0	1	2.4	1
247	2.5	1	2.7	1
251	4.3	3	2.5	1
261	3.1	2	3.3	2
304	4.4	3	3.6	3
473	4.4	3	3.5	3
486	2.9	1	2.5	1
488	2.7	1	2.5	1
497	2.9	1	2.6	2
498	3.5	2	3.4	2
519	2.7	2	3.6	2
524	4.5	3	3.5	3
572	3.5	2	3.0	2
801	2.6	1	2.6	1
820	3.1	1	2.5	1
824	2.9	2	3.0	2
826	3.5	2	3.4	2
838	4.6	4	3.5	3
886	2.8	1	2.5	2

Tabla 9. Análisis de varianza y prueba de Tukey para el radio de crecimiento (cm) de *M. citricolor* y *Fusarium sp.* (Datos al sexto día)⁷

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fusarium sp	Between Groups	19,585	23	,852	29,125	,000
	Within Groups	2,105	72	2,924E-02		
	Total	21,690	95			
M. citricolor	Between Groups	48,127	23	2,092	21,795	,000
	Within Groups	6,913	72	9,601E-02		
	Total	55,039	95			

a) Prueba de Tukey (5%) para los radios de crecimiento de *M. citricolor*

Tukey HSD ^a		Subset for alpha = .05							
HYPOCREA	N	1	2	3	4	5	6	7	8
247,00	4	2,5000							
801,00	4	2,5500							
519,00	4	2,6750	2,6750						
488,00	4	2,7000	2,7000	2,7000					
185,00	4	2,7500	2,7500	2,7500					
886,00	4	2,8250	2,8250	2,8250	2,8250				
824,00	4	2,8750	2,8750	2,8750	2,8750				
486,00	4	2,9000	2,9000	2,9000	2,9000				
497,00	4	2,9250	2,9250	2,9250	2,9250				
245,00	4	3,0000	3,0000	3,0000	3,0000				
820,00	4	3,1000	3,1000	3,1000	3,1000	3,1000			
261,00	4	3,1000	3,1000	3,1000	3,1000	3,1000			
498,00	4		3,4750	3,4750	3,4750	3,4750	3,4750		
826,00	4			3,5250	3,5250	3,5250	3,5250		
572,00	4			3,5250	3,5250	3,5250	3,5250		
47,00	4				3,6500	3,6500	3,6500	3,6500	
244,00	4					3,8750	3,8750	3,8750	3,8750
186,00	4						4,2000	4,2000	4,2000
251,00	4						4,2500	4,2500	4,2500
304,00	4							4,4250	4,4250
473,00	4							4,4250	4,4250
524,00	4							4,4750	4,4750
838,00	4								4,5500
,00	4								4,6000
Sig.		,498	,072	,052	,052	,097	,097	,052	,169

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000

⁷ En todos los casos el código 0 corresponde al control. Los nombres científicos no se encuentran en itálica por limitaciones del programa estadístico utilizado.

b) Prueba de Tukey (5%) para los radios de crecimiento de *Fusarium sp*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
245,00	4	2,4000					
47,00	4	2,4500					
486,00	4	2,5000					
820,00	4	2,5000					
886,00	4	2,5000					
251,00	4	2,5250					
488,00	4	2,5250					
185,00	4	2,5750	2,5750				
497,00	4	2,6000	2,6000	2,6000			
801,00	4	2,6000	2,6000	2,6000			
186,00	4	2,6750	2,6750	2,6750			
247,00	4	2,6750	2,6750	2,6750			
572,00	4		3,0250	3,0250	3,0250		
824,00	4			3,0500	3,0500	3,0500	
261,00	4				3,3250	3,3250	3,3250
826,00	4				3,3500	3,3500	3,3500
244,00	4				3,4500	3,4500	3,4500
498,00	4				3,4500	3,4500	3,4500
524,00	4				3,4750	3,4750	3,4750
473,00	4				3,4750	3,4750	3,4750
,00	4					3,5000	3,5000
838,00	4					3,5000	3,5000
519,00	4						3,6000
304,00	4						3,6250
Sig.		,817	,059	,059	,059	,059	,685

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000

ANEXO III

Análisis estadístico del efecto de los metabolitos no volátiles producidos por *Hypocrea sp.* sobre los hongos fitopatógenos en medio líquido.

Tabla I0. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de *Hypocrea sp* producidos en el medio Czapeck - Dox, extracción por microfiltración para *M. citricolor* y *Fusarium sp.* (Datos al día 6 de montado el ensayo)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
M. citricolor Extracto Filtrado, Medio CD	Between Groups	6,211	13	,478	9,421	,000
	Within Groups	1,420	28	5,071E-02		
	Total	7,631	41			
Fusarium sp Extracto Filtrado Medio CD	Between Groups	13,052	13	1,004	21,406	,000
	Within Groups	1,313	28	4,690E-02		
	Total	14,366	41			

a) Prueba de Tukey (5%) para el diámetro de crecimiento de *M. citricolor*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
820	3	5,6000		
247	3	6,2667	6,2667	
251	3		6,4000	
185	3		6,4333	
824	3		6,5000	6,5000
838	3		6,5000	6,5000
497	3		6,6000	6,6000
801	3		6,6000	6,6000
245	3		6,7667	6,7667
0	3		6,8000	6,8000
524	3		6,9000	6,9000
261	3		6,9333	6,9333
488	3			7,1333
519	3			7,1667
Sig.		,054	,054	,054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000

b) Prueba de Tukey (5%) para evaluar el diámetro de crecimiento de *Fusarium sp.*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
820	3	2,7333			
488	3		3,9000		
824	3		4,3000	4,3000	
245	3		4,4000	4,4000	
801	3		4,4667	4,4667	4,4667
185	3		4,5333	4,5333	4,5333
524	3			4,6000	4,6000
497	3			4,6000	4,6000
519	3			4,6667	4,6667
0	3			4,7667	4,7667
261	3			4,8000	4,8000
247	3			4,8333	4,8333
838	3			4,9333	4,9333
251	3				5,0667
Sig.		1,000	,060	,060	,090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000

Tabla 11. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* producidos en el medio Czapeck - Dox, extracción por autoclavado para *M. citricolor* y *Fusarium sp.* (Datos al día 6 de montado el ensayo)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fusarium sp Autoclavado Medio CD	Between Groups	5,850	15	,390	13,276	,000
	Within Groups	,940	32	2,937E-02		
	Total	6,790	47			
M. citricolor Autoclavado Medio CD	Between Groups	9,725	15	,648	18,305	,000
	Within Groups	1,133	32	3,542E-02		
	Total	10,858	47			

a) Prueba de Tukey (5%) para evaluar el diámetro de crecimiento de *M. citricolor*.

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
245	3	5,0000			
244	3		5,8333		
473	3		6,1667	6,1667	
826	3			6,4333	6,4333
247	3			6,5000	6,5000
801	3			6,5000	6,5000
497	3			6,5333	6,5333
185	3			6,5667	6,5667
820	3			6,5667	6,5667
886	3			6,5667	6,5667
47	3			6,6000	6,6000
488	3			6,6000	6,6000
304	3			6,6333	6,6333
0	3				6,8000
824	3				6,8000
572	3				7,0000
Sig.		1,000	,710	,209	,052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000

b) Prueba de Tukey (5%) para evaluar el diámetro de crecimiento de *Fusarium sp.*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
304	3	4,0000				
47	3	4,4000	4,4000			
572	3	4,4333	4,4333			
244	3	4,4667	4,4667			
826	3	4,5000	4,5000	4,5000		
185	3		4,5333	4,5333		
820	3		4,5333	4,5333		
824	3		4,5333	4,5333		
488	3		4,5667	4,5667		
245	3		4,6000	4,6000		
497	3		4,7000	4,7000	4,7000	
0	3		4,7667	4,7667	4,7667	
801	3		4,8333	4,8333	4,8333	
473	3			5,0000	5,0000	
886	3				5,2000	5,2000
247	3					5,5667
Sig.		,068	,187	,068	,068	,420

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000

Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* producidos en papa dextrosa agar, extracción por microfiltrado para *M. citricolor* (Datos al día 6 de montado el ensayo)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
M. citricolor	Between Groups	2,009	5	,402	4,888	,011
Extracto Filtrado Medio PDA	Within Groups	,987	12	8,222E-02		
Total		2,996	17			

a) Prueba de Tukey (5%) para el diámetro de crecimiento de *M. citricolor*.

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
185	3	4,4333	
251	3	4,9667	4,9667
245	3	5,0000	5,0000
0	3		5,2667
488	3		5,3000
486	3		5,4667
Sig.		,223	,332

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000

Tabla 13. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* producidos en el medio PDA, extracción por microfiltrado para *Fusarium sp.* (Datos al día 6 de montado el ensayo)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fusarium sp Extracto	Between Groups	,366	6	6,095E-02	,785	,596
Filtrado Medio PDA	Within Groups	1,087	14	7,762E-02		
Total		1,452	20			

a) Prueba de Tukey (5%) para el diámetro de crecimiento de *Fusarium sp.*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05
		1
801	3	3,4667
488	3	3,6667
0	3	3,7000
486	3	3,7000
185	3	3,7667
251	3	3,8000
245	3	3,9333
Sig.		,428

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean
Sample Size = 3,000

Tabla 14. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* producidos en el medio PDA, extracción por autoclavado para *M. citricolor* (Datos al día 6 de montado el ensayo)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
M. citricolor Extracto Autoclavado Medio PDA	Between Groups	1,000	8	,125	1,156	,376
	Within Groups	1,947	18	,108		
	Total	2,947	26			

a) Prueba de Tukey (5%) para el diámetro de crecimiento de *M. citricolor*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05
		1
247	3	4,6000
497	3	4,7667
820	3	4,7667
886	3	4,7667
488	3	4,8000
251	3	4,8333
185	3	5,0333
486	3	5,0667
0	3	5,2667
Sig.		,301

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean
Sample Size = 3,000

Tabla 15. Análisis de varianza para evaluar el efecto de los extractos de *Hypocrea sp.* medio PDA, extracción por autoclavado para *Fusarium sp.* (Datos al día 6 de montado el ensayo)

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fusarium sp Extracto Autoclavado Medio PDA	Between Groups	1,245	9	,138	3,030	,019
	Within Groups	,913	20	4,567E-02		
	Total	2,159	29			

a) Prueba de Tukey (5%) para el diámetro de crecimiento de *Fusarium sp.*

Tukey HSD^a

HYPOCREA	N	Subset for alpha = .05
		1
185	3	3,2667
486	3	3,3000
488	3	3,4667
245	3	3,5000
251	3	3,5000
0	3	3,7000
886	3	3,7333
497	3	3,8000
247	3	3,8333
820	3	3,8333
Sig.		,089

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean
Sample Size = 3,000