

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma* spp.
ANTAGONISTAS DE *Dactylonectria macrodidyma*, *Macrophomina phaseolina*,
Neopestalotiopsis clavispora y *Rhizoctonia* sp.

por

Mateo Nicolás SÁNCHEZ SELGAS

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO
URUGUAY
2019

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. MSc. Pablo González

Ing. Agr. Dra. Elisa Silvera

Ing. Agr. Dr. Pedro Mondino

Fecha: 5 de diciembre de 2019

Autor: -----

Mateo Nicolás Sánchez Selgas

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Pablo González y Elisa Silvera, por todo el apoyo y compromiso para realización de este trabajo. También al grupo disciplinario del Laboratorio de Fitopatología por brindar apoyo cuando fue necesario.

A Alex Machín por estar siempre presente en actividades de laboratorio y dandome sugerencias para la realización de este trabajo.

Al personal de biblioteca, por su colaboración en la búsqueda de materiales, y aprobación de este trabajo.

A mi familia, sin ellos no estaría acá, por estar siempre y apoyarme en todo momento.

A María Auxiliadora y a su familia, por apoyarme, aconsejarme y darme siempre para adelante.

A amigos, compañeros de facultad, vecinos y gente de toda la vida por su apoyo.

Finalmente esta carrera se la dedicó a mi hermano José Carlos que en paz descansa.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	Página II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
 1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE FRUTILLA EN URUGUAY	2
2.2 ENFERMEDADES DE RAÍZ Y CORONA.....	3
2.2.1 <u>Patógenos en estudio</u>	3
2.2.1.1 <i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	3
2.2.1.2 <i>Cylindrocarpon</i> spp.....	4
2.2.1.3 <i>Rhizoctonia</i> spp.....	5
2.2.1.4 <i>Macrophomina phaseolina</i>	7
2.2.2 <u>Manejo de enfermedades de raíz y corona en frutilla</u>	8
2.3 USO DE <i>Trichoderma</i> spp. EN EL MANEJO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS.....	9
2.3.1 <u>Clasificación taxonómica</u>	10
2.3.2 <u>Mecanismo de biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp.</u>	11
2.3.3 <u>Métodos de selección de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.</u>	13
 3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	 15
3.1 COLECCIÓN DE AISLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp.....	15
3.2 COLECCIÓN DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA MUERTE DE PLANTAS DE FRUTILLA.....	15
3.3 EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE AISLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp.....	15
3.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	17
3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	17
3.5.1 <u>Extracción de ADN</u>	17
3.5.2 <u>Amplificación por PCR y secuenciación</u>	18
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
 4. <u>RESULTADOS</u>	 20
4.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL DE LOS PATÓGENOS EN CULTIVOS DUALES.....	20
4.2 EVALUACIÓN DEL GRADO DE ANTAGONISMO EN CULTIVOS	

DUALES.....	21
4.3 AISLADOS SELECCIONADOS.....	22
4.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	23
4.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	23
5. <u>DISCUSIÓN</u>	25
6. <u>CONCLUSIONES</u>	28
7. <u>RESUMEN</u>	29
8. <u>SUMMARY</u>	30
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	31

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Escala de evaluación del antagonismo <i>in vitro</i>	16
2. Características del cebador EF 1- α	18
3. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Dactylonectria macrodidyma</i> , <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> , <i>Rhizoctonia</i> sp. y <i>Macrophomina phaseolina</i> frente a los aislados de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
4. Grado de antagonismo de aislados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Dactylonectria macrodidyma</i> , <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> , <i>Rhizoctonia</i> sp. y <i>Macrophomina phaseolina</i>	22
5. Características morfológicas de las especies de <i>Trichoderma</i> ..	23
6. Identificación de los aislados de <i>Trichoderma</i> mediante secuencia parcial del gen EF1- α (factor de elongación).....	24

1. INTRODUCCIÓN

La producción de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Uruguay se concentra en dos zonas principales, en el Sur, comprende los departamentos de San José y Canelones, con una superficie de 84 hectáreas, en el litoral Norte, principalmente el departamento de Salto, con 46 hectáreas. Los rendimientos son de 19,7 y 35 toneladas por hectáreas respectivamente (MGAP. DIEA, 2017).

En los últimos años, una de las causas que afecta los rendimientos en la producción de frutilla en el litoral Norte del Uruguay, es la incidencia de enfermedades de raíz y corona. Según Machín (2017), los géneros *Neopestalotiopsis* sp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Cylindrocarpon* spp., *Macrophomina* sp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. están asociados a la muerte de plantas de frutilla en el departamento de Salto. Estos organismos se aislaron como único género presente o formando distintos complejos. Además, señala que por primera vez en Uruguay, las especies *Dactylonectria novozelandica* y *Dactylonectria macrodidyma* están asociadas a la muerte de plantas de frutilla.

El control de enfermedades producidas por patógenos habitantes de suelo se basa en el uso de fungicidad pero no se logra un control eficiente. Además, su uso irracional ha traído como consecuencias problemas de contaminación ambiental, presencia de residuos en los alimentos, poblaciones de patógenos resistentes, así como también daño a la salud de productores y consumidores (Albert, 2005).

En este contexto, aparece como opción viable el control biológico a través del uso de antagonistas. Diferentes cepas de hongos del género *Trichoderma*, han sido utilizadas como agentes de biocontrol para enfermedades de plantas causadas por patógenos de suelo y también de parte aérea, como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, entre otros.

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar y seleccionar *in vitro* cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista sobre *Neopestalotiopsis clavispora*, *Dactylonectria macrodidyma*, *Rhizoctonia* sp. y *Macrophomina phaseolina*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE FRUTILLA EN URUGUAY

El cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Uruguay se realiza en las zonas Sur y Litoral Norte. En la zafra 2014-2015 se plantaron 130 hectáreas, 84 en el Sur y 46 en el litoral Norte. Los rendimientos fueron de 19,7 y 35 toneladas por hectárea respectivamente (MGAP. DIEA, 2017).

En la zona Sur se concentra la producción a campo, que abastece el mercado en primavera-verano. El sistema de producción esta basado en cultivares extranjeros de día corto y día neutro, con plantas tipo “frigo” importadas en su mayoría de España, Estados Unidos y Chile. El cultivar más plantado es San Andreas, aunque todavía se plantan en menor superficie Aroma y Camino Real, también hay pequeñas áreas de cultivares de origen nacional (Giménez et al., 2015).

Los cultivares extranjeros se caracterizan por tener alta productividad, fruto atractivo en tamaño, color y forma. Sin embargo, carecen de un buen aroma y de sabor, por lo que no son preferidos por los consumidores. También son muy susceptibles a la mayoría de enfermedades de corona, hoja y frutos afectando negativamente el rendimiento del cultivo, ya que producen perdidas de plantas y frutos e implica un incremento de aplicaciones de fungicidas, con el correspondiente impacto en el ambiente y en la salud humana (Giménez et al., 2015).

Debido a esta problemática INIA liberó en el año 2015 el cultivar “INIA Mayte” (primer cultivar de frutilla de día neutro), el cual muestra altos niveles de resistencia de las enfermedades de raíz y corona, manchas foliares y problemas de frutos como antracnosis y oidio. Esto significa que el productor puede producir prácticamente sin la aplicación de fungicidas o restringirlas a un mínimo (Giménez y Vicente, 2017).

En la zona Norte predomina los cultivares nacionales de día corto, del programa de mejoramiento genético del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), como son INIA Yurí y INIA Guapa, se caracterizan por su aroma, sabor y productividad (INIA, 2016). Desde el año 2015 al 2017 se detectó una importante disminución del rendimiento, debido a una gran mortandad de plantas, producidas por hongos a nivel de raíz y corona (MGAP. DIGEGRA e IMM. CAMM 2015, 2017).

Dada está problemática, en el año 2016 INIA liberó el cultivar “INIA Ágata”, el cual presenta un destacado comportamiento frente a la mayoría de

las enfermedades de raíz y corona (Gimenéz y Vicente, 2017). En la actualidad es la variedad líder, sustituyendo a INIA Yuri, INIA Guapa y Festival. Un gran número de productores han sustituido a las variedades sensibles y un porcentaje menor ha instrumentado mejoras en la obtención de material vegetal sano (Vicente et al. 2018, 2019).

2.2 ENFERMEDADES DE RAÍZ Y CORONA

Las enfermedades de raíz y corona en cultivos comerciales de frutilla están presentes en todo el mundo. Existen numerosos relatos que asocian diferentes patógenos a esta patología: *Colletotrichum* spp. (Rebellato y Monteiro 1987, Paulus 1990, Freeman y Katan 1997, Santos y Romero 2002, Golzar et al. 2007); *C. acutatum* (Santos y Romero 1999, Embaby et al. 2010, 2012); *C. gloeosporioides* (Embaby et al. 2010, 2012); *C. boninense* (Bi et al., 2017a); *C. truncatum* (Bi et al., 2017b); *Phytophthora cactorum* (Rebellato y Monteiro 1987, Paulus 1990, Yang Sook et al. 1998, Golzar et al. 2007, Ghaderi 2012, Borrero et al. 2017); *Fusarium* spp. (Rebellato y Monteiro 1987, Hetman 2001, Durak 2014); *F. solani* (Pastrana et al., 2014); *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Hetman 2001, Golzar et al. 2007); *Pythium* spp. (Rebellato y Monteiro 1987, Golzar et al. 2007); *P. helicoides* (Ishiguro et al., 2014); *Phoma* spp. (Golzar et al., 2007); *Verticillium albo-atrum* (Rebellato y Monteiro, 1987); *V. dahliae* (Paulus 1990, Hetman 2001); *Lasiodiplodia theobromae* (Yildiz et al. 2014, Myeong Hyeon et al. 2016); *Gnomonia fragariae* (Morocko et al., 2006); *Chaetomium globosum* (Alam et al., 2017); *Macrophomina* spp. (Golzar et al., 2007); *M. phaseolina* (Zveibil y Freeman 2005, Avilés et al. 2008, Bains et al. 2011, Sharifi y Mahdavi 2011, Sánchez et al. 2013, Hajlaoui et al. 2015); *Neopestalotiopsis clavispora* (*Pestalotiopsis*) (Dung et al. 2016, Chamorro et al. 2016b, Hemelrijck et al. 2017, Obregón et al. 2018, Machín et al. 2019); *Rhizoctonia* spp. (Golzar et al., 2007); *R. solani* (Tanaka et al. 1995, Hetman 2001); *R. fragariae* (Rebellato y Monteiro 1987, Aziz y Marzani 2017); *Cylindrocarpon* spp. (Hetman 2001, Adhikari et al. 2013).

2.2.1 Patógenos en estudio

2.2.1.1 *Neopestalotiopsis clavispora*

En los últimos años *N. clavispora* (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous se reportó como patógeno produciendo la mortandad en cultivos comerciales de frutilla (Dung et al. 2016, Chamorro et al. 2016b, Hemelrijck et al. 2017, Obregón et al. 2018, Machín et al. 2019). El género *Neopestalotiopsis* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Xylariales y familia Sporocadaceae (NCBI, s.f.).

En medio papa dextrosa agar (PDA), las colonias *N. clavispora* son de color blanco, aspecto algodonoso, con círculos concéntricos y bordes ondulados, presenta acérvulos negros luego de diez días de crecimiento. Los acérvulos, se ubica principalmente en la zona central de la colonia. Los conidios son fusiformes rectos o ligeramente curvos (elipsoides), con cuatro septas (cinco células), las apicales y basales son hialinas y las tres células del medio son de color marrón. Los conidios presentan uno a dos apéndices basales (dos es menos común) y de dos a cinco apéndices apicales (mayoritariamente tres) (Dung et al. 2016, Chamorro et al. 2016b).

Recientemente se relató la presencia de este patógeno en cultivos de frutilla. Además, se lo identificó causando muerte de ramas en cultivos de arandanos (*Vaccinium corymbosum*, Borrero et al. 2008, Espinoza et al. 2008, González et al. 2012, Chen et al. 2016).

Según Dung et al. (2016), los síntomas que se observan comienzan con un secado en el borde de las hojas nuevas, que se extiende hasta la mitad del área de las mismas. Luego estos síntomas se visualizan en hojas viejas y si las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad, la planta se marchita y muere. Las plantas severamente infectadas tienen hojas y flores completamente secas y raíces negras. Estos síntomas se asocian a decoloración o áreas marrones necróticas en la corona y la raíz, lo que resulta en la muerte de la planta (Chamorro et al. 2016b, Obregón et al. 2018, Machín et al. 2019).

Las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad causada por *N. clavispora* son las bajas temperaturas y alta humedad relativa, acompañado de precipitaciones (Dung et al., 2016).

2.2.1.2 *Cylindrocarpon* spp.

Cylindrocarpon destructans (Zinssm.) Scholten se identificó como patógeno en plantas de frutilla en distintas regiones del mundo (Laugale et al. 2004, Manici et al. 2005, Fang et al. 2011b). El género *Cylindrocarpon* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Nectriaceae (NCBI, s.f.).

En medio PDA las colonias de *Cylindrocarpon* sp. presentan un crecimiento relativamente lento y gradualmente pasa de un color amarillo a pardo. Luego de siete días de crecimiento, se forman abundantes conidios, hialinos, en su mayoría rectos con ambos extremos redondeados, predominantemente con tres septas (Adhikari et al., 2013).

Las especies de *Cylindrocarpon* son habitantes comunes en el suelo, son importantes patógenos afectando a plantas herbáceas y leñosas, causando decaimiento y muerte de plantas principalmente jóvenes (Brayford 1993, Halleen et al. 2004, Lombard et al. 2014).

Los teleomorfos de *Cylindrocarpon* pertenecen a los géneros *Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* y *Thelonectria*, los que han sido asociados con la enfermedad del pie negro en plantas de vid (*Vitis* spp., Agustí-Brisach y Armengol 2013, Lombard et al. 2014, Carlucci et al. 2017).

Recientemente, se relató la presencia de pudrición negra de raíces en cultivos de frutilla y frambuesas, al norte de Alemania causada por *Dactylonectria torresensis* (Weber y Entrop, 2017). En Uruguay se determinó por primera vez que *Dactylonectria novozelandica* y *Dactylonectria macrodidyma* están asociadas a la muerte de plantas de frutilla (Machín, 2017).

Los síntomas producidos por *Cylindrocarpon* sp. en plantas de frutilla son un amarillamiento, marchitez de las hojas y una extensa necrosis en las raíces, afectando además a la corona (Adhikari et al., 2013).

Los géneros (*Campylocarpon*, *Cylindrocladiella*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Neonectria* y *Thelonectria*) producen fácilmente conidios y algunas especies también clamidosporas, los conidios se dispersan en el agua del suelo y las clamidosporas puede permitir que estos hongos sobrevivan en el suelo por largos periodo de tiempo (Petit et al., 2011).

La infección en plantas de vides se produce a través de heridas y aberturas naturales (Halleen et al., 2006). El sistema de reproducción de plantas de vid, mediante reproducción vegetativa, juega un papel importante en la dispersión de la enfermedad, pues *Cylindrocarpon* spp. puede diseminarse por este material (Rego et al., 2000). Las cantidades de plantas afectadas por este patógeno aumentan sustancialmente cuando la plantación se desarrolla en suelos pesados y/o pobremente drenados (Gubler et al., 2004).

2.2.1.3 *Rhizoctonia* spp.

Rhizoctonia spp. afecta en todo el mundo a distintos cultivos (anuales y perennes, Agrios, 2007). El género *Rhizoctonia* pertenece al reino Fungi, filo Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Cantharellales y familia Ceratobasidiaceae (NCBI, s.f.).

Las especies del género *Rhizoctonia* y particularmente *R. solani* J.G. Kühn (Teleomorfo: *Thanatephorus*) presenta un micelio estéril que es incoloro cuando pasa por su etapa juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro a medida que madura. El micelio presenta células largas y produce ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen una septa cerca de ella. Las ramificaciones en ángulo recto son características para identificar este tipo de hongo (Agrios, 2007). Generalmente se desarrollan esclerotos en la superficie de la colonia (Maas, 1998).

En medio PDA las colonias de *Rhizoctonia* spp. a 25 °C son de color blanco a marrón claro produciendo un micelio aéreo de rápido crecimiento (Zhong et al., 2016).

Rhizoctonia fragariae S.S. Husain & W.E. McKeen (Teleomorfo: *Ceratobasidium*) está implicado en el tizón de antena y pistilo, en la pudrición de fruta, pero es más importante como patógeno causando podredumbre de raíces. En colonias de *R. fragariae* se caracteriza por la falta de esclerotos y la presencia de numerosas cadenas de esporas moniliformes. Las células miceliales de *R. fragariae* son binucleadas, mientras que en *R. solani* son multinucleadas (Maas, 1998).

La pudrición de raíces en cultivos de frutilla, es causada por *R. fragariae*, la infección de este patógeno produce la podredumbre de raíces estructurales y absorbentes. Generalmente la infección se limita a la corteza y ocurre por penetración directa por las hifas (Maas, 1998).

Los síntomas producidos por *Rhizoctonia* spp. consisten en una podredumbre de color marrón oscura en la corona, que puede aparecer en cualquier parte de ella, la lesión se observa de manera entrante a la corona afectando además el sistema vascular en ese sitio. Las raíces también pueden ser afectadas, causando la enfermedad de podredumbre negra de las mismas (Giménez et al., 2003).

Las condiciones que predisponen al desarrollo de este patógeno son excesos de agua, así como los órganos de propagación infectados o contaminados. La temperatura óptima de infección se encuentra cerca de 15 a 18 °C, pero pueden mostrar mayor actividad a temperaturas más altas, a más de 35 °C (Agrios, 2007).

Esta enfermedad aparece asociada a suelos pesados, con escasa estructura e insuficiente drenaje. El momento de aparición es variable, pero se a

determinado que el problema se observa a fines de invierno y en primavera (Giménez et al., 2003).

2.2.1.4 *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. es un hongo habitante natural de suelo, agente causal de la pudrición carbonosa. La presencia de este patógeno se relató en varias parte del mundo afectando cultivos comerciales de frutilla (Mertely et al. 2005, Zveibil y Freeman 2005, Avilés et al. 2008, Koike 2008, Bains et al. 2011, Sharifi y Mahdavi 2011, Sánchez et al. 2013). El género *Macrophomina* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Botryosphaeriales y familia Botryosphaeriaceae (NCBI, s.f.).

En medio PDA las colonias de *M. phaseolina* producen micelio aéreo de color gris oscuro, luego de 7 días de crecimiento a 24 °C. Los cultivos puros mostraron micelio aéreo y abundantes esclerotos de forma esférica a irregular, los mismos presentan un tamaño de 62 a 217 µm de largo por 35 a 110 µm de ancho (107 x 71 µm promedio) (Avilés et al. 2008, Sánchez et al. 2013).

Este patógeno afecta a varios cultivos en el mundo, como girasol (*Helianthus annuus* L.), soja (*Glycine max* L.) Merrill), maíz (*Zea mays* L.), algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y más de 1300 hospederos incluyendo árboles, plantas ornamentales, hortalizas, pasturas, frutales, entre otros (Gómez et al., 2012).

Los síntomas consisten en necrosis del tejido vascular y cortical de las coronas de plantas de frutilla; el área afectada presenta color marrón-rojo a marrón oscuro (Hajlaoui et al., 2015). También presenta marchitez de las hojas viejas y posteriormente mueren, las hojas jóvenes se mantienen vivas, lo que causa un retraso en el crecimiento. Por lo general, estos síntomas aparecen después que las plantas se han instalado en el campo, al comienzo de la cosecha o cuando estén sometidas a un estrés, resultando en un colapso y muerte de la planta (Sánchez et al., 2016).

Macrophomina phaseolina sobrevive como esclerotos en los restos de plantas o en el suelo por más de tres años, constituyendo el inóculo inicial de la enfermedad (Short y Wyllie, 1978).

La pudrición carbonosa se ve favorecida cuando las plantas se desarrollan en condiciones de estrés hídrico y alta temperatura (Dhingra y Sinclair 1978, Sandhu et al. 1999, Fang et al. 2011a).

2.2.2 Manejo de enfermedades de raíz y corona en frutilla

En los cultivos comerciales de frutilla, el control de las enfermedades producidas por patógenos de suelos se basa en el uso de desinfectantes antes de implantar el cultivo (cloropicrina con 1,3 dicloropropeno, metan sodio y metan potasio), con el fin de disminuir el inóculo inicial (Sánchez et al., 2016).

El control de las enfermedades de plantas se debe implementar en un sistema de manejo integrado (Mondino et al., 2014). Estos sistemas utilizan el conocimiento generado sobre la biología de los patógenos, sobre la epidemiología y sobre las relaciones planta-patógeno-ambiente, para el diseño de estrategias racionales de control. Para llevar a cabo esto se deben priorizar medidas preventivas y se recurre al uso de variedades resistentes, métodos culturales y métodos biológicos, de forma de minimizar el uso de fungicidas (Mondino et al. 2014, Chamorro et al. 2015a, 2015b, 2016a, Sánchez et al. 2016).

Dentro de las medidas culturales, es importante tener un buen manejo del suelo, preparar con anticipación los cuadros de plantación, con canteros altos, y una correcta sistematización, para obtener buen drenaje, evitando el exceso de agua. Además, realizar aporte de materia orgánica, utilizar abonos verdes, mulch orgánico o nylon. Todas estas medidas permiten modificar el ambiente, para minimizar las condiciones para que ocurran estas enfermedades, y por lo tanto ayudan a disminuir su incidencia. Además se deben utilizar plantas libres de los patógenos evitando su ingreso al área del cultivo que contribuirán a no tener o disminuir la presencia de las enfermedades (Giménez et al., 2003).

Al fin del ciclo de cultivo se recomienda eliminar las plantas y frutos afectados, solarizar los cuadros del cultivo, ya sea solo o combinado con biofumigación, y rotar con cultivos no susceptibles. La implementación de estas medidas permitirá bajar la población de los hongos de suelos, interferir en los ciclos de los patógenos y como consecuencia obtener menores niveles de enfermedad (Giménez et al., 2003).

El control biológico se plantea como una herramienta viable, para el manejo de enfermedades de las plantas producidas por patógenos de suelo a través del uso de microorganismos benéficos (Mondino et al., 2014).

En la naturaleza existe control biológico, el cual consiste en una interacción continua entre patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos (Mondino y Vero, 2006).

Baker y Cook (1974), definen al control biológico como la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o del antagonista.

Según Mondino y Vero (2006), el control biológico es la introducción artificial de microorganismos antagonistas en el patosistema, para controlar al patógeno y favorecer a la planta, reduciendo el inóculo del patógeno y/o la intensidad de los síntomas posteriores a las infecciones. Los agentes antagonistas o biocontroladores utilizados para impedir el desarrollo de enfermedades son microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, hongos filamentosos, levaduras y virus.

Entre los hongos antagonistas, *Trichoderma* spp. es ampliamente usado como agente de biocontrol para enfermedades de patógenos de suelo y también de parte aérea, ya sea actuando, indirectamente compitiendo por nutrientes y espacio, antibiosis, promoviendo el crecimiento y los mecanismos de defensa de las plantas, o directamente por mecanismos como el micoparasitismo (Benítez et al., 2004).

Estos mecanismos indirectos y directos pueden actuar coordinadamente y su importancia en el proceso de control biológico depende de la cepa de *Trichoderma*, el hongo antagonizado, la planta del cultivo y las condiciones ambientales, incluida la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura y la concentración de hierro (Benítez et al., 2004).

2.3 USO DE *Trichoderma* spp. EN EL MANEJO DE ENFERMEDADES DE PLANTAS

Las especies de *Trichoderma* se encuentran como habitante natural de suelo y raíces, con una amplia distribución en el mundo. Según Martínez et al. (2013), las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. El potencial de las especies del género *Trichoderma* como agente de biocontrol fue relatado en la década de 1930 (Weindling 1932, 1934).

Trichoderma spp. presenta actividad antagonista sobre diversos patógenos de plantas como *Botrytis cinerea* (Elad y Kapat 1999, Calvo 2012); *Rhizopus* (Howell, 2002); *Pythium* spp. (Howell, 2002); *R. solani* (Stefanova et al. 1999, Howell 2000, Reyes et al. 2008, Guédez et al. 2012); *Sclerotium cepivorum* (Metcalf y Wilson, 2001); *S. rolfsii* (Guédez et al. 2012, González

2019); *F. oxysporum* (Guédez et al., 2012); *F. nygamai* (Corallo, 2012); *M. phaseolina* (Gajera et al. 2012, Khaledi y Taheri 2016); *Phytophthora capsici* (Ezziyyani et al., 2004b); *P. cactorum* (Villegas y Castaño, 1999); *P. nicotianae* (Stefanova et al., 1999); *Alternaria solani* (Martínez y Solano, citados por Reyes et al., 2008); *Sclerotinia sclerotiorum* (Silveira et al. 2001, 2003); *Gibberella zeae* (Cabrera 2009, Perez y Villar 2011); *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis* (De Lucca, 2015). Además, son ampliamente utilizadas para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustrato y a que no atacan plantas superiores (Papavizas et al., citados por Ezziyyani et al., 2004b).

2.3.1 Clasificación taxonómica

Las especies de *Trichoderma* se clasifican dentro de los hongos Ascomycetes en el género Hypocrea. El género *Trichoderma* pertenece al reino Fungi, filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y familia Hypocreaceae (NCBI, s.f.).

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 (Martínez et al., 2013). Según Rifai (1969), en la revisión taxonómica del género *Trichoderma* incluyó nueve especies, *T. harzianum* ha sido la más efectiva en el control biológico de diversos patógenos del suelo, seguida por las especies *T. hamatum* y *T. Viride* (Cook y Baker, citados por Elías et al., 1993). Estas especies se identificaron teniendo en cuenta diferencias morfológicas y fisiológicas, como tipo de ramificación del conidióforo, forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia, entre otras (Rifai, 1969).

En la actualidad con la utilización de las herramientas moleculares para la identificación y clasificación de las especies, se han podido diferenciar 250 especies del género *Trichoderma* (Samuels y Hebbbar, 2015). En este sentido se utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) específica de las regiones ITS1 e ITS2 y del factor de elongación, así como la secuenciación de estas para su comparación con las secuencias depositadas en GenBank, TrichoBlast y en otras bases de datos, lo que facilita la identificación de los aislamientos (Martínez et al., 2013).

Las colonias de *Trichoderma* tienen rápido crecimiento y las esporas (conidios) presentan color verde característico del género. El reverso de las colonias es incoloro, amarillento, verde-amarillento, y muchas especies producen clamidosporas, esporas de resistencia, que se forman por engrosamiento de la pared de las células del micelio (Howell, 2003). Presentan

conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos (Martínez et al., 2013).

2.3.2 Mecanismo de biocontrol de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* actúan contra los patógenos mediante distintos mecanismos de acción tales como competencia por nutriente y espacio, antibiosis por medio de enzimas o la producción de metabolitos secundarios, micoparasitismo, desactivación de enzimas del patógeno, inducción de los sistemas de defensa de las plantas, promoción del crecimiento vegetal, entre otros (Chang et al. 1986, Widham et al. 1986, Chet 1987, Baker 1988, Chet y Inbar 1994, Belanger et al. 1995, Yedidia et al. 1999, Sid Ahmed et al. 2000, Ezziyyani et al. 2003, 2004b, Howell 2003, Harman et al. 2004, Infante et al. 2009).

La competencia se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Infante et al., 2009). La presencia de *Trichoderma* de forma natural en diferentes suelos, se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie (Infante et al., 2009). La causa de muerte más común de los microorganismos es la inanición, la competencia por nutrientes limitantes resulta en un control biológico de hongos fitopatógenos, antagonistas y micoparásitos (Chet et al., 1997). *Trichoderma* tiene una mayor capacidad de movilizar y utilizar nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. Esto se debe a su capacidad de obtener moléculas de ATP a partir de diferentes azúcares abundantes en la rizósfera como celulosa, quitina y glucanos (Chet et al., 1997).

La antibiosis refiere a la producción de sustancias por parte de un organismo, las cuales son tóxicas para otros microorganismos. La antibiosis ocurre durante la interacción de los componentes difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por las cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Además, las cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización de patógenos (Howell et al., citados por Tovar, 2008).

El micoparasitismo es el ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye el reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped. *Trichoderma* spp. puede ejercer control directo parasitando un rango de hongos, detectando otros hongos y creciendo hacia ellos (Bénitez et al., 2004).

Durante el proceso de micoparasitismo las especies de *Trichoderma* crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, luego se adhieren a las hifas de este enrollándose en ellas muchas veces, y en ocasiones la penetran. En estados más tardíos del proceso parasítico se observa la degradación de las paredes celulares del hospedante (Infante et al., 2009). Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Chet et al., 1981).

La desactivación de enzimas del patógeno es otro mecanismo de biocontrol, que presentan algunas cepas del género *Trichoderma*. Según Harman (2000), *T. harzianum* (T-39) secreta una proteasa que degrada las enzimas que utiliza *B. cinerea* para atacar la pared celular de las plantas, mientras que *T. viride* produce α -glucosidasa para degradar una fitotoxina de *R. solani* (Howell, 2003).

La inducción de mecanismos de resistencia a enfermedades se activa mediante sistemas de reconocimientos específicos por los cuales la planta reconoce el ataque de un patógeno (Hutcheson, citado por Madriz, 2002). Se puede inducir resistencia localizada o sistémica a las enfermedades mediante la liberación de metabolitos, los cuales promueven la producción de etileno o de fitoalexinas terpenoides por la planta, ambos involucrados en la resistencia de la planta frente a patógenos (Howell, 2000). Se identificaron diferentes tipos de compuestos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. que son responsables de inducir resistencia en las plantas, entre ellos se encuentran: proteínas con función enzimática, homólogos de proteínas, oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular, los cuales son liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de enzimas de *Trichoderma* spp (Baker et al., 1997).

Otra característica del género *Trichoderma* es la de promover el crecimiento vegetal, produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal (Sutton y Peng, 1993). *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas (Altomare et al., 1999). Se reportó la producción de ácido 3-indol acético (AIA), sustancia que actuó como hormona vegetal favoreciendo el desarrollo del sistema radical, entre otros beneficios (Valencia et al., 2005).

2.3.3 Métodos de selección de cepas de *Trichoderma* spp.

La selección de cepas de *Trichoderma* spp. se puede realizar en el laboratorio mediante métodos “*in vitro*” y con plantas en ambientes controlados o en el campo en condiciones productivas como método “*in vivo*” (Mondino y Vero, 2006).

Una herramienta útil y confiable para conocer el potencial como agente de biocontrol de cepas de *Trichoderma* son los ensayos *in vitro* para determinar antagonismo (Larralde et al., 2008), los cuales se utilizan principalmente como herramienta predictiva para determinar la capacidad de inhibición del crecimiento, antes de efectuar estudios que requieren más tiempo y costo económico (Lo et al. 1998, Mondino y Vero 2006).

Uno de los ensayos más utilizados para la evaluación de antagonismo *in vitro* es la técnica de cultivo dual, el cual consiste en colocar en un extremo de la placa de Petri (con medio de cultivo) un disco de micelio del antagonista y en el otro extremo un disco igual al anterior, pero en este caso con el agente fitopatógeno (Dennis y Webster 1971, Mondino y Vero 2006). Esta técnica permite detectar la inhibición del crecimiento de los patógenos por producción de antibióticos, la destrucción de hifas del patógeno por efectos de enzimas producidas por el antagonista, parasitismo directo del patógeno por parte del antagonista y competencia por espacio y nutrientes (Mondino y Vero, 2006).

Esta técnica también permite cuantificar la inhibición midiendo los radios de crecimiento de los patógenos en presencia y ausencia del antagonista. Se debe realizar el ensayo con un número de repeticiones suficiente como para sacar conclusiones estadísticamente significativas (Mondino y Vero, 2006).

Una desventaja de los métodos de selección *in vitro* es que no todos los mecanismos de acción antagónica pueden ser detectados de esta manera. De ese modo se pueden estar perdiendo muy buenos antagonistas. Solamente permite detectar antagonistas que actúan mediante ciertos mecanismos de acción como la antibiosis o parasitismo directo, dejando de lado aquellos otros que actúan por otros mecanismos como la competencia con el patógeno en los sitios de acción o la inducción de resistencia de la planta (Mondino y Vero, 2006).

Otra desventaja de las técnicas de selección *in vitro* es la baja correlación entre los resultados obtenidos en el laboratorio con los resultados de campo. Un agente de control biológico puede producir amplios halos de inhibición, antagonizar en forma efectiva al patógeno cuando se lo enfrenta en

una placa, y luego no evitar el desarrollo de la enfermedad cuando es aplicado sobre la planta. Es en el campo, cuando se aplica un microorganismo sobre las hojas de las plantas o en el suelo, éste puede ver disminuida su capacidad antagónica por efecto de factores ambientales como la luz UV, baja humedad relativa, temperatura, competencia con otros microorganismos, entre otros (Hjeljord y Tronsmo 1998, Howell 2003, Mondino y Vero 2006).

En este tipo de ensayo han sido evaluados varios patógenos de plantas enfrentados a *Trichoderma*, los cuales fueron *A. solani* (Martínez y Solano, citados por Reyes et al., 2008); *B. cinerea* (Guigón López et al. 2010, Calvo 2012); *D. macrodidyma* (Dos Santos et al., 2016); *Fusarium* spp. (Guigón López et al. 2010, Guédez et al. 2012, Pastrana et al. 2016, Sánchez García et al. 2017); *M. phaseolina* (Guigón López et al. 2010, Gajera et al. 2012, Khaledi y Taheri 2016, Pastrana et al. 2016); *N. clavispora* (Amrutha y Vijayaraghavan, 2018); *Phytophthora* spp. (Stefanova et al. 1999, Villegas y Castaño 1999, Ezziyyani et al. 2004b); *Pythium* spp. (Howell, 2002); *Rhizoctonia* sp. (Reyes et al., 2008); *R. solani* (Stefanova et al. 1999, Guigón López et al. 2010, Guédez et al. 2012); *Sclerotinia sclerotiorum* (Silveira et al. 2001, 2003); *S. rolfsii* (Guédez et al. 2012, González 2019) entre otros.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en los años 2017-2018, en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay).

3.1 COLECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp.

Para este estudio se utilizaron 17 aislados de *Trichoderma* spp. los cuales pertenecen a la colección del Grupo Disciplinario de Fitopatología, los mismos son: Tr35 (1), P26 (2), Tr251 (3), TRC (4), P28 (5), T46 (6), OL2 (7), LL1 (8), VD1 (9), BEN (10), TRT (11), TRZ (12), DL2 (13), TGC (14), TRG (15) TA89 (16), FB3 (17).

3.2 COLECCIÓN DE ORGANISMOS ASOCIADOS A LA MUERTE DE PLANTAS DE FRUTILLA

El Laboratorio de Fitopatología de Facultad de Agronomía, cuenta con una colección de los organismos asociados a la muerte de plantas de frutilla en Salto, de los cuales se utilizaron cuatro para este trabajo, estos son: *D. macrodidyma*, *M. phaseolina*, *N. clavispora* y *Rhizoctonia* sp.

3.3 EVALUACIÓN *in vitro* DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp.

La evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* se efectuó mediante el método cultivo dual (Dennis y Webster, 1971). Se probaron 17 aislados de *Trichoderma* spp. frente a cuatro patógenos.

Inicialmente se incubaron los aislados de *Trichoderma* spp. y de los cuatro patógeno en placas de Petri de 90 mm de diámetro con PDA a 25 °C. El tiempo de incubación fue de tres días para el antagonista, cuatro días para los aislados *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina* y siete y 10 para *N. clavispora* y *D. macrodidyma* respectivamente.

El cultivo dual se realizó en placas de Petri con 20 ml de PDA. Se colocó en un extremo de la placa de Petri un disco de agar de cinco mm con micelio del patógeno (*D. macrodydima*, *M. phaseolina*, *N. clavispora* o *Rhizoctonia* sp.) y en el extremo opuesto otro disco de agar de cinco mm con micelio del antagonista (17 aislados de *Trichoderma* spp.) a una distancia de 50 mm entre ellos.

Como testigos se colocaron en placas de Petri los hongos patógenos en un extremo sin la presencia de *Trichoderma* spp. Posteriormente las placas se incubaron a 25 °C y se realizaron mediciones cada 24 horas de crecimiento radial de los hongos. El ensayo se dio por finalizado cuando los testigos cubrieron toda la placa.

En este ensayo se realizó un diseño completamente al azar (DCA), con 72 tratamientos (68 aislados de *Trichoderma* spp. con los cuatro patógenos y cuatro al crecimiento de cada patógeno), con tres repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en la placa de Petri.

La capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. se evaluó comparando el crecimiento radial de la colonia del patógeno en ausencia y presencia del antagonista.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR, Ezziyyani et al. 2004a, 2004b), se calculó con la fórmula $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$; donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente del crecimiento radial de los patógenos.

El grado de antagonismo se evaluó en base a una escala de evaluación del antagonismo *in vitro* (Cuadro No. 1), que tiene en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos estudiados (Ezziyyani et al. 2004a, 2004b).

El tiempo de incubación que llevo para evaluar el antagonismo para los cuatro patógenos fue el siguiente: cinco días *Rhizoctonia* sp., 10 días *N. clavisporea* y cuatro días *M. phaseolina* y *D. macrodydima*.

Cuadro No. 1. Escala de evaluación del antagonismo *in vitro*

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno, esporulación sobre ella.

Con la información que se obtuvo de los porcentajes de inhibición de crecimiento radial y grado de antagonismo se seleccionaron los cuatro aislados con mejor capacidad antagónica.

3.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los cuatro aislados puros de *Trichoderma* seleccionados se incubaron a 25 °C durante 10 días, y mediante la utilización del microscopio óptico y el manual Samuels y Hebbar (2015), se logró identificar la especie.

3.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Para complementar la identificación, se realizó el análisis molecular a los cuatro aislados seleccionados en el cultivo dual.

3.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo de Paolocci et al. (1999) con modificaciones en el cual consiste en retirar todo el micelio de la superficie de cada placa de colonias puras de cuatro días de edad y su posterior colocación en tubos eppendorf de 1,5 ml. Luego se le agregó 200 µl de buffer de lisis (100 µl/ml Tris HCl 200 mM pH 7,5, 100 µl/ml NaCl 250 mM, 100 µl/ml SDS 0,5 %, 100 µl/ml EDTA 25 mM + NaOH al 10%) a cada tubo para permitir la ruptura de las paredes celulares y se los llevo al freezer (-20 °C) por dos horas. Se retiró los tubos del freezer y se rompió el micelio mediante pistilos esterilizados para luego agregarle otros 200 µl de buffer de lisis. Rápidamente se homogenizó por 10 segundos con un vórtex y se llevo a baño maría (65 °C) por 30 minutos.

Posteriormente se agregó 300 µl de NaCl (1 M) y se centrifugó 13000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Tras sacar los tubos de la centrifuga, se observó dos fases: una líquida y otra sólida. Se retiró 500 µl de la fase líquida del sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo y se le agregó 500 µl de isopropanol (- 20 °C), se colocó en freezer (- 20 °C) por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se enjuagó dos veces con 200 µl de etanol 70% (-20 °C) y se centrifugó 10000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Se descartó el etanol y se dejo el pellet secando en estufa a 50 °C aproximadamente 1 hora, para que se evapore totalmente el etanol. Luego se lo resuspendió en 48 µl de solución buffer TE estéril y filtrada (0,2 mM y pH 8,0) y se llevo a baño maría a 65 °C por 15 minutos. Se adicionó 2 µl de ARNasa/ tubo y por último, se los llevó a 37° C por 20-30 minutos, para luego guardarlos en freezer (- 20 °C).

Se determinó la concentración de ADN de las muestras mediante Nanodrop 2000 Spectrophotometer Termo Scientific y se ajustó a una concentración de 100 ng/ µl de ADN.

3.5.2 Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación mediante la PCR se efectuó en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler. La mezcla de la reacción contenía, Buffer 1X (50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH 8,0)), nucleótidos (0,2 mM), MgCl₂ (2,5 mM), cebadores (0,4 µM de cada uno), Taq polimerasa (1,25 U, SBS Genetech Co., Ltd., China) y 1 µl de ADN (100 ng/ µl), el volumen final de la mezcla fue 20 µl. Los cebadores que se utilizaron se listan en el Cuadro No. 2.

Cuadro No. 2. Características del cebador EF 1-α

Locus	Cebadores	Secuencias 5´ - 3´	Fragmentos (pb)	Referencia
EF 1-α	EF1688F EF11251R	CGGTCACTTGATCTACAAGTGC CCTCGAACTCACCAGTACCG	884	Phillips et al. (2005)

Las condiciones para la amplificación de la secuencia parcial del gen EF1-α (factor de elongación) se efectuó la desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95° C por 30 segundos, 55° C por 45 segundos y 72° C por un minuto y una extensión final de 72° C por 10 minutos.

De los productos de amplificación, dos microlitros se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa (SBS, China) al 1 %, utilizando Buffer TBE 1X (tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH=8,0). Para estimar el tamaño de las bandas se empleó un marcador de peso molecular conocido de 100 pb (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus, Fermentas, Alemania). También se incluyó en el gel, una muestra como control negativo (sin ADN) para descartar una posible contaminación en la PCR.

Para la visualización de las bandas amplificadas, los geles se tiñeron en solución acuosa con GelRed (Biotium, Estados Unidos, 5 µl GelRed, 2 ml NaCl 2,5 M y 48 ml de agua) por 30 minutos y foto-documentada sobre luz ultravioleta en transiluminador (DyNA 17 Light Dual Intensity UV Transiluminator, Labnet Internacional Inc., USA) para determinar la presencia de banda.

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en MacroGen Inc. (Corea), y las secuencias resultantes fueron editadas manualmente en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011) para luego ser comparadas con las depositadas en GenBank mediante búsqueda Blast.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de PICR y grado de antagonismo fueron analizados a través de una ANAVA y una comparación de medias de Scott-Knott, a través del programa estadístico GENES Versión 2015.5.0 (Cruz, 2013).

4. RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL DE LOS PATÓGENOS EN CULTIVOS DUALES

Los 17 aislados de *Trichoderma* spp. evaluados lograron inhibir el crecimiento de los cuatro patógenos. Los mayores porcentajes de inhibición se lograron cuando los aislados de *Trichoderma* spp. fueron enfrentados a *D. macrodidyma* y *N. clavispota*, con valores que fueron del 93,2% al 96,2% y del 77% al 83% respectivamente. Los diferentes aislados de *Trichoderma* evaluados se comportaron en forma similar, no encontrándose diferencias significativas en su capacidad de inhibir a estos dos patógenos (Cuadro No. 3).

Los aislados de *Trichoderma* evaluados difirieron significativamente en su capacidad para inhibir *in vitro* el crecimiento de *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina*. Para el caso de *Rhizoctonia* los aislados P 28, BEN, Tr 251, P 26, TRC, Tr 35, TA89 y T 46 se destacaron por provocar una mayor inhibición y en *M. phaseolina* el aislado BEN provocó una inhibición significativamente mayor que el resto de los aislados (Cuadro No. 3).

El aislado más eficiente en inhibir a los cuatro patógenos fue BEN, luego le siguieron Tr 251, TRC, TA89, P 28, P 26, T 46 y Tr 35 (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Dactylonectria macrodidyma*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *Rhizoctonia* sp. y *Macrophomina phaseolina* frente a los aislados de *Trichoderma* spp

Tratamientos	<i>D. macrodidyma</i>	<i>N. clavispora</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>M. phaseolina</i>
BEN	96,20 a	82,96 a	74,57 a	72,87 a
Tr 251	95,50 a	81,23 a	74,32 a	70,70 b
TRC	96,17 a	78,03 a	72,84 a	70,03 b
TA89	96,00 a	80,49 a	72,10 a	67,57 c
P 28	95,30 a	79,51 a	75,06 a	67,70 c
P 26	93,93 a	80,49 a	74,08 a	67,97 c
T 46	94,87 a	79,51 a	71,85 a	67,03 c
Tr 35	95,77 a	78,77 a	72,59 a	66,50 c
LL1	95,37 a	79,26 a	69,38 b	64,93 d
FB3	94,73 a	78,03 a	70,86 b	64,33 d
DL2	95,00 a	80,25 a	71,11 b	61,60 e
OL2	94,83 a	79,26 a	69,14 b	58,67 e
TGC	94,33 a	80,49 a	68,89 b	59,17 e
TRT	95,70 a	79,75 a	69,14 b	54,90 f
VD1	94,07 a	79,01 a	70,62 b	51,93 g
TRG	93,20 a	77,04 a	63,70 c	51,27 g
TRZ	94,47 a	78,03 a	53,34 d	61,33 e
Testigo	0 b	0 b	0 e	0 h

Medias con distinta letra difieren significativamente (Scott-Knott; $p=0,05$).

4.2 EVALUACIÓN DEL GRADO DE ANTAGONISMO EN CULTIVOS DUALES

El grado de antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *D. macrodidyma*, mostró que los aislados Tr 35, Tr 251, TA89, P 28, T 46 y TRC fueron significativamente mayores que el resto de los aislados (Cuadro No. 4).

En *N. clavispora*, se observó que de los 17 aislados de *Trichoderma* spp., 15 aislados fueron significativamente superiores que los aislados DL2 y BEN (Cuadro No. 4).

En cuanto al grado de antagonismo sobre *Rhizoctonia* sp. los aislados Tr 35, Tr 251, TA89, P 28 y T 46 fueron significativamente mayores al resto de los aislados. Se observó en este patógeno, que están presentes todos los grados de antagonismo según la escala utilizada (Cuadro No. 4).

En *M. phaseolina*, se observó que los aislados Tr 35, Tr 251, TA89, P 28 y TRC fueron significativamente mayores al resto de los aislados. En este

patógeno el grado más alto de antagonismo fue tres, ya que los aislados de *Trichoderma* no esporularon sobre las colonias (Cuadro No. 4).

Los aislados más eficientes invadiendo, colonizando y esporulando las colonias de los cuatro patógenos fueron: Tr 35, Tr 251, TA89 y P 28 (Cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Grado de antagonismo de aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Dactylonectria macrodidyma*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *Rhizoctonia* sp. y *Macrophomina phaseolina*

Tratamientos	<i>D. macrodidyma</i>	<i>N. clavispora</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>M. phaseolina</i>
Tr 35	4 a	4 a	4 a	3 a
Tr 251	4 a	4 a	4 a	3 a
TA89	4 a	4 a	4 a	3 a
P 28	4 a	4 a	4 a	3 a
T 46	4 a	4 a	4 a	2 b
TRC	4 a	3,67 a	3 c	3 a
LL1	3,67 b	4 a	3 c	1 d
OL2	3 c	4 a	3 c	3 a
TGC	3 c	4 a	3 c	2 b
DL2	3 c	3 b	3,67 b	2 b
P 26	3 c	4 a	2,33 d	1,67 c
VD1	3 c	4 a	2 e	2 b
FB3	3 c	4 a	2 e	2 b
TRT	3 c	4 a	2 e	1 d
TRG	3 c	4 a	1 f	1 d
TRZ	3 c	4 a	1 f	1 d
BEN	3 c	0,33 c	0 g	1 d
Testigo	0 d	0 d	0 g	0 e

Medias con distinta letra difieren significativamente (Scott-Knott; $p=0,05$).

4.3 AISLADOS SELECCIONADOS

De los 17 aislados de *Trichoderma*, se seleccionaron los cuatro aislados más eficientes de acuerdo a los resultados obtenidos en los porcentajes de inhibición y en el grado de antagonismo en los cuatro patógenos. Los aislados seleccionados por su potencial como antagonistas de *D. macrodidyma*, *N. clavispora*, *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina* son: Tr 35, Tr 251, P 28 y TA89.

Las cuatro aislados de *Trichoderma* seleccionadas no presentaron diferencias en cuanto al porcentaje de inhibición y grado de antagonismo sobre

los cuatro patógeno, con excepción en *M. phaseolina* donde se observó diferencias significativas en el porcentaje de inhibición, siendo el mejor Tr 251, seguido de P 28, TA 89 y Tr 35.

4.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Las características morfológicas de los aislados Tr 251 y P 28 se asociaron a *T. koningiopsis* y *T. atroviride*, respectivamente. Mientras que los aislados Tr 35 y TA 89 correspondieron a *T. harzianum* (Samuels y Hebbar, 2015, Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5. Características morfológicas de las especies de *Trichoderma*

Aislados	Tr 251	P 28	TA 89	Tr 35
Conidios L-A-L/A ⁽¹⁾	3,8-2,7-1,41	3,5-2,8-1,25	3,4-2,8-1,21	3,3-2,7-1,22
Fialides L-A-L/A ⁽²⁾	9,0-3,4-2,65	8,9-3,4-2,62	6,6-3,3-2,0	6,8-3,3-2,06
Conidio color V-B-A ⁽³⁾	V	V	V	V
Radio de la colonia 25 °C PDA ⁽⁴⁾	62	65	58	56
Clamidosporas (Presente/Ausente)	Presente	Presente	Presente	Presente
Especie	<i>T. koningiopsis</i>	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>

Referencia: (1): Conidio (μm): longitud promedio (L), ancho promedio (A) y longitud/ancho promedio (L/A). (2): Fialides (μm): longitud promedio (L), ancho promedio (A) y longitud/ancho promedio (L/A). (3) Conidio color: verde (V), blanco (B) y amarillo (A). (4) Radio de la colonia promedio (mm): después de 72 hs a 25 °C.

4.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Por medio de la comparación de las secuencias de los cuatro aislados seleccionados, con las depositadas en el GenBank los aislados de *Trichoderma* fueron identificados a nivel de especie (Cuadro No. 6).

Cuadro No. 6. Identificación de los aislados de *Trichoderma* mediante secuencia parcial del gen EF1- α (factor de elongación)

Aislados	Especie	Accesión	% de identidad
Tr 251	<i>T. koningiopsis</i>	KJ871194.1	99,78
P 28	<i>T. paratroviride</i>	KT153586	99,28
TA 89	<i>T. aphroharzianum</i>	AF348091	99,83
Tr 35	<i>T. aphroharzianum</i>	AF348091	99,66

5. DISCUSIÓN

El trabajo demuestra el potencial que tienen los aislados de *Trichoderma* spp. estudiados contra *D. macrodidyma*, *N. clavispora*, *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina* en condiciones *in vitro*. Todos los aislados de *Trichoderma* evaluados lograron inhibir el crecimiento de los cuatro patógenos, la mayor inhibición se observó en *D. macrodidyma* y *N. clavispora* probablemente debido al menor crecimiento de estos dos patógenos y al mayor crecimiento de los aislados de *Trichoderma*. Esto concuerda con De Lucca (2015), donde observó que las cepas de *Trichoderma* spp. lograron inhibir el crecimiento de *B. sorokiniana* y *P. tritici-repentis*, en el cual observó mayor inhibición en este último patógeno; esto permite identificar una clara interacción entre patógeno-antagonista que define la eficacia de *Trichoderma* como agente de biocontrol mediante distintos mecanismos (competencia por el sustrato, antibiosis, micoparasitismo).

Los mayores valores de inhibición se obtuvieron en *D. macrodidyma* y *N. clavispora*, siendo de 93,2% a 96,2% y de 77% a 83%, respectivamente, sin diferencias significativas entre los aislados. Los resultados que se lograron son más altos que los obtenidos en los trabajos de Santos et al. (2016), Amrutha y Vijayaraghavan (2018), siendo de 36,8% a 43,1% utilizando diferentes cepas comerciales de *Trichoderma* y 66,67% con *T. asperellum* respectivamente. La diferencia entre los porcentajes que se lograron en los diferentes trabajos se puede deber en gran parte por ser diferentes especies.

Los valores de inhibición en *Rhizoctonia* y *M. phaseolina* fueron similares siendo de 53,34% a 75% y 51,27% a 74%, respectivamente, presentando diferencias significativas entre los aislados de *Trichoderma*. Los resultados de *Rhizoctonia* coinciden con Guédez et al. (2012) donde redujeron el crecimiento micelial de *R. solani* con valores superiores al 50% y el mayor porcentaje de inhibición fue del 80%. En otros estudios realizados como los de Reyes et al. (2008) lograron un mayor rango de inhibición, siendo de 34,6% a 83,3%, en cambio Guigón-López et al. (2010) obtuvieron un menor rango de inhibición y el valor superior fue del 59%. Los valores de *M. phaseolina* en comparación con otros trabajos se observó una gran variabilidad en los valores de inhibición, siendo de 44% al 64% (Guigón-López et al., 2010), 32% a 85,2% (Gareja et al., 2012), 20,22% a 58,67% (Khaledi y Taheri, 2016) y 55% (Pastrana et al., 2016). Esto demuestra la gran variabilidad que tienen las especies de *Trichoderma* frente a estos patógenos.

Esta variabilidad que se observa en las diferentes especies de *Trichoderma*, también puede detectarse en cepas de una misma especie, esto fue demostrado por Corallo (2012), De Lucca (2015) donde observaron

diferencias en los porcentajes de inhibición en cepas de una misma especie de *Trichoderma*. Además, Corallo (2012) observó que al usar dos cepas de *Fusarium nygamai*, una presentó mayor sensibilidad que la otra, por lo que resulta importante evaluar el efecto antagónico en más de una cepa del patógeno.

El grado de antagonismo en los cuatro patógenos fue variable, se observó que todos los aislados de *Trichoderma* spp. contra *D. macrodidyma* y *N. clavispora* invadieron y colonizaron las colonias de estos patógenos, siendo en *N. clavispora* donde se logró un mayor número de aislados de *Trichoderma* esporulando la superficie de este patógeno. En el caso de *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina*, los aislados de *Trichoderma* produjeron distinto grado de antagonismo.

Este comportamiento de *Trichoderma* se observó en otros trabajos como el de Guigón-López et al. (2010) donde observaron una invasión sobre las colonias de *R. solani*, que van desde un 15% al 100% de la superficie de las colonias. Asimismo, Guédez et al. (2012) evaluaron el grado de antagonismo de seis aislados de *T. harzianum* sobre *R. solani* al tercer día de enfrentamiento, donde se obtuvo el grado 2 según la escala de Ezziyyani et al. (2004a, 2004b, invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno) como valor máximo de antagonismo. Gajera et al. (2012), utilizaron siete cepas de *Trichoderma*, donde observaron a los 14 días de instalado el cultivo dual, que la cepa *T. koningi* MTCC 796 colonizó completamente a *M. phaseolina* y esporuló sobre ella.

Esto coincide con el estudio realizado por Corallo (2012) donde observó que las cepas de *Trichoderma* spp, mostraron un gradiente de actividad inhibitoria, desde la reducción parcial del crecimiento hasta la capacidad de invadir y esporular sobre el micelio del patógeno. En la mayoría de los casos en donde hubo invasión se aisló únicamente *Trichoderma* spp, a partir del frente de crecimiento de *F. nygamai*, esto podría deberse a la capacidad micoparasítica de *Trichoderma* spp.

La capacidad antagónica de los distintos aislados de *Trichoderma* spp, coincide con los observados por Bell et al. (1982), que según el aislado utilizado, encontraron una gran variabilidad en el control de los patógenos, Lo mismo fue observado por Corallo (2012), en el cual determinó que es muy importante evaluar varias cepas de *Trichoderma* a fin de seleccionar aquella que presente el mejor potencial como agente de control biológico.

En cuanto a la identificación molecular de los aislados seleccionados, Tr 251 coincidió con la realizada en base a las características morfológicas, pero se diferenció en los aislados P 28, TA 89 y Tr 35 que se clasificaron como *T. paratroviride* (P 28) y *T. aphroharzianum* (TA 89 y Tr 35). La variabilidad de las características morfológicas de este género, hace que su clasificación sea difícil, no obstante con el desarrollo de técnicas moleculares la sistemática de este género ha avanzado sustantivamente en los últimos años (Druzhinina et al., 2006). De acuerdo a Jaklitsch y Voglmayr (2015) la especie *T. paratroviride* presenta una similitud y estrecha relación con *T. atroviride*. En trabajos realizados por Chaverri et al. (2015) estudiaron la taxonomía del complejo de *T. harzianum*, donde revisaron para incluir al menos 14 especies; en el cual una de ellas es *T. aphroharzianum*. Esta especie en particular se re-identificó de un producto comercial de control biológico (PlantShield) que contenía *T. harzianum* T-22.

6. CONCLUSIONES

En las condiciones que se desarrolló el trabajo se concluye que las cepas de *Trichoderma* presentan potencial para suprimir *D. macrodidyma*, *N. clavispora*, *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina* causantes de la necrosis de raíz y corona de frutilla.

7. RESUMEN

La necrosis de raíz y corona es uno de los problemas sanitarios más importantes en los cultivos comerciales de frutilla en Salto, que causan la muerte de plantas afectando directamente el rendimiento. Se asocian a la muerte *Neopestalotiopsis*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Verticillium*, *Pythium* y *Phytophthora*. Los productos químicos utilizados para el control de estas enfermedades son ineficientes y las medidas culturales son insuficientes, por estas razones el control biológico surge como una herramienta complementaria para el manejo integrado de estas enfermedades producidas por patógenos de suelo. Existen numerosas referencias de *Trichoderma* como antagonista de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* entre otros. El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar y seleccionar *in vitro* 17 cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista sobre *Neopestalotiopsis clavispora*, *Dactylonetria macrodidyma*, *Rhizoctonia* sp. y *Macrophomina phaseolina*. El antagonismo se evaluó por el método del cultivo dual, con 72 tratamientos, con tres repeticiones por tratamiento. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y el grado de antagonismo se determinó a través de una escala de cero a cuatro donde cero equivale a ninguna invasión de la superficie de la colonia del patógeno y cuatro significa la invasión total de la colonia del patógeno y esporulación sobre la misma. El diseño experimental fue completamente al azar y las medias de los tratamientos se compararon por medio de test Scott-Knott (5%) usando el programa Genes 2015.5.0. Los cuatro aislados con mejor comportamiento antagonista se seleccionaron para la identificación morfológica y molecular. Todos los aislados de *Trichoderma* presentaron un PICR mayor al 50% en todos los patógenos, llegando a valores mayores al 90% en *D. macrodidyma*. La mayoría de los aislados de *Trichoderma* spp. presentaron invasión, colonización y esporulación sobre las colonias de los patógenos; excepto el aislado BEN en *Rhizoctonia* sp. y *N. clavispora* no hubo invasión sobre las colonias. En base al análisis molecular los aislados Tr 251 y P 28 corresponden a *T. koningiopsis* y *T. paratroviride*, respectivamente, mientras que Tr 35 y TA89 son *T. afroharzianum*. Las cepas de *Trichoderma* presentan potencial para suprimir *D. macrodidyma*, *N. clavispora*, *Rhizoctonia* sp. y *M. phaseolina* causantes de la necrosis de raíz y corona de frutilla.

Palabras clave: Frutilla; Necrosis de raíz y corona; Control biológico; Agente de biocontrol; Antagonismo.

8. SUMMARY

Root and crown rots are the most important diseases of commercial strawberry crops in Salto, causing the death of plants directly affecting yield. *Neopestalotiopsis*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Verticillium*, *Pythium* and *Phytophthora* are associated with its death. Chemical products used for controlling these diseases have not been effective and the cultural measures are insufficient; so, biological control can be a complementary tool for the integrated diseases management produced by soil pathogens. Several *Trichoderma* spp. Isolates exist to control various plant pathogens, such as *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, among others. This work aims to characterize and select 17 in vitro strains of *Trichoderma* spp. with antagonistic activity on *Neopestalotiopsis clavispora*, *Dactylonetria macrodidyma*, *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina phaseolina*. The antagonistic potential of the *Trichoderma* spp against the pathogens was evaluated dual culture assay. The treatments were 72 and three replicates were used for each treatment. The percentage inhibition of radial growth (PIRG) and the degree of antagonism were also used based on a scale of zero to four, where zero equals no pathogen colony surface invasion and four means total pathogen colony invasion and sporulation over it. The experimental design was completely randomized, and the means were compared by Scott-Knott test (5%) using the Genes Versión 2015.5.0. The four isolates which showed the best antagonistic behavior were selected for morphological and molecular identification. All *Trichoderma* spp. isolates showed a PIRG higher than 50% in all pathogens, reaching values over 90% in *D. macrodidyma*. Most isolates of *Trichoderma* spp. presented invasion, colonization and sporulation on the pathogens colonies; except for the BEN isolate in *Rhizoctonia* sp. and *N. clavispora*, where there was no invasion over the colonies. Based on molecular analysis, the Tr 251 and P 28 isolates correspond to *T. koningiopsis* and *T. paratroviride* respectively; while Tr 35 and TA89 are *T. aphroharzianum*. *Trichoderma* strains have potential to suppress *D. macrodidyma*, *N. clavispora*, *Rhizoctonia* sp. and *M. phaseolina*, pathogens associated with root and crown diseases of strawberry.

Keywords: Strawberry; Root and crown rots; Biologic control; Biocontrol agent; Antagonism.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adhikari, T. B.; Hodges, C. S.; Louws, F. J. 2013. First report of *Cylindrocarpon* sp. associated with root rot disease of strawberry in North Carolina. (en línea). Plant Disease. 97(9):1251. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-01-13-0116-PDN>
2. Agrios, G. N. 2007. Fitopatología. 2ª. ed. México, D. F., Limusa. 838 p.
3. Agustí-Brisach, C.; Armengol, J. 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. (en línea). Phytopathologia Mediterranea. 52(2):245-261. Consultado 21 oct. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=4&sid=6a9f3f0e-78dc-419c-8245-5d1a3f7485e8%40sdc-v-sessmgr06>
4. Alam, M. W.; Gleason, M. L.; Amin, M.; Ali, S.; Muhammad, S.; Rosli, H.; Rehman, A. 2017. First report of root and crown rot of strawberry caused by *Chaetomium globosum sensu lato* in Punjab, Pakistan. (en línea). Plant Disease. 101(5):837. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-16-1455-PDN>
5. Albert, L. A. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. (en línea). In: Congreso de Actualización en Toxicología Clínica (7º., 2005, Tepic). Trabajos presentados. Revista de Toxicología. 2:1-17. Consultado 10 mar. 2018. Disponible en <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd56/panorama.pdf>
6. Altomare, C.; Norvell, W. A.; Bjorkman, T.; Harman, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Applied Environmental Microbiology. 65(7):2926-2933.
7. Amrutha, P.; Vijayaraghavan, R. 2018. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf blight of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). (en línea). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7(8):622-628. Consultado 18 nov. 2018. Disponible en

<https://www.ijcmas.com/7-8-2018/P.%20Amrutha%20and%20Reshmy%20Vijayaraghavan.pdf>

8. Avilés, M.; Castillo, S.; Bascon, J.; Zea-Bonilla, T.; Martín-Sánchez, P. M.; Pérez-Jiménez, R. M. 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. (en línea). Plant Pathology. 57(2):382. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3059.2007.01717.x>
9. Aziz, B. A.; Marzani, Q. A. 2017. Molecular identification and management of *Rhizoctonia fragariae* the pathogen of black root rot of strawberry plant. (en línea). Science Journal of University of Zakho. 5(2):172-177. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://sjuoz.uoz.edu.krd/index.php/sci/article/view/364>
10. Baino, O. M.; Salazar, S. M.; Ramallo, A. C.; Kirschbaum, D. S. 2011. First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in northwestern Argentina. (en línea). Plant Disease. 95(11):1477. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-11-0193>
11. Baker, K.; Cook, R. 1974. Biological control of plants pathogens. San Francisco, USA, Freeman. 433 p.
12. Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as plant growth stimulants. CRC Critical Reviews. 7:97-106.
13. Baker, B.; Zambryski, P.; Staskawicz, B.; Dinesh-Kumar, P. S. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science. 276:726-733.
14. Belanger, R.; Dufuor, N.; Caron, J.; Benhamou, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Biocontrol Science Technology. 5:41-54.
15. Bell, D. K.; Well, H. D.; Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72:379-382.

16. Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M.; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. (en línea). Internacional Microbiology. 7(4):249-260. Consultado 20 abr. 2018. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/im/v7n4/Benitez.pdf>
17. Bi, Y.; Gou, W.; Zhang, G. J.; Liu, S. C.; Yang, B. D. 2017a. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose of strawberry in China. (en línea). Plant Disease. 101(1):250. Consultado 7 may. 2018. disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-06-16-0828-PDN>
18. _____.; _____.; _____.; _____.; Chen, Y. 2017b. First report of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose of strawberry in China. (en línea). Plant Disease. 101(5):832. Consultado 7 may. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-16-1036-PDN>
19. Borrero, C.; Castaño, R.; Avilés, M. 2008. First report of *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain. (en línea). Plant Disease. 102 (6):1178. Consultado 9 ago. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-17-1529-PDN>
20. _____.; Refoyo, A.; Sanz, C.; Avilés, M. 2017. Strawberry cultivar and breeding lines susceptibility to *Phytophthora* crown and root rot in Huelva (Spain). (en línea). Acta Horticulturae. no. 1156:777-779. Consultado 10 jun. 2018. Disponible en http://www.actahort.org/books/1156/1156_114.htm
21. Brayford, D. 1993. *Cylindrocarpon*. In: Singleton, L. L.; Mihail, J. D.; Rush, C. M. eds. Methods for research on Soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul, Minnesota, USA, APS. pp. 103-106.
22. Cabrera, M. 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo. Tesis de Maestría en Biotecnología. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 90 p.
23. Calvo Araya, J. A.; Rivera Coto, G.; Orozco Cayasso, S.; Orozco Rodríguez, R. 2012. Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. (en línea). Agronomía

Mesoamericana. 23(2):225-231. Consultado 26 mar. 2016.
Disponible en http://www.mag.go.cr/rev_meso/v23n02_0225.pdf

24. Carlucci, A.; Lops, F.; Mostert, L.; Halleen, F.; Raimondo, M. L. 2017. Occurrence fungi causing black foot on young grapevines and nursery rootstock plants in Italy. (en línea). *Phytopathologia Mediterranea*. 56(1):10-39. Consultado 21 oct. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=7&sid=6a9f3f0e-78dc-419c-8245-5d1a3f7485e8%40sdc-v-sessmgr06>
25. Chamorro, M.; Domínguez, P.; Medina, J. J.; Miranda, L.; Soria, C.; Romero, F.; López Aranda, J. M.; Daugovich, O.; Mertely, J.; Santos, B. de los. 2015a. Assessment of chemical and biosolarization treatments for the control of *Macrophomina phaseolina* in strawberries. (en línea). *Scientia Horticulturae*. 192:361-368. Consultado 10 jun. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/279804990_Assessment_of_chemical_and_biosolarization_treatments_for_the_control_of_Macrophomina_phaseolina_in_strawberries
26. _____.; Miranda, L.; Domínguez, P.; Medina, J. J.; Soria, C.; Romero, F.; Aranda López, J. M.; Santos, B. de los. 2015b. Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. (en línea). *Crop Protection*. 67:279-286. Consultado 10 jun. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219414003330>
27. _____.; Seijo, T. E.; Noling, J. C.; Santos, B. de los; Peres, N. A. 2016a. Efficacy of fumigant treatments and inoculum placement on control of *Macrophomina phaseolina* in strawberry beds. (en línea). *Crop Protection*. 90:163-169. Consultado 10 jun. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219416302204>
28. _____.; Aguado, A.; Santos, B. de L. 2016b. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. (en línea). *Plant Disease*. 100(7):1495. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>

29. Chang, Y. C.; Baker, R.; Kleifeld, O.; Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease. 70:145-148.
30. Chaverri, P.; Branco Rocha, F.; Jaklitsch, W.; Gazis, R.; Degenkolb, T.; Samuels, G. J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia. 107(3):558-590.
31. Chen, Y.; Zhang, A. F.; Yang, X.; Gu, C. Y.; Kyaw, E. P.; Yi, X. K.; Xu, Y. L. 2016. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing twig blight on highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Anhui province of China. (en línea). Plant Disease. 100 (4):859-860. Consultado 9 ago. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-15-0455-PDN>
32. Chet, I.; Harman, G.; Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbial Ecology. 7:29-38.
33. _____. 1987. *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. In: Chet, I. ed. Innovative Approaches to Plant Disease Control. New York, John Wiley and Sons. pp. 137-160.
34. _____.; Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology. 48:37-43.
35. _____.; _____.; Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, D. T. ed. The Mycota IV: environmental and microbial relationships. Berlin, GE, Springer. pp. 165-184.
36. Corallo, B. 2012. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. antagonistas del patógeno de sorgo *Fusarium nygamai*. Tesis Licenciatura en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. 40 p.
37. Cruz, C. D. 2013. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Acta Scientiarum. 35(3):271-276.

38. De Lucca Agrelo, F. 2015. Caracterización de la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 83 p.
39. Dennis, C.; Webster, J. 1971. Antagonistic Properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hiphal interaction. (en línea). Transactions of the British Mycological Society. 57(3):363-369. Consultado 25 abr. 2018. Disponible en https://ac-els-cdn-com.proxy.timbo.org.uy:88/S0007153671800505/1-s2.0-S0007153671800505-main.pdf?tid=a3976e9e-8226-498f-8d26-ed4fab0097d4&acdnat=1524694564_62f57c876c24b82dd8f22ff3f6d69945
40. Dhingra, O. D.; Sinclair, J. B. 1978. Biology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. Viçosa, Brazil, Universidade Federal de Viçosa. 166 p.
41. Druzhinina, I. S.; Kopchinskiy, A. G.; Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. (en línea). Mycoscience. 47:55-64. Consultado 7 jun. 2019. Disponible en http://www.isth.info/library/pdf/61/isth_library_61.pdf
42. Dung, L.; Thi Dien, N.; Hoang Dai, P.; Ngoc Tuan, P. 2016. The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberries in Dalat. Dalat University Journal of Science. 6(3):364-376.
43. Durak, E. D.; Demirci, E. 2014. Pathogenicity of *Fusarium* species isolated from strawberry plants in Erzurum province. (en línea). Bitki Koruma Bülteni. 54(3):247-253. Consultado 20 jun. 2018. Disponible en <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143365552>
44. Elad, Y.; Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. (en línea). European Journal of Plant Pathology. 105:177-189. Consultado 10 jun. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008753629207>
45. Elías, R.; Arcos, O.; Arbeláez, G. 1993. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos

en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*.
Agronomía Colombiana. 10:52-61.

46. Embaby, E. M.; Ragab, M. E.; Doug, K. A. A. D.; Ahmed, R.; Zveibil, A.; Maymon, M. Freeman, S. 2010. First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose diseases on strawberry in Egypt. (en línea). Plant Pathology. 59(4):808. Consultado 10 oct. 2018. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3059.2009.02251.x>
47. _____.; _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 2012. Identification of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* on strawberry in Egypt. (en línea). International Society for Horticultural Science. 926:657-660. Consultado 20 jun. 2018. Disponible en http://www.actahort.org/books/926/926_95.htm
48. Espinoza, J. G.; Briceño, E. X.; Keithy, L. M.; Latorre, B. A. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. (en línea). Plant Disease. 92(10):1407-1414. Consultado 9 ago. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-92-10-1407>
49. Ezziyyani, M.; Requena, M. E.; Pérez-Sánchez, C.; Egea-Gilabert, C.; Candela, M. E. 2003. Mecanismos de biocontrol de la “tristeza” del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. In: Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal (8º.), Reunión de la Sociedad Española (15º., 2003, Palma de Mallorca). Actas. Palma de Mallorca, España, s.e. s.p.
50. _____.; Pérez, C.; Requena, M. Rubio, L.; Candela M. E. 2004a. Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani, de la podredumbre de pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. (en línea). Anales de Biología. 26:69-78. Consultado 21 abr. 2018. Disponible en <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
51. _____.; _____.; Sid-Ahmed, A.; Requena, M. E.; Candela M. E. 2004b. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*). (en línea). Anales de Biología. 26:35-45.

Consultado 21 abr. 2018. Disponible en
<https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>

52. Fang, X. L.; Phillips, D.; Hua, L.; Sivasithamparam, K.; Barbetti, M. J. 2011a. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect temperature. (en línea). Scientia Horticulturae. 131:39-48. Consultado 30 jul. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/251563599_Comparisons_of_virulence_of_pathogens_associated_with_crown_and_root_diseases_of_strawberry_in_Western_Australia_with_special_reference_to_the_effect_of_temperature
53. _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 2011b. Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia. (en línea). Australasian Plant Pathology. 40(2):109-119. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13313-010-0019-5>
54. Freeman, S.; Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for *anthracnose* and root necrosis of strawberry in Israel. (en línea). Phytopathology. 87(5):516-521. Consultado 10 may. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945106>
55. Gajera, H. P.; Bambharolia, R. P.; Patel, S. V.; Khatrani, T. J.; Goalkiya, B. A. 2012. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: Evaluation of Coiling and Cell Wall Degrading Enzymatic Activities. (en línea). Journal of Plant Pathology Microbiology. 3(7):1-7. Consultado 26 mar. 2016. Disponible en <https://www.omicsonline.org/antagonism-of-trichoderma-spp-against-macrophomina-phaseolina-evaluation-of-coiling-and-cell-wall-degrading-enzymatic-activities-2157-7471.1000149.php?aid=10037>
56. Ghaderi, F. 2012. The role of *Phytophthora cactorum* in decline of hydroponically-grown Strawberry and evaluation of relative resistance of strawberry cultivars to it. (en línea). Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture. 3(9):15-23. Consultado 10 jun. 2018. Disponible en http://ejgcst.iut.ac.ir/browse.php?a_id=311&sid=1&slc_lang=en

57. Giménez, G.; Paullier, J.; Maeso, D. 2003. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla. Montevideo, INIA. 56 p. (Boletín de Divulgación no. 82).
58. _____.; Lenzi, A.; Vicente, E.; Manzoni, A.; Castillo, A. 2015. El primer cultivar de día neutro del INIA: LBK 36.1. Revista INIA. no. 45:29-30.
59. _____.; Vicente, E. 2017. Frutillas. In: González, M.; Giménez, G. eds. Catálogo de cultivos hortícolas. 2ª. ed. Montevideo, INIA. pp. 29-39 (Boletín de Divulgación no. 113).
60. Golzar, H.; Phillips, D.; Mack, S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. (en línea). Australasian Plant Disease Notes. 2(1):145-147. Consultado 15 may. 2018. Disponible en <http://www.publish.csiro.au/DN/fulltext/DN07057>
61. Gómez, D. E.; Bonacic Kresic, I.; Casuso, V. M. 2012. Podredumbre carbonosa. (en línea). INTA. Ficha Técnica no. 1. s.p. Consultado 5 may. 2018. Disponible en <https://inta.gob.ar/documentos/ficha-tecnica-no-1-podredumbre-carbonosa>
62. González, M. 2019. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de mufa por *Sclerotium* en morrón (*Capsicum annuum* L.). Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 45 p.
63. González, P.; Alaniz, S.; Montelongo, M. J.; Rauduvinić, L.; Rebellato, J.; Silvera-Pérez, E. Mondino, P. 2012. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on blueberry in Uruguay. (en línea). Plant Disease. 96(6):914. Consultado 9 ago. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-11-1070-PDN>
64. Gubler, W.; Baumgartner, K.; Browne, G.; Eskalen, A.; Rooney Latham, S.; Petit, E.; Bayramian, A. 2004. Root disease of grapevine in California and their control. Australasian Plant Pathology. 33:157-165.
65. Guédez, C.; Cañizalez, L.; Castillo, C.; Olivar, R. 2012. Evaluación in vitro de aislamiento de *Trichoderma harzianum* para el control de

Rhizoctonia solani, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. (en línea). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32:44-49. Consultado 26 mar. 2016. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/235747375_Evaluacion_in_vitro_de_aislamientos_de_Trichoderma_harzianum_para_el_control_deRhizoctonia_solani_Sclerotium_rolfsii_y_Fusarium_oxysporum_en_plantas_de_tomate

66. Guigón López, C.; Guerrero Prieto, V.; Vargas Albores, F.; Carvajal Millán, E.; Ávila Quezada, G. D.; Bravo Luna, L.; Ruocco, M.; Lanzuise, S.; Woo, S. Lorito, Matteo. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología. 28(2):87-96. Consultado 12 may. 2018. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/612/61218468002.pdf>
67. Hajlaoui, M. R.; Mnari-Hattab, M.; Sayeh, M.; Zarrouk, I.; Jemmali, A.; Koike, S. T. 2015. First report of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of strawberry in Tunisia. (en línea). New Disease Reports. 32:14. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=032014>
68. Halleen, F.; Schroers, H. J.; Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. 2004. Novel species of *Cylindrocarpon*(*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology*. 50:431-455.
69. _____.; Fourie, P. H.; Crous, P. W. 2006. A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 45:S55-S67.
70. Harman, G. 2000. Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* (T-22). *Plant Disease*. 84(4):377-393.
71. _____.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. (en línea). *Nature Reviews Microbiology*. 2(1):43-56. Consultado 2 jun. 2017. Disponible en <https://www.nature.com/articles/nrmicro797>
72. Hemelrijck, W. van; Ceustermans, A.; Campenhout, J. van; Lieten, P.; Bylemans, D. 2017. Crown rot in strawberry caused by

Pestalotiopsis. (en línea). Acta Horticulturae. no. 1156:781-785.
Consultado 10 de abr 2018. Disponible en
http://www.actahort.org/books/1156/1156_115.htm

73. Hetman, B. 2001. Fungi colonizing roots of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio EEE, Horticultura. 9:85-97.
74. Hjeljord, L.; Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman, G.; Kubicek, C. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. v.2, pp. 131-151.
75. Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 90:248-252.
76. _____. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology. 92:177-180.
77. _____. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: the History and Evolution of Current Concepts. (en línea). Plant Disease. 87(1):4-10.
Consultado 20 abr. 2018. Disponible en
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
78. Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. (en línea). Revista de Protección Vegetal. 24(1):14-21. Consultado 20 abr. 2017. Disponible en
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
79. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, UY). 2016. Cultivares de frutilla en el litoral Norte: presentación. (en línea). Salto Grande. s.p. Consultado 18 abr. 2018. Disponible en
http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Salto%20Grande/2016/2016_10_27_Cultivares_Frutilla/2016_10_27_Reunion_FrutillaN48.3yPlantas.pdf

80. Ishiguro, Y.; Otsubo, K.; Watanabe, H.; Suzuki, M.; Nakayama, K.; Fukuda, T.; Fujinaga, M.; Suga, H.; Kageyama, K. 2014. Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. (en línea). Journal of General Plant Pathology. 80(5):423-429. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=12&sid=ef3dc852-4d4f-4cfd-ba55-56697267b449%40sessionmgr4007>
81. Jaklitsch, W. M.; Voglmayr, H. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in southern Europe and Macaronesia. (en línea). Studies in Mycology. 80:75-76. Consultado 1 dic. 2019. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4779795/>
82. Khaledi, N.; Taheri, P. 2016. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. (en línea). Journal of Plant Protection Research. 56(1):21-31. Consultado 18 oct. 2018. Disponible en <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/jppr.2016.56.issue-1/jppr-2016-0004/jppr-2016-0004.pdf>
83. Koike, S. T. 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. (en línea). Plant Disease. 92(8):1253. Consultado 20 ago. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-92-8-1253B>
84. Larralde Corona, C. P.; Santiago Mena, M. R.; Sifuentes Rincón, A. M.; Rodríguez Luna, I. C.; Rodríguez Pérez, M. A.; Shirai, K.; Narváez Zapata, J. A. 2008. Biocontrol potencial and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. (en línea). Applied Microbiology and Biotechnology. 80(1):167-177. Consultado 15 jul. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523764>
85. Laugale, V.; Morocko, I.; Petrevica, L. 2004. Problems for strawberry culture in Latvia. (en línea). Bulletin OILB/SROP. 27(4):37-40. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=8&sid=29d61278-c760-4c09-89dc-eaaa4a2a15ca%40pdc-v-sessmgr01&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#AN=20043147122&db=lbh>

86. Lo, C. T.; Nelson, E. B.; Hayes, C. K.; Harman, G. E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. (en línea). Phytopathology. 88(2):129-136. Consultado 15 jul. 2018. Disponible en http://www.plantpath.cornell.edu/labs/enelson/PDFs/Lo_et_al_1998.pdf
87. Lombard, L.; Van Der Merwe, N. A.; Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. 2014. Lineages in *Nectriaceae*: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. (en línea). Phytopathologia Mediterranea. 53(3):515-532. Consultado 21 oct. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=10&sid=6a9f3f0e-78dc-419c-8245-5d1a3f7485e8%40sdc-v-sessmgr06>
88. Maas, J. L. 1998. Compendium of strawberry diseases. 2nd. ed. St. Paul, Minnesota, APS. 98 p.
89. Machín Barreiro, J. A. 2017. Identificación de los organismos asociados a la muerte de plantas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) en el departamento de Salto, Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 41 p.
90. _____; González, P.; Vicente, E.; Sánchez, M.; Estelda, C.; Ghelfi, J.; Silvera Pérez, E. 2019. First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on Strawberry in Uruguay. (en línea). Plant Disease. 103(11):2946. Consultado 10 nov. 2019. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN>
91. Madriz, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. (en línea). Manejo Integrado de Plagas. no. 63:22-32. Consultado 1 oct. 2019. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2097E/A2097E.PDF>
92. Manici, L. M.; Caputo, F.; Baruzzi, G. 2005. Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. (en línea). Annals of Applied Biology. 146(4):421-431. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=11&sid=29d61278-c760-4c09-89dc-eaaa4a2a15ca%40pdc-v-sessmgr01>

93. Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. (en línea). Revista Protección Vegetal. 28(1):1-11. Consultado 20 mar. 2018. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
94. Mertely, J.; Seijo, T.; Peres, N. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. (en línea). Plant Disease. 89(4):434. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PD-89-0434A>
95. Metcalf, D. A.; Wilson, C. R. 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. (en línea). Plant Pathology. 50:249-257. Consultado 15 jul. 2018. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-3059.2001.00549.x>
96. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2017. Anuario estadístico agropecuario 2017. Montevideo. 214 p.
97. _____. DIGEGRA.; IMM. CAMM (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General de la Granja, UY; Intendencia Municipal de Montevideo. Comisión Administradora del Mercado Modelo, UY). 2015. Observatorio granjero: informe semanal de precios e ingresos al Mercado Modelo. Información correspondiente a la semana del 18 al 24 julio de 2015. (en línea). Montevideo. 3 p. Consultado 11 abr. 2016. Disponible en http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=d5e745f4-407a-4fa5-9dbb-9618a9374d76&groupId=42766
98. _____. _____. _____. _____. 2017. Situación y perspectivas de productos hortícolas en el departamento de Salto. (en línea). Montevideo. 8 p. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=3d9f593b-569d-44df-8e62-f3a6f9dd9b29&groupId=42766
99. Mondino, P.; Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 158 p.
100. _____.; Altier, N.; Vero, S.; Pereyra, S.; Folch, C. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en Uruguay. In: Bettiol, W.;

Rivera, M. C.; Mondino, P.; Montealegre, J. R.; Colmenárez, Y. C. eds. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 339-368.

101. Morocco, I.; Fatehi, J.; Gerhardson, B. 2006. *Gnomonia fragariae*, a cause of strawberry root rot and petiole blight. (en línea). European Journal of Plant Pathology. 114(3):235-244. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-005-5282-x>
102. Myeong Hyeon, N.; Myung Soo, P.; Hyun Sook, K.; Tae il, K.; Eun Mo, L.; Jong Dae, P.; Hong Gi, K. 2016. First report of dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* in strawberry plants in Korea. (en línea). Mycobiology. 44(4):319-324. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=4&sid=13190fd0-e10a-415a-a165-535515305e4e%40sessionmgr101>
103. NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, US). s.f. Taxonomy Browser. (en línea). Bethesda. s.p. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
104. Obregón, V. G.; Meneguzzi, N. G.; Ibañez, J. M.; Lattar, T. E.; Kirschbaum, D. S. 2018. First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina. (en línea). Plant Disease. 102(9):1856. Consultado 6 set. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN?prevSearch=%24%7BresultBean.text%7D&searchHistoryKey=%24%7BsearchHistoryKey%7D>
105. Paolocci, F.; Rubini, A.; Granetti, B.; Arcioni, S. 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. (en línea). FEMS Microbiology Ecology. 28:23-30. Consultado 25 abr. 2018. Disponible en <https://academic.oup.com/femsec/article/28/1/23/433929>
106. Pastrana, A. M.; Capote, N.; Santos, B. de los; Romero, F.; Basallote-Ureba, M. J. 2014. First report of *Fusarium solani* causing crown and root rot on strawberry crops in southwestern Spain. (en línea). Plant Disease. 98 (1):161. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-07-13-0682-PDN>

107. _____.; Basallote-Ureba, M. J.; Aguado, A.; Akdi, K.; Capote, N. 2016. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. (en línea). *Phytopathologia Mediterranea*. 55(1):109-120. Consultado 1 oct. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=6&sid=04cf5be8-adce-4ec1-8455-597a9a90821b%40sdc-v-sessmgr06>
108. Paulus, A. O. 1990. Fungal diseases of strawberry. (en línea). *HortScience*. 25(8):885-889. Consultado 15 jul. 2018. Disponible en <http://hortsci.ashspublications.org/content/25/8/885.full.pdf>
109. Pérez, C. A.; Villar, H. A. 2011. Control biológico en cultivos extensivos: cuando el enfoque condiciona al éxito. *In*: Pereyra, S.; Díaz de Ackermann, M.; Germán, S.; Cabrera, K. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. Montevideo, INIA. pp. 49-62 (Serie Técnica no. 189).
110. Petit, E.; Barriault, E.; Baumgartner, E.; Wilcox, W. F.; Rolshausen, P. E. 2011. *Cylindrocarpon* species associated with black-foot of grapevine in northeastern United States and southeastern Canada. (en línea). *American Journal of Enology and Viticulture*. 62(2):177-183. Consultado 21 oct. 2018. Disponible en <http://www.ajevonline.org/content/62/2/177>
111. Phillips, A. J. L.; Alves, A.; Correia, A.; Luque, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. (en línea). *Mycologia*. 97(2):513-529. Consultado 13 set. 2018. Disponible en <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15572536.2006.11832826>
112. Rebellato, L. H.; Monteiro, C. 1987. El fenómeno de la muerte de plantas de frutilla en el Uruguay. *In*: Jornadas Nacionales de Horticultura (1^{as.}, 1987, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, s.e. s.p.
113. Rego, C.; Oliveira, H.; Carvalho, A.; Phillips, A. 2000. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with

grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*. 39:76-79.

114. Reyes, Y.; Martínez, B.; Infante, D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. (en línea). *Revista Protección Vegetal*. 23(2):112-117. Consultado 26 mar. 2016. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v23n2/rpv08208.pdf>
115. Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Micological Paper*. 116:1-56.
116. Samuel, G. J.; Hebbar, P. K. 2015. *Trichoderma Identification and Agricultural Applications*. St. Paul, Minnesota, USA, APS. 196 p.
117. Sánchez, S.; Gambardella, M.; Henríquez, J. L.; Díaz, I. 2013. First report of crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. (en línea). *Plant Disease*. 97(7):996. Consultado 10 de abr 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-12-12-1121-PDN>
118. _____.; Henríquez, J. L.; Urcola, L. A.; Scott, A.; Gambardella, M. 2016. Susceptibility of strawberry cultivars to root and crown rot caused by *Macrophomina phaseolina*. (en línea). *Journal of Berry Research*. 6(3):345-354. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=7&sid=68c7d9bb-8dad-4383-8516-07b0c31a9617%40sessionmgr4009>
119. Sánchez-García, B. M.; Espinosa-Huerta, E.; Villordo-Pineda, E.; Rodríguez-Guerra, R.; Mora-Avilés, M. A. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. (en línea). *Agrociencia*. 51(1):63-79. Consultado 1 oct. 2017. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/302/30249773006.pdf>
120. Sandhu, A.; Singh, R. D.; Sandhu, A. 1999. Factors influencing susceptibility of cowpea to *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Mycological Plant Pathology*. 29:421-424.
121. Santos García de Paredes, B. de los; Romero Muñoz, F. 1999. Occurrence of *Colletotrichum acutatum*, causal organism of

strawberry anthracnose in southwestern Spain. (en línea). Plant Disease. 83(3):301. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.1999.83.3.301C>

122. _____.; _____. 2002. Influence of anthracnose epiphytotic development on strawberry fruit production in Huelva (Southwestern Spain). Acta Horticulturae. no. 567:623-626.
123. Santos, R. F. dos; Heckler, L. I.; Lazarotto, M.; Ressurreição Garrido, L. da; Rego, C.; Blume, E. 2016. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. (en línea). Phytopathologia Mediterranea. 55(2):293-300. Consultado 19 oct. 2018. Disponible en <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=7&sid=0a208799-0f56-4dc8-8a67-7361d9a5720e%40sessionmgr4007>
124. Sharifi, K.; Mahdavi, M. 2011. First report of strawberry crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Iran. (en línea). Iranian Journal of Plant Pathology. 47(4):479-480. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en http://www.ijpp.ir/article_16404_en.html
125. Short, G. E.; Wyllie, T. D. 1978. Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology. 68:742-746.
126. Sid Ahmed, A.; Pérez Sánchez, C.; Candela, M. E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. (en línea). European Journal of Plant Pathology. 106(9):817-824. Consultado 19 oct. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008780022925>
127. Silveira, A. C.; Gepp, V.; Pérez, E. 2001. Aislamiento y selección de hongos antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Reunião de Controle Biológicos de Fitopatógenos (7º., 2001, Bento Gonçalves). Relatório. Bento Gonçalves, Brasil, s.e. s.p.
128. _____.; _____.; _____. 2003. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Uruguayan vegetable crops. In: International Congress of Plant Pathology (8th, 2003, Christchurch). Proceedings. Christchurch, New Zealand, s.e. s.p.

129. Stefanova, M.; Leiva, A.; Larrinaga, L.; Coronado, M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. (en línea). Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ). 16(5):509-516. Consultado 14 set. 2018. Disponible en <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/11831/11820>
130. Sutton, J. C.; Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology. 83:615-621.
131. Tanaka, M. A. de S.; Ito, M. F.; Passos, F. A. 1995. Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* to strawberry. (en línea). Bragantia. 54(2):319-324. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87051995000200010&script=sci_arttext&tlng=pt
132. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics análisis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. (en línea). Molecular Biology and Evolution. 28(10):2731-2739. Consultado 13 set. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>
133. Tovar Castaño, J. C. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista “*in vivo*” de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. (en línea). Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 81 p. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>
134. Valencia, H.; Sánchez, J.; Valero, N. 2005. Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfato presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del Páramo el Granizo. In: Bonilla, M. ed. Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá, Unibiblos. pp. 177-193.
135. Vicente, E.; Manzoni, A.; Arruabarrena, A.; Varela, P.; González, M.; De Hegedüs, P. 2018. Alternativas para enfrentar la mortandad de plantas de frutilla en la zona de Salto. Un desafío para el sistema de innovación regional. Revista INIA. no. 53:42-47.

136. _____.; _____.; Giambiasi, M.; Lado, J.; Varela, P.; Arruabarrena, A.; Silvera, E.; Machín, A.; González Arcos, M. 2019. La búsqueda de variedades de frutilla adaptadas al nuevo escenario de la zona de Salto. Revista INIA. no. 57:18-22.
137. Villegas, B.; Castaño, J. 1999. Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma* spp. para el control de *Phytophthora cactorum*, causante de la pudrición de la corona y raíz de manzano en Caldas. (en línea). Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia. s.p. (Fitopatología no. 32). Consultado 29 abr. 2018. Disponible en <http://ciagrope.tripod.com/fitote32.html>
138. Weber, R. W. S.; Entrop, A. P. 2017. *Dactylonectria torresensis* as the main component of the black root rot complex of strawberries and raspberries in northern Germany. (en línea). Erwerbsobstbau. 59(3):157-169. Consultado 20 ago. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s10341-017-0343-9>
139. Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology. 22:837-845.
140. _____. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology. 24(11):1153-1179.
141. Windham, M. T.; Elad, Y.; Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology. 76:518-521.
142. Yang Sook, L.; Ki Chae, J.; Seung Han, K.; Sun Do, B. 1998. Crown rot of strawberry (*Fragaria ananassa*) caused by *Phytophthora cactorum*. (en línea). Korean Journal of plant Pathology. 14(6):735-737. Consultado 19 oct. 2018. Disponible en http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=SMBRDX_1998_v14n6_735&ordernum=38
143. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 65(3):1061-1070. Consultado 15 oct.

2018. Disponible en
<https://aem.asm.org/content/aem/65/3/1061.full.pdf>

144. Yildiz, A.; Benlioglu, K.; Benlioglu, H. S. 2014. First report of strawberry dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae*. (en línea). Plant Disease. 98(11):1579. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-11-13-1192-PDN>
145. Zhong, S.; Xu, J. M.; Yin, S. L.; Zhang, G. Z. 2016. First report of root rot on strawberry caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China. (en línea). Plant Disease. 100(1):225. Consultado 18 ago. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-03-15-0326-PDN>
146. Zveibil, A.; Freeman, S. 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. (en línea). Plant Disease. 89(9):1014. Consultado 10 abr. 2018. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PD-89-1014C>