

## EFFECTO DE LA METRIBUZINA SOBRE EL CRECIMIENTO “in vitro” DE *Trichoderma harzianum*

### Effect of Metribuzina on growth “in vitro” of *Trichoderma harzianum*

José Azabache-Asmat<sup>1</sup>, Juan Wilson-Krugg<sup>2</sup>, Lilian Ramos-Quezada<sup>1</sup>, Jorge Flores-García<sup>1</sup>

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo<sup>1</sup>  
joseca.aa@gmail.com<sup>1</sup>, jwkrugg@outlook.com<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de metribuzina sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum* en condiciones de laboratorio. Se trabajó con cinco concentraciones de metribuzina: 600, 660, 720, 780 y 840 ppm, además del control 0 ppm. Para evaluar el efecto del herbicida sobre el crecimiento se incorporó metribuzina en agar Sabouraud, el cual fue servido en placas petri con la finalidad de obtener las concentraciones referidas; por transferencia directa se sembró una porción de micelio de *T. harzianum* y se incubó a 25°C por un período de 4 días. La recolección de datos se realizó midiendo cada seis horas los radios de crecimiento (mm) obtenidos en cada uno de los ensayos, el menor valor promedio de crecimiento de micelio fue de 10.94 mm. que corresponde a la concentración de 840 ppm. Con estos datos se obtuvieron las curvas de crecimiento, velocidad de crecimiento y porcentajes de crecimiento correspondientes a cada una de los ensayos. Estadísticamente se determinó que no existe diferencia significativa en los valores de radios de micelio correspondientes a cada uno de los cinco ensayos problema (excepto el control), finalmente se concluye que bajo estas condiciones en laboratorio este controlador biológico es susceptible a la metribuzina.

**Palabras clave:** Controlador biológico, herbicida, *Trichoderma harzianum*, metribuzina.

### ABSTRACT

The effect of various concentrations of metribuzin on the growth of *Trichoderma harzianum* was determined under laboratory conditions. The work was conducted with five concentrations of metribuzin: 600, 660, 720, 780 and 840 ppm, aside from the 0 ppm control. To evaluate the effect of the herbicide on growth, metribuzin was incorporated into Sabouraud Agar, which was placed in petri plates, in order to obtain the above-mentioned concentrations; a portion of *T. harzianum* mycelium was seeded by direct transfer and was incubated at 25°C for a period of 4 days. The collection of data was carried out by measuring every six hours the growth radii (mm) obtained in each of the tests, the smallest average growth value of mycelium was 10.94 mm., which corresponds to the concentration of 840 ppm. The growth curves, growth rates and growth percentages corresponding to each of the tests were obtained with these data. Statistically, it was determined that there does not exist a significant difference among the values for the radii corresponding to each of the five problem tests (except the control one). Finally, the conclusion is that, under these laboratory conditions, this biological controller is susceptible to metribuzin.

**Key words:** Biological controller, herbicide, *Trichoderma harzianum*, metribuzin.

Recibido: 30 de Diciembre de 2013

Aceptado: 07 de Julio de 2014

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nemátodos u hongos, constituyen la mayoría de pérdidas en la producción agrícola tanto en cosecha como en post cosecha<sup>1,2</sup>, además las denominadas “malas hierbas”, también constituyen un problema que afecta el rendimiento de diversos cultivos<sup>3</sup>. La manera tradicional de mejorar el rendimiento en los cultivos se basa en el empleo de compuestos químicos para controlar plagas a niveles que no causen daños económicos a los cultivos<sup>4</sup>. Un tipo de plaguicida son los herbicidas, los cuales afectan el desarrollo o la actividad vital de las malezas mediante el ataque a una o más de sus funciones vitales, obteniendo como resultado la muerte de los mismos. Uno de los herbicidas uso frecuente es la metribuzina, esta se emplea para eliminar una variedad de malezas considerándosele uno de los herbicidas con más amplio espectro. Sin embargo, los herbicidas pueden convertirse en un serio problema para el agricultor y la sociedad, ya que toda sustancia química usada en la agricultura puede provocar un efecto negativo en el ambiente si es mal aplicada o utilizada en altas dosis, pudiendo causar el uso prolongado de un mismo plaguicida problemas de resistencia, fenómeno que consiste en la aparición de biotipos tolerantes de una especie anteriormente controlada por un plaguicida<sup>5</sup>.

El control biológico es una alternativa al uso exclusivo de productos químicos. Este tipo de control consiste en el control de las plagas mediante la utilización de enemigos naturales con la finalidad de mantenerlas por debajo de los niveles de daño económico; Baker y Cook definen el control biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, esto se puede lograr de forma natural o través de la manipulación del medio ambiente, hospedero, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas<sup>6</sup>, pudiéndose emplear como controladores biológicos a diversos organismos, destacando

entre ellos los hongos.

Muchas especies saprofitas de hongos, son antagonistas de importantes plagas, incluyendo los organismos patógenos de las plantas, malas hierbas e insectos. La mayoría de ellos pueden desarrollarse fácilmente en medios de cultivos de forma que pueden ser producidas en grandes cantidades para ser liberados, principalmente como esporas o fragmentos de micelio en el medio ambiente. Las especies *T. harzianun*, *T. viride* y *T. virens* son las más efectivas en controlar diversas especies de hongos fitopatógenos de suelo que son de importancia agrícola y económica<sup>7</sup> encontrándose entre ellos a los géneros *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Pseudoperonospora*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Venturia*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Scletorium*, *Pythium* y *Fusarium*<sup>8</sup>. Los mecanismos de acción que presenta *Trichoderma* son micoparasitismo, competición, y antibiosis, los que no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos y la importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja de antagonista-patógeno y de las condiciones ambientales<sup>9,10</sup>. La forma común que tiene *Trichoderma* de controlar a otros hongos es el parasitismo directo, además secreta celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas que ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped, facilitando la inserción de estructuras especializadas de *Trichoderma*, las que se encargan de absorber los nutrientes del interior del hongo del huésped, finalmente el micelio del hongo parasitado queda vacío y con perforaciones<sup>11</sup>. A esto se suma la producción de antibióticos que inhiben el desarrollo de otros hongos o bacterias que compiten por nutrientes y espacio. Esta competencia es una forma efectiva de evitar el crecimiento de otros patógenos, sin embargo, para lograr una competencia efectiva, es necesario que *Trichoderma* colonice primero o al mismo tiempo que el patógeno<sup>11, 12</sup>. Borrero y Silva concluyeron en su investigación que las cepas

de *T. harzianum* y *T. viride*, presentaron gran capacidad antagonista por su alta velocidad de crecimiento, demostraron ser unos organismos altamente agresivos en cuanto a la competencia por espacio inhibieron el crecimiento de los hongos, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. repens*, *Mucor petrinsularis* y *Rhizopus cohnii*; y las bacterias, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*<sup>13</sup> Castaño en su investigación evaluó la capacidad antagonista de 6 aislamientos de *Trichoderma* (T3, Tsp5, Tv1, Tc1 y T235), frente a *Rhizoctonia solani*, obteniendo altos porcentajes de inhibición micelial<sup>14</sup>. Sin embargo como todo plan de manejo integrado de plagas, el control biológico no es el único tipo de control que se aplica en los campos de cultivo, es por ello que se requieren estudios acerca de la compatibilidad de los microorganismos biocontroladores frente a los compuestos químicos; a nivel local se realizaron diversos trabajos de investigación referidos a esta problemática, Zumarán<sup>15</sup>, determinó el efecto *in vitro* de concentraciones de metribuzina sobre el crecimiento y germinación de *Paecilomyces lilacinus*, obteniendo que a mayor concentración de metribuzina (960 ppm), menor fue el porcentaje de germinación y el crecimiento de *P. lilacinus*. Sánchez<sup>16</sup>, determinó el efecto de diferentes concentraciones de metribuzina sobre el crecimiento y germinación de *T. viridae*, en condiciones de laboratorio, obteniendo que a mayor concentración (960 ppm), menor fue el porcentaje de germinación y el crecimiento de *T. viride*. A pesar que *T. viride* no desarrolló en las mayores concentraciones de herbicida evaluadas, se sabe que posee “resistencia” innata a la mayoría de agroquímicos, incluyendo a los fungicidas. No obstante, el nivel de susceptibilidad difiere entre cepas. Es por esto que algunas líneas son seleccionadas por ser menos susceptibles a agroquímicos específicos<sup>17, 18</sup>. En este contexto el presente trabajo tiene por finalidad determinar el efecto “*in vitro*” de metribuzina sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum* debido a que aún no se conoce el comportamiento de este

importante controlador biológico cuando es confrontado *in vitro* con este herbicida; los resultados que se obtengan permitirán conocer, la susceptibilidad, por parte del hongo, frente a concentraciones de metribuzina aplicables en campo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material de estudio.

- 1.1. Cultivo puro de *Trichoderma harzianum* proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.
- 1.2. Herbicida metribuzina, bajo el nombre comercial de Sencor® (Bayer).

### 2. Procedimiento.

#### 2.1. Reactivación de los cultivos de *T. harzianum*.

Esporas de *T. harzianum* conservadas en refrigeración, fueron cultivadas en placas de Petri conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa al 4%, y se incubó a 25°C, a este cultivo se realizó la identificación cultural y microscópica para la identificación de *T. harzianum*.

#### 2.2. Evaluación del efecto de la metribuzina sobre el crecimiento de *T. harzianum*.

Modificación de la técnica según Zumarán<sup>15</sup>.

##### 2.2.1. Preparación del medio de cultivo con metribuzina

Se preparó Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) al 4% en seis matraces conteniendo 100 mL de medio, se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar a 50°C aproximadamente, luego a cinco matraces se adicionó metribuzina en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 840, 780, 720, 660, 600 ppm, el matraz restante no se le agregó el herbicida a

fin de utilizarlo como testigo (0 ppm), luego el medio de cultivo fue servido en placas de Petri estériles (cinco placas por cada concentración).

### 2.2.2. Siembra e incubación de cultivos.

A partir del cultivo reactivado, mediante transferencia directa, se sembró micelio en la parte central de placas de Petri conteniendo ASD al 4%, de acuerdo a su correspondiente concentración de metribuzina. Luego se dejó incubar a temperatura ambiente. Todas las placas fueron incubadas a temperatura ambiental (23°C como promedio) durante 4 días.

### 2.2.3. Lectura.

A partir de las 24 horas de siembra de *T.harzianum* y hasta las 90 horas, se midió el radio de crecimiento (mm.) en diferentes direcciones, cada 6 horas, con lo cual se obtuvo un radio promedio de crecimiento de cada una de las concentraciones de metribuzina evaluadas. Posteriormente se construyeron curvas de crecimiento para las diferentes concentraciones de metribuzina, determinándose la velocidad de crecimiento.

## 2.3. Análisis de datos.

El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007, en base a la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA) y a la prueba de Comparaciones Múltiples mediante el método de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) y de esta manera se comparó las medias de los valores de crecimiento obtenidos para cada concentración de metribuzina.

## RESULTADOS

La Fig. 1, muestra las curvas de crecimiento (mm.) de *T. harzianum* a concentraciones de 0, 600, 660, 720, 780 y 840 ppm durante el 90

horas, se observa diferencias entre la curva de crecimiento del control y las curvas de crecimiento experimentales.

La Fig. 2, muestra los valores de velocidad de crecimiento, la mayor velocidad de crecimiento (1.044 mm/h) lo presentó el control y la menor velocidad de crecimiento (0.1335 mm/h) corresponde al ensayo con una concentración de 840 ppm de metribuzina.

La Fig. 3, representa el porcentaje de crecimiento alcanzado por *T. harzianum*, se tomó como referencia de 100 % al crecimiento obtenido por el control, mientras que los porcentajes de las otras concentraciones presentaron una tendencia decreciente; el menor porcentaje de crecimiento 18.97% correspondió al crecimiento obtenido en la concentración de 840 ppm.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de *Trichoderma harzianum*, indican que el efecto de la metribuzina sobre la curva y velocidad de crecimiento de este, tiende a ser decreciente conforme se incrementa las concentraciones de metribuzina (600, 660, 720, 780, 840ppm) a comparación del control (0 ppm). (Figuras 1 y 2); esto concuerda con lo reportado por Araujo<sup>19</sup>, Zumarán<sup>15</sup> y Sánchez<sup>16</sup> quienes encontraron que la metribuzina a distintas concentraciones ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos tales como *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma viride* respectivamente. Los resultados expresados como porcentaje de crecimiento (Figura 3), se analizaron estadísticamente, determinando que no existe diferencia significativa para las concentraciones en evaluación (600, 660, 720, 780 y 840 ppm), en cambio al ser comparada cada una de estas concentraciones con el control, se determinó que sí existe diferencia significativa; esto indica que el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, fue el mismo a pesar de emplear metribuzina a menor concentración, 600 ppm así como a mayor concentración de 840 ppm.

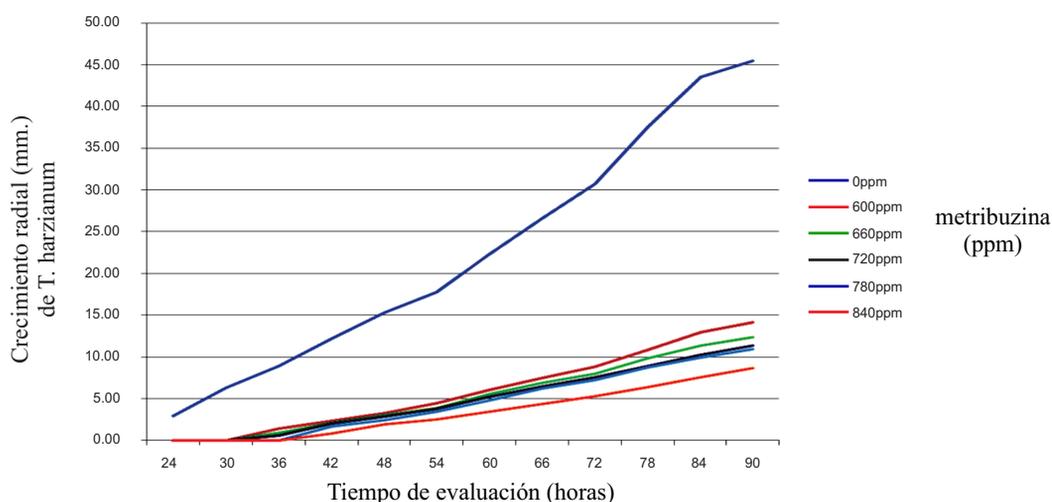


Fig. 1. Crecimiento de *T. harzianum*, para cada concentración de metribuzina evaluada, durante 90 horas.

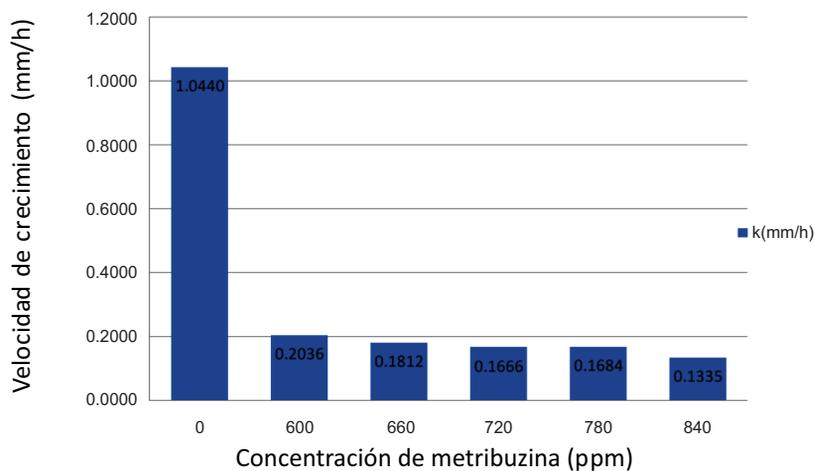


Fig. 2. Valores de velocidades de crecimiento de *T. harzianum* a diferentes concentraciones de metribuzina

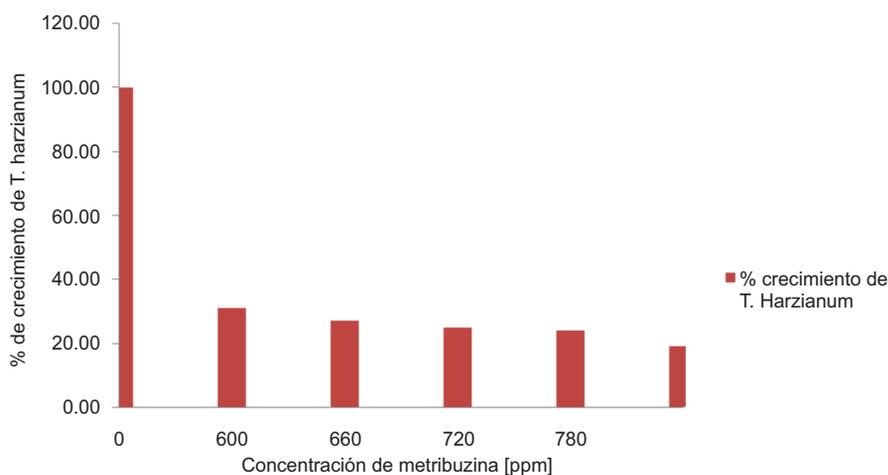


Fig. 3. Porcentajes de crecimiento de *T. harzianum*, a diferentes concentraciones de metribuzina durante 90 horas.

a:  $p < 0.05$ : Si existe diferencia significativa.  
 b:  $p > 0.05$ : No existe diferencia significativa.

Debido a que existe escasa información de cómo la metribuzina interfiere en la velocidad de crecimiento y por ende en el crecimiento de *T. harzianum*, los resultados obtenidos se explicarán en base a la estructura química de la metribuzina, a características fisiológica de hongos, e investigaciones relacionadas.

La metribuzina pertenece al grupo químico de las triazinas asimétricas, las triazinas son consideradas dentro del grupo de los inhibidores clásicos de la fotosíntesis<sup>17</sup>; su acción es bloquear el flujo de electrones del fotosistema II de la fotosíntesis mediante el acoplamiento de sus moléculas en el nicho que deja la plastoquinona Q<sub>B</sub> (esto detiene la fijación de CO<sub>2</sub>, la producción de ATP y NADH<sub>2</sub><sup>19</sup>), al aceptar electrones donados por la Q<sub>A</sub> y no poder la clorofila transferir la energía que sigue absorbiendo por la presencia de luz, queda excitada y reacciona con el O<sub>2</sub> molecular, formando un oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>); este último más la clorofila excitada destruyen los lípidos de las membranas celulares, dejando escapar el contenido celular hacia los espacios intercelulares ocasionado la muerte de la planta<sup>20</sup>.

*T. harzianum* no realiza procesos fotosintéticos, pero también realiza procesos en los cuales existe transporte de electrones y por lo tanto procesos de óxido reducción, estos sistemas se detallarán brevemente. Para los hongos el sustrato comúnmente oxidado es la glucosa<sup>21</sup>, los azúcares o sus derivados se degradan inicialmente por una de las tres vías que en conjunto se denominan glucólisis: la vía de Embden Myerhof-Parnas(EM), la vía de la hexosa monofosfato(HM) y la vía de Entner-Doudoroff(ED)<sup>22</sup>. Un producto final importante de estas tres vías es el ácido pirúvico que en condiciones oxidativas normales, éste se convierte en acetil coenzima A y entra al Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC). A partir de la glucólisis y del ciclo ATC se forma muy poco ATP, por el contrario se producen coenzimas reducidas como NADH<sub>2</sub> y NADPH<sub>2</sub> a partir de sus equivalentes oxidados y se obtiene energía cuando estas

coenzimas vuelven a oxidarse al transferir sus electrones (y iones hidrógenos asociados) a lo largo las vías respiratorias<sup>22</sup>.

El funcionamiento de la cadena transportadora de electrones se logra comprender con la ayuda de ciertos compuestos químicos que las afectan, se denominan inhibidores los cuales bloquean el flujo de electrones y por tanto la síntesis de ATP e incluyen el monóxido de carbono (CO), que previene la reducción de O<sub>2</sub> hasta agua por oxidasas tipo aa<sub>3</sub> y también incluyen al cianuro (CN<sup>-</sup>), ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) o ácido sódica (N<sub>3</sub><sup>-</sup>), estos se unen fuertemente a los citocromos y bloquean el transporte de electrones<sup>23</sup>.

La inhibición o el bloqueo del transporte de electrones en la fotosíntesis o en la cadena respiratoria es un modo de acción común de diversos compuestos químicos usados para el control de malezas u hongos fitopatógenos<sup>24</sup>. De esta manera así como la metribuzina bloquea el transporte de electrones del fotosistema II en las plantas, existen diversos fungicidas que bloquean el transporte de electrones en la cadena respiratoria de los hongos<sup>25</sup>; entre estos fungicidas, destaca la Fenamidona, un fungicida muy activo contra un amplio rango de oomycetos parásitos como *Plasmopara vitícola*, *Phytophthora infestans* y varias especies de *Peronospora*<sup>26</sup>. Este fungicida presenta una fórmula estructural similar a la metribuzina y su modo de acción es el bloqueo del transporte de electrones a nivel del citocromo Q<sub>0</sub> (ubiquinona) del complejo III de la cadena respiratoria<sup>27</sup>.

Se debe tener presente que el crecimiento de *T. harzianum* está relacionado con las fases del ciclo celular, estas son cuatro G1 (primera fase de crecimiento), S (síntesis de DNA), G2 (segunda fase de crecimiento) y M (mitosis); la duración del ciclo se puede hacer variar ampliamente dentro de ciertos límites (por ejemplo: mediante la regulación del suministro de glucosa), y es extraordinario que la variación de la duración ocurra principalmente, si no es únicamente, en la fase G1 mientras que S, G2 y M transcurran dentro

de un intervalo de tiempo constante. Esto ha dado lugar al concepto de “inicio”; la célula sólo entra en la fase S cuando se ha acumulado suficiente material (durante G1) para completar el ciclo<sup>22</sup>; acerca de esto podemos mencionar la investigación de Flores<sup>28</sup> quién determinó el efecto que ejerce la metribuzina sobre organismos no diana para este herbicida, “efectos de los herbicidas metribuzina y ametrina (triazinas) sin y con activación metabólica vegetal *in vivo* sobre la cinética del ciclo celular y el índice mitótico en linfocitos humanos en cultivo”; obtuvo lo siguiente, a partir de concentraciones 0.3 a 1 mg/L se registró incremento en la frecuencia de células metafásicas de tercera división al compararlo con el testigo negativo, así mismo, no se encontraron células en metafase ni en otra fase de la división de los linfocitos sino sólo células no estimuladas a partir de 1.5 mg/L (concentración menor a la empleada en el presente estudio)

Por lo mencionado anteriormente, que tanto la metribuzina como la fenamidona tienen como sitios de acción a las moléculas de quinona (coenzima Q) interfiriendo en el transporte de electrones de la fotosíntesis y de la cadena respiratoria respectivamente, se podría proponer que la metribuzina haya actuado de manera similar que la fenamidona, bloqueando el transporte de electrones en la cadena respiratoria de *T. harzianum*. De este modo, influye en la prolongación del tiempo de duración de la fase S, dado que si no existe un normal proceso de respiración entonces tampoco se obtendrá los intermediarios y productos necesarios para continuar el ciclo celular. Como consecuencia de ello se ve disminuida la velocidad de crecimiento y con ello el crecimiento radial de micelio, también se debe considerar que en el efecto biocontrolador de este hongo están considerados la actividad de elementos tales como enzimas, B (1,3)-glucanasa, quitinasa además de ciertos antibióticos<sup>29</sup> y cada uno de estos son producidos en el metabolismo secundario, por lo tanto si no se realiza adecuadamente el metabolismo primario,

como consecuencia se altera la producción de los elementos antes descritos y por lo tanto el efecto antagónico de *T. harzianum*.

Es importante mencionar la disminución de los valores de velocidad de crecimiento hasta una quinta parte (600 ppm), en comparación al mejor valor de velocidad de crecimiento encontrada (0 ppm) (Fig. 3), esto se debería a que los hongos son capaces de adaptarse y generar cierto grado de “resistencia” para este herbicida, ya que son naturalmente resistentes a muchos compuestos tóxicos incluyendo herbicidas, fungicidas y pesticidas tales como el DDT y compuestos fenólicos<sup>11</sup>. El mecanismo que permite el crecimiento de *T. harzianum* puede estar asociada a sistemas de transporte ABC<sup>30</sup>.

Dado que en nuestro medio el uso y la libre comercialización de la metribuzina están permitidos<sup>31</sup> se debe tener presente que en una aplicación de MIP que involucre a *T. harzianum* y al herbicida, resultaría más provechoso que la aplicación de metribuzina sea posterior a la del hongo, asegurando un tiempo suficiente para el desarrollo de este controlador y de esta manera ambos controladores podrían ejercer su mejor efecto.

Finalmente, los resultados expuestos en el presente trabajo de investigación, son válidos solo en condiciones de laboratorio, siendo necesario realizar evaluaciones en campo para lo cual se debe tener presente factores como pH, temperatura, tipo de suelo, flora microbiana; así mismo sería conveniente evaluar la persistencia de la metribuzina en los suelos de nuestra región ya que según Bordjiba y col.<sup>17</sup>, ésta también puede variar por los factores ambientales antes mencionados.

## CONCLUSIONES

La metribuzina ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Trichoderma harzianum* en condiciones de laboratorio.

A mayor concentración de metribuzina, en el rango de 600 a 840 ppm, *T. harzianum* presenta un crecimiento decreciente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol.* 1985; 23: 23-54.
2. Benitez T, Delgado J, Rincon R, Limon MC. Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (Ed.) *Recent Research Developments in Microbiology.* Trivandrum, India, Research Signpost. 1998; 2:129-150.
3. Loayza J. Herbicidas. Boletín electrónico informativo sobre productos y residuos químicos. [Internet] 2007 [acceso 20 noviembre 2009] (24). Disponible en [http://www.unmsm.edu.pe/quimica/ing%20loayza/BOLETIN\\_24.pdf](http://www.unmsm.edu.pe/quimica/ing%20loayza/BOLETIN_24.pdf)
4. Fuenmayor M. Plaguicidas Microbianos. Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP [Internet] [acceso 20 junio de 2008]; disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd52/plaguicidas.htm>
5. Tabener A, Cirujeda A, Zaragoza C. Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas 100 preguntas sobre resistencias. [Internet]. Roma. FAO; 2007 [acceso 23 octubre de 2009]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1422s/a1422s00.pdf>
6. Baker, R, Cook, R. *Biological control of plant pathogens.* San Francisco USA, W. H. Freeman. 1974. 433 p.
7. Humeres, C. Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma spp.* sobre aislados de hongos basidiomycetes asociados a muerte de brazos en kiwi. Talca. Chile. [Internet] 2004 [acceso 9 noviembre 2008]. Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/retrieve/1544/CHumererV.pdf>
8. Hermosa, M. Caracterización molecular de cepas de *Trichoderma* utilizadas como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Madrid. España. 1998.
9. Lorito, M. Chylinolytic enzymes and their genes. En Kubicek, C. P. & Harman, G.E. (eds.), *Trichoderma and Gliocladium.* Vol. 2. Taylor and Francis, Londres. Inglaterra. 1998.
10. Gonzales, C.; Puertas A; Fonseca M ; Suárez E, Blaya R. Actividad antagónica de *Trichoderma spp.* Aislada de un suelo de la provincia Granma, Cuba frente a *Alternaria solani.* *Rev. Fac. Agron (luz).* 1999; 16: 167-173
11. Chet I, Ibar J, Hadar I. Fungal antagonist and mycoparasites. In Wicklow DT & Söndetöm B (Eds.) *the Mycota IV: Environmental and microbial relation ship,* New York, Springer Verlag, 1997; 165-192.
12. Harman, E., Kubicek C. *Trichoderma y Gliocladium.* Vol. 2 enzimas, control biológico y usos comerciales. Satre y Francis, Londres. Inglaterra. 1998.
13. Del Rosario S, Borrero, C. Efectos de *Trichoderma* (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase IV de piedemonte llanero. *Revista Orinoquia.* [Internet]. 2005. [acceso 4 julio 2008]; 9 (2). Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/896/89690202.pdf>
14. Tovar J, Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma spp.* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani.* [Internet]. Bogotá 2008. [Acceso 30 mayo 2009]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>
15. Zumarán, F. Efecto de diferentes concentraciones de metribuzina sobre la germinación y el crecimiento de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samsom, bajo condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo-Perú. 2005.

16. Sánchez, R. Efecto de diferentes concentraciones de metribuzina sobre la germinación y crecimiento de *Trichoderma viridae* (Persoon, froids) en condiciones de laboratorio. Tesis para optar el Título de Biólogo microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo-Perú. 2006.
17. Bordjiba O, Steiman O, Kadri M. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 2001; 30:418-426.
18. Anzalone, A., Vicente J. Evolución del carbono de la biomasa microbiana en un suelo tratado con metribuzina y cultivado con papa (*Solanun tuberosum* L.). *Bioagro.* 2002. 14; 2: 55-63.
19. Araujo, R. Efecto "in vitro", de diferentes concentraciones de metribuzina sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. Tesis para optar el Título de Biólogo microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo-Perú. 2006.
20. Jaramillo, A. Establecimiento de un banco de proteína de *Gliricidia sepium* y producción de grano de *Mucuna pruriens* como fuente de proteína para rumiantes. [Internet]. Honduras. 1997. [Acceso 17 febrero 2008]. Disponible en: [http://zamoto-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/1997/T732.pdf](http://zamoto-02.zamorano.edu/tesis_infolib/1997/T732.pdf)
21. Moore-Landecker. Fundamentals of the FUNGI. 3<sup>rd</sup> ediction. Prentice-Hall Inc. United State of America. 1990.
22. Deacon J.W. Introducción a la micología moderna. México: Editorial Limusa; 1990.
23. Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock. Biología de los microorganismos. 10<sup>a</sup> ed. Madrid: Pearson Educación (Prentice may); 2003.
24. Waller J, Lenné J; Waller, S. Plant Pathologist s. CABI publishing. CAB international. Wallingford. United Kingston. 2001.
25. Hewitt, G. Fungicides in crop portection. CABI Publishing. CAB International. Wallingford. United Kingston. 2000.
26. PMRA. Fenamidone Technical Fungicide, Reason 500 SC Fungicide. Health Canada's Pest Management Regulatory Agency. Regulatory Note - REG2003 -11. Ontario. Canada. 2003.
27. Neuburger, M., Beffa R, Villier A. Mode of action of fenamidone: Similarities and differences with know Q. I. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.* 2003; 3(56): 449-464.
28. Flores, S. Efectos de los herbicidas metribuzina y ametrina (triazinas) sin y con activación metabólica vegetal in vivo sobre la cinética del ciclo celular y el índice mitótico en linfocitos humanos en cultivo. *Revista Internacional de Contaminación ambiental [Internet].* 2000. [Acceso 19 enero 2009]. 16; 303: 127-137. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCv=37016305>
29. Aragon, L. *Rhizoctonia solani* Kuhn afectando al algodónero (*Gossypium barbadense* L.) Identificación de grupos de anastomosis de varias zonas algodóneras, control biológico y control químico. Tesis para la obtención del Grado de Magister of Science. Universidad Agraria La Molina. Lima. 2000.
30. Harman, G, Howell, Ch; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review.* 2004; 2: 43-56.
31. Caballero, C. Listado de Plaguicidas Agrícolas con registro vigencial al 31 de diciembre del 2008. *Diario Oficial El Peruano.* Lunes 09 de marzo del 2009. Pag. 392032, 392033.

**CORRESPONDENCIA:**

José Carlos Azabache Asmat

**Dirección:** Calle Francisco Bolognesi 414.

Moche. Trujillo.

**Teléfono celular :** 992725433**E-mail :** joseca.aa@gmail.com