

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Trichoderma spp.* PARA EL CONTROL DE
LA MUFA POR SCLERTOIUM EN MORRÓN (*Capsicum annuum L.*)

por

Marcela Vivianne GONZÁLEZ BARRIOS

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniera Agrónoma.

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. MSc. Pablo González Rabelino

Ing. Agr. Dra. Elisa Silvera

Ing. Agr. Dr. Pedro Mondino

Fecha: 10 de junio de 2019

Autora: -----

Marcela Vivianne González Barrios

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Pablo González Rabelino y Guillermo Galván, por acompañarme en los últimos años de la carrera, por confiar en mí y sobre todo por su apoyo en la etapa de campo de este trabajo y en el proceso de escritura. A Elisa Silvera por su buena disposición siempre y por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Pablo y María Noel, por ser siempre mi ejemplo, por estar siempre acompañándome en este proceso y por darme el mejor título, siendo la tía de Julia.

Agradezco a mis padres por enseñarme a vivir con libertad, por ayudarme a tomar siempre las decisiones que me hicieran feliz, y sobre todo por vivir y disfrutar este recorrido conmigo.

A mis amigos de siempre, que sin entender muchas veces, nunca me dejaron bajar los brazos. A los amigos que me dio Facultad, que hicieron esta etapa mucho más disfrutable.

Y para finalizar, a los compañeros del laboratorio de Fitopatología y a los compañeros del CRS, por su ayuda en el trabajo de campo y acompañamiento en la escritura de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
 1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 EL CULTIVO DE MORRÓN (<i>Capsicum annuum</i>)	2
2.2 ENFERMEDADES DE MORRÓN ASOCIADAS A PATÓGENOS DE SUELO	2
2.2.1 <u>Mufa causada por <i>Sclerotium rolfsii</i> (Sacc.)</u>	3
2.3 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA MUFA.....	5
2.3.1 <u>Control cultural</u>	5
2.3.2 <u>Control físico</u>	5
2.3.3 <u>Control químico</u>	6
2.3.4 <u>Control biológico</u>	6
2.4 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE <i>Trichoderma</i> spp.	7
2.5 <i>Trichoderma</i> spp. COMO AGENTE DE BIOCONTROL	8
2.5.1 <u>Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.</u>	8
2.5.1.1 Competencia.....	9
2.5.1.2 Micoparasitismo.....	9
2.5.1.3 Antibiosis.....	11
2.6 <i>Trichoderma</i> spp. COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO.....	11
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	13
3.1 ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS	13
3.2 CULTIVO DUAL.....	13
3.2.1 <u>Inhibición de crecimiento radial</u>	14
3.2.2 <u>Capacidad antagónica</u>	14
3.3 CONTROL BIOLÓGICO DE MUFA EN PLANTAS DE MORRÓN.....	15
3.3.1 <u>Producción del inóculo</u>	15
3.3.2 <u>Evaluación in vivo de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp</u> ..	15
3.3.3 <u>Evaluación de <i>Trichoderma</i> como promotor de crecimiento</u>	16
3.4.1 <u>Extracción de ADN</u>	16
3.4.2 <u>Amplificación por PCR y secuenciación</u>	17
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	19
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	20

4.1 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL DE LOS PATÓGENOS EN CULTIVOS DUALES Y COLONIZACIÓN	20
4.2 EVALUACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD.....	22
4.2.1 <u>Muerte de plantas por <i>Sclerotium rolfsii</i></u>	22
4.2.2 <u>Trichoderma spp. como promotor del crecimiento</u>	25
4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	27
5. <u>CONCLUSIONES</u>	28
6. <u>RESUMEN</u>	29
7. <u>SUMMARY</u>	30
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	31

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1.Escala de colonización y esporulación de los aislados de <i>Trichoderma spp.</i> sobre las colonias del patógeno.	14
2.Características de los cebadores ITS, EF 1- α	18
3.Porcentaje de inhibición del crecimiento radial y colonización.	21
4.Incidencia de la Mufa por sclerotium en plantas de morrón tratadas con <i>Trichoderma</i>	23
5.Número de hojas promedio de las plantas en diferentes tratamientos.....	25
6.Altura de plantas (cm)	25
7.Diámetro de la base de tallos (cm).....	26
8.Peso en materia fresca (g), peso en materia seca (g) y % de materia seca ..	26
9.Especies de <i>Trichoderma</i> , identificados por amplificación de los espaciadores transcritos internos ITS 1-4 y EF1- α	27
Figura No.	
1.Colonización y esporulación de los aislados de <i>Trichoderma</i> Tr35 (a), <i>T.</i> TA89 (b), <i>T.</i> S30 (c), patógeno sin <i>T.</i> (d).....	22
2.Marchitamiento (a) y necrosis en la base del tallo con esclerotos y micelio de <i>Sclerotium rolfsii</i> (b).....	24

1. INTRODUCCIÓN

La producción de morrón (*Capsicum annuum* L.) ocupa el décimo lugar en cuanto a volumen de ingreso en el Mercado Modelo, y el sexto lugar según el monto comercializado en la producción de hortalizas en Uruguay. Esta producción tiene como objetivo el abastecimiento del mercado interno, siendo el volumen comercializado un 3,2% del total de frutas y hortalizas (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2016).

Cazzulo y Geraldí (2017) afirman que *Sclerotium rolfsii* es el agente causal del 1.7% del total de muertes en plantas de morrón en Uruguay, afectando la base de tallos y el sistema radicular. En horticultura el manejo convencional es el más utilizado, basándose en el uso de fungicidas para el control de la mufa por *Sclerotium*. No existen productos disponibles que permitan un control eficiente de este patógeno. Por otro lado existe una tendencia en el mundo a disminuir la utilización de productos de síntesis química por su efecto negativo en el ambiente y los residuos que permanecen en los productos finales.

Microorganismos utilizados en control biológico, han mostrado resultados positivos en el manejo de enfermedades de cultivos hortícolas. *Trichoderma spp.* es el agente de control biológico más utilizado, empleándose en diversos patosistemas. El antagonista, presenta la capacidad de competir por espacio, nutrientes y la colonización de diferentes ambientes. Asimismo permite la protección contra infecciones al sistema radical y la resistencia a metabolitos tóxicos en respuesta a la invasión de un organismo extraño. Castro y Revilas, citados por Candellero et al. (2015) afirman que dicha capacidad también tiene un efecto inductor sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido a la formación de sideróforos de hierro, y la presencia de hormonas reguladoras de crecimiento que actúan como estimulantes en tejidos meristemáticos primarios en partes jóvenes.

En Uruguay, hay escasos antecedentes de investigación sobre los agentes de biocontrol para el control de enfermedades producidas por patógenos de suelo.

En este contexto, se plantea como objetivo evaluar diferentes cepas de *Trichoderma spp.*, en el control de la mufa por *Sclerotium* en morrón y su efecto en la promoción del crecimiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 EL CULTIVO DE MORRÓN (*Capsicum annuum*)

El género *Capsicum* es originario del continente americano y se identifica a México como su centro de origen. Contiene alrededor de 25 especies, siendo los *Capsicum* más cultivados: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. pendulum* Willd., *C. pubescens* R. & P. En Uruguay, la especie preferentemente cultivada es *Capsicum annuum* (FAO, 2009).

En Uruguay se cultivan hortalizas en todo el territorio, aunque la producción comercial se concentra fundamentalmente en dos zonas: sur (Montevideo, Canelones y San José) y litoral norte (Salto y Bella Unión, MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2015b, 2016).

La producción hortícola en el sur del Uruguay comprende 7.974 hectáreas de cultivo a campo y 281 hectáreas de cultivo protegido. El rendimiento total obtenido es de 91.9 mil toneladas y 14.5 mil toneladas respectivamente. Los principales cultivos son: tomate, cebolla, boniato, zanahoria, morrón y zapallo kabutiá. Los cultivos de tomate y morrón son los principales cultivos de hortalizas de fruto en el país, con una superficie destinada en la zona sur de 507 hectáreas en la producción a campo y protegido (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2015). Según las encuestas hortícolas (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2016), la producción de morrón en 2016 fue estimada en 14,5 mil toneladas (rendimiento promedio de 9 kg/m²), destacando que la zona litoral norte es la principal proveedora de este producto con el 73% de la oferta, a partir de cultivos protegidos con producción en invierno y primavera.

2.2 ENFERMEDADES DEL MORRÓN ASOCIADAS A PATÓGENOS DE SUELO

La muerte de plantas de morrón se asocia generalmente a patógenos de suelo. Los más importantes son *Phytophthora capsici*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* spp., *Sclerotium rolfsii* y *Meloidogyne* spp. (Pernezny et al., 2003).

Cazzulo y Geraldi (2017) indicaron que de 35.079 plantas relevadas en cultivos protegidos de morrón en la zafra 2015/2016, 10.2% murieron. Los principales agentes asociados a esto fueron *Phytophthora* spp. (3.2%), *Sclerotium rolfsii* (1.7%), *Meloidogyne* spp. (3.8%) y *Fusarium* spp. (1.1%).

2.2.1 Mufa causada por *Sclerotium rolfsii* (Sacc.)

Sclerotium rolfsii Sacc. es un hongo fitopatógeno habitante del suelo, con un amplio rango de huéspedes, se conocen alrededor de 500 hospedadores en los que causa podredumbres de raíz y cuello (González, 2013). Su distribución es mundial, con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Ataca plántulas, plantas herbáceas, plantas leñosas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo (Aycok, 1966).

Los primeros síntomas aparecen en las zonas de las plantas en contacto con el suelo. Inicialmente se observan zonas de tejido de color marrón que evoluciona a una podredumbre blanda, acuosa. La zona afectada se extiende hacia arriba por el tallo y hacia abajo por las raíces. Posteriormente sobre la zona afectada se observa aparición de micelio blanco y sobre éste la formación de esclerotos esféricos. Como síntomas secundarios las plantas afectadas muestran amarillamiento de las hojas y marchitez debidas a la obstrucción del transporte de agua y nutrientes. Finalmente la planta se muere.

S. rolfsii integra la división Basidiomycete, perteneciente a la clase Hymenomycetes, orden Aphyllochorales y el género *Athelia* (Agrios, 2007).

Su variabilidad morfológica se ha demostrado a través de cultivos monobasidiospóricos en Papa Agar Dextrosa (PDA) (Punja y Grogan, 1983); además, se ha visto que los medios de cultivo y la temperatura pueden influir tanto en la morfología del micelio como en la producción de esclerotos (Punja y Damiani, 1996).

Produce dos tipos de hifas, unas grandes, rectas, con 1 o más fíbulas en cada tabique (carácter distintivo para su identificación al microscopio); y otras finas sin conexiones (Pernezny et al., 2003). El micelio es abundante de color blanco, velloso, ramificado y comúnmente estéril (no produce esporas) (Pernezny et al. 2003, Agrios 2007). Sobre el micelio, se producen esclerotos (estructuras de resistencia), de color blanco al inicio pasando a color café oscuro al final, siendo estos de tipo globosos o irregulares y compactos. A menudo se encuentran en la médula de los tallos o pedicelos de las plantas (Agrios, 2007).

El rango de temperatura para el crecimiento de hifas y producción de peso seco es de 8-40°C, dándose el máximo crecimiento y formación de esclerotos a 27-30°C. La tasa de crecimiento lineal de las hifas en medio agar se da a 27-30°C y varía de 0,85 a 0,97 mm por hora, dependiendo del

aislamiento. Las bajas concentraciones de oxígeno limitan el crecimiento del micelio, así como también inhiben la formación de los esclerotos, aunque se desconocen los mecanismos presentes en esta inhibición (Punja, 1985).

La luz continua, (especialmente la luz azul) aumenta la tasa de crecimiento y formación de esclerotos en cultivos de *S. rolfii* comparado a condiciones de oscuridad. Esto puede explicar la mayor presencia de esclerotos en la superficie del suelo que en las capas más profundas (Punja, 1985).

El patógeno crece, sobrevive e infecta los tejidos que están próximos a la superficie del suelo, debido a las temperaturas más favorables, y al mayor abastecimiento de sustancias orgánicas que el hongo utiliza para alimentarse y quizá a que hay una menor competencia o antagonismo con otros organismos del suelo (Agrios, 2007).

El patógeno inverna en forma de esclerotos y micelio en los tejidos infectados o restos de plantas. Las principales formas de diseminación son a través del agua, el suelo infestado, las herramientas contaminadas, las plántulas de trasplante infectadas, o en forma de esclerotos mezclados con las semillas (Agrios, 2007).

Una vez que se ha establecido en las plantas, el hongo avanza formando micelio y esclerotos con gran rapidez, especialmente cuando la humedad y la temperatura son óptimas. La masa de micelio mata y desintegra los tejidos vegetales al secretar ácido oxálico, enzimas pectinolíticas, celulolíticas y otras enzimas. Los esclerotos del hongo aparecen generalmente en grandes cantidades, adheridos a la base de los tallos de las plantas afectadas, junto con masas de micelios (Agrios, 2007).

La fluctuación de la temperatura puede afectar tanto la forma como el tamaño de los esclerotos (Punja, 1985), mientras que su crecimiento se ve favorecido por una alta humedad del suelo (Pernezny et al., 2003). Sin embargo, según Beute et al. (1981), el micelio de *S. rolfii* muere rápidamente en suelos húmedos, pero sobrevive por al menos seis meses en suelos secos.

El pH del suelo afecta el crecimiento del patógeno, dándose un crecimiento óptimo con valores entre 3 y 5 e inhibiéndose la germinación de los esclerotos a pH mayores a 7 (Pernezny et al., 2003).

2.3 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA MUFA

El control de la enfermedad resulta complejo, debido a que puede atacar a un gran número de especies de plantas (Jenkins y Averre, 1986) y produce esclerotos que sobreviven en el suelo por muchos años (Brown y Henry, 1980). La severidad del ataque de este hongo puede reducirse mediante prácticas culturales (Beebe, 1981), solarización (Jenkins y Averre, 1986), control químico (Punja et al., 1982) y control biológico (Wells et al., 1972).

2.3.1 Control cultural

La principal medida de manejo que se debe realizar es evitar daños en las plantas durante el cultivo, la eliminación de plantas enfermas y generar un amplio espaciamiento entre plantas para evitar follajes densos, para así disminuir la incidencia de *S. rolfsii* (Jenkins y Averre 1986, Pernezny et al. 2003).

Dado que *S. rolfsii* tiene un amplio rango de hospederos y puede persistir en prácticamente todo tipo de residuos de cultivos, la rotación no es un método de control efectivo o práctico. Algunos cultivos no afectados por el patógeno, como el maíz, pueden mostrar resultados positivos cuando se colocan dentro de la rotación, ya que al bajar los niveles de inóculo, disminuye la incidencia de la enfermedad en los años subsiguiente (Punja, 1985).

2.3.2 Control físico

La solarización del suelo, es un método de control físico de patógenos, que se ha presentado como alternativa viable para diferentes cultivos afectados con *S. rolfsii*. Consiste en cubrir el suelo, previamente humedecido a capacidad de campo, con un plástico transparente durante el período de mayor radiación solar. Las temperaturas altas causan un aumento de compuestos orgánicos solubles en los esclerotos, produciendo grietas en las superficies de estos, resultando en mayor colonización por antagonistas, y la consecuente disminución de la incidencia de la enfermedad en el cultivo (Ghini et al., 1997).

2.3.3 Control químico

En las décadas de los 60 y 70 el control químico pasó a tener una gran relevancia como método de control de plagas, basándose en la utilización de sustancias de síntesis químicas. Esto sucedió como consecuencia al bajo costo de los insumos con relación a los beneficios obtenidos, la disponibilidad de producto, la facilidad de aplicación, y la efectividad que se logra alcanzar.

El control de la mufa por *Sclerotium* se basa en la utilización de fungicidas en altas dosis. Elad et al. (1980) comprobaron que el metam sodio limita la incidencia de la enfermedad, por ser este compuesto tóxico para los esclerotos. A pesar de esto, su uso no es recomendado debido a que la utilización de agrotóxicos para el control de enfermedades radicales puede ocasionar gran impacto en el medio ambiente, contaminando sábanas freáticas, causando desequilibrios en las poblaciones microbianas en el suelo, acarreado el surgimiento de nuevas razas de patógenos o la aparición de otros que se mantenían en equilibrio (Schwan-Estrada et al., 2000)

2.3.4 Control biológico

Las pocas alternativas encontradas para el control de la mufa por *Sclerotium*, incentivan la búsqueda de otros métodos efectivos y no perjudiciales, que posibiliten un buen control de la enfermedad. Una opción en actual expansión, es el empleo de microorganismos antagónicos competitivos, utilizados para proteger los cultivos de patógenos fúngicos del suelo. En particular las especies del género *Trichoderma* son las más utilizadas y estudiadas (Stefanova et al. 1999, Stefanova 2000).

Los antagonistas contribuyen a la disminución de daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permiten ejercer su efecto biorregulador, además de la capacidad de multiplicarse abundantemente. Estas características son de suma importancia para su selección como agentes de control biológico (Fernández, 2001).

En Uruguay, Folch y Baraibar (1995) lograron resultados positivos al disminuir el nivel de ataque y la severidad de mufa por *Sclerotium* en ajo, combinando aplicaciones de *Trichoderma spp.* con el fungicida Moncut.

2.4 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* ha sido estudiado durante mucho tiempo entre otras cosas por su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en muchos sustratos, control en un amplio rango de patógenos, acción como micoparásito, alta competencia por alimento y espacio y nula capacidad para atacar plantas superiores (Papavizas et al. 1982, Villegas 2005).

Las especies fúngicas pertenecientes al género *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.

A las especies de *Trichoderma* en su gran mayoría son no se les conoce su estado sexual (Howell, 2003). Cuando el estado sexual está presente, se clasifica como Hypocreales, Hypocreaceae, teleomorfo Hypocrea, los cuales son hongos de la división Ascomycota, saprofitos que están presentes en casi todos los suelos y sobreviven en diferentes concentraciones de materia orgánica, pero también pueden desarrollarse en otros hábitats, encontrándose sobre material orgánico en descomposición, creciendo en madera muerta, corteza, estiércol, otros hongos, materiales de construcción y animales, demostrando gran oportunidad potencial y adaptación a las diferentes condiciones ecológicas (Grondona et al. 1997, Klein y Eveleigh 1998, Villegas 2005, Infante et al. 2009, Druzhinina et al. 2011).

Generalmente las colonias de *Trichoderma* inicialmente presentan color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino. Presentan conidióforos complejos y ramificados en forma piramidal o cónica, dando origen a estigmas, con extremos ahusados. Al microscopio, las fiálides se observan más estrechas en la base que en la parte superior (Barnett y Hunter, 1982). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Harman, 2000).

Presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Stefanova et al., 1999).

También las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-

30 °C). Debido a esto se dice, que las especies de *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Díaz, 1994).

2.5 *Trichoderma* spp. COMO AGENTE DE BIOCONTROL

El potencial de las especies del género *Trichoderma* como agente de biocontrol fue registrado en la década de 1930 (Howell, 2003).

La capacidad como antagonista de *Trichoderma* es altamente variable. Mihuta-Grimm y Rowe demostraron que las cepas nativas de un lugar son más efectivas que las introducidas. Esta capacidad depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción; es decir pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno que de otro; por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada (Martínez et al., 2008).

Martínez-Scott (2016), evaluó el comportamiento antagónico de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* y *Phymatotrichopsis omnivora*, cuatro patógenos del suelo, concluyendo que el uso de *Trichoderma* es una alternativa sustentable y eficiente para el control de estos patógenos.

Arias y Duarte (2006), demostraron que las especies de *Trichoderma harzianum* y *koningii*, logran aumentar significativamente el porcentaje de germinación de semillas de morrón a un 96%, respecto al porcentaje de germinación del testigo sin antagonista, el cual fue de un 75%, en un sustrato inoculado con *S. rolfsii*.

2.5.1 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Trichoderma puede ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente, compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa o produciendo antibióticos. También pueden realizar ese biocontrol directamente, mediante micoparasitismo. Estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada y su importancia en los procesos de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, del hongo al que antagoniza, del tipo de cultivo y de condiciones ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura o la concentración de hierro. La activación de

cada uno de los mecanismos implica la producción de metabolitos y compuestos específicos tales como factores de crecimiento de plantas, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos y permeasas de carbono y nitrógeno (Benítez et al., 2004).

2.5.1.1 Competencia

Según Ahmad et al. (1987) se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), cuando la utilización de alguno de estos reduce la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad.

La inanición es la causa más común de muerte de los microorganismos, por lo que la competencia por limitar los nutrientes da como resultado el control biológico de los fitopatógenos fúngicos (Chet et al., 1997).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos (Stefanova, 1999).

Trichoderma tiene una capacidad superior para movilizar y absorber los nutrientes del suelo en comparación con otros organismos. El uso eficiente de los nutrientes disponibles se basa en la capacidad de *Trichoderma* para obtener ATP del metabolismo de diferentes azúcares, como los derivados de polímeros muy difundidos en ambientes fúngicos: celulosa, glucano y quitina, entre otros (Chet et al., 1997).

2.5.1.2 Micoparasitismo

El micoparasitismo, es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, que incluyen reconocimiento, ataque y posterior penetración y muerte del huésped, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados.

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico (Carsolio et al., 1999), que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno.

El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales.

El crecimiento quimiotrófico es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (Chet et al., 1994). En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico (Infante et al., 2009).

La segunda etapa es el reconocimiento. Diferentes cepas de *Trichoderma* y de especies de hongos fitopatógenos han demostrado que éste es efectivo sólo contra patógenos específicos. Bell et al. (1982) detectaron en un ensayo de cultivo dual que *Trichoderma* puede tener una efectividad elevada sobre un aislamiento de un patógeno y tener un efecto mínimo sobre otro aislamiento de la misma especie.

Si la respuesta de reconocimiento es positiva las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las hifas del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, y se enrollan alrededor de éstas (Golzman et al., 1994). Esta es la fase que anticipa el inicio de la actividad de enzimas líticas.

En la última etapa se da la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, gluconasas y proteasas, que degradan las paredes celulares y posibilitan la inserción (Haram et al., 1996).

Elad et al. (1982) indican que los aislamientos de *Trichoderma* pueden ser seleccionados como agentes de control biológico en base a su capacidad para producir β -1,3-D glucanasa y quitinasa en presencia de quitina y glucano.

2.5.1.3 Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos.

Según Vero y Mondino (1999) es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que, al igual que cuando se usan fungicidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico.

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, inhibidores del desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. En estas interacciones están involucradas enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso molecular.

2.6 *Trichoderma* spp. COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO

Candelero et al. (2015) reportaron que algunas cepas nativas de *Trichoderma* spp. provenientes de patosistemas agrícolas y silvestres mostraron un efecto significativo en la promoción del crecimiento vegetal. Efectos similares fueron informados por Danger et al. (2000) en *Solanum lycopersicum* L. cuando evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. en concentraciones de 5×10^9 esporas/mL. Se definieron incrementos de 9,87 a 11,39% en la altura de plántula con relación al testigo sin la aplicación de inoculantes. Guigón y González (2004) observaron en *C. annuum* L. ganancias del 38% en biomasa aérea con cepas nativas de *Trichoderma* spp. comparadas con el testigo sin hongos fúngicos. Ortuño et al. (2013) lograron un aumento del volumen radical y la biomasa seca de *Lactuca sativa* L. de 67,5 y 82%, respectivamente, usando filtrados de cepas de *Trichoderma* spp. productoras de ácido indolacético con dosis de 500 µL por planta. Contreras et al. (2009) en plantas de *Arabidopsis*, tratadas con *T. atroviride* y *T. virens* obtuvieron incrementos de cuatro a seis veces en el número de raíces laterales y una mayor actividad celular en el periciclo y el primordio de las plantas.

El efecto promotor del crecimiento en plántulas con las aplicaciones de *Trichoderma* spp. se ha atribuido a la presencia de ácido indolacético, que actúa como regulador de crecimiento, y de ácidos orgánicos, que retienen cationes y acidifican la rizosfera, lo cual solubiliza nutrientes para su absorción

por las plantas (Harman 2000, Valencia et al. 2005). La estimulación del crecimiento también se atribuye a la liberación de estructuras quelatantes o sideróforos que favorecen la asimilación de iones como Ca, Fe², Mn², Cu y Zn (Altomare, 1999).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en los años 2017 y 2018, en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo), en la estación experimental Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía, y en el laboratorio ubicado en la Sociedad de Fomento Rural de Los Arenales.

3.1 ORIGEN DE LOS AISLAMIENTOS

Se utilizaron 19 cepas de *Trichoderma* de la colección del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía. Las cepas utilizadas fueron: TGC, DL2, TRG, Tr35, TT no M, TR251, FB3, TCu, TA89, OL2, S30, TR45, LL1, T17, VD1, P28, BEN, T46 y TL92.

La cepa de *Sclerotium rolfsii* que fue utilizada pertenece también a la colección del laboratorio de Fitopatología, extraída de cultivos de morrón.

3.2 CULTIVO DUAL

Para seleccionar las mejores cepas de *Trichoderma*, se desarrollaron pruebas de antagonismo usando la metodología de cultivo dual.

Se utilizaron cultivos puros de cada aislado de *Trichoderma* y de *S. rolfsii*, lo que fueron sembrados en medio PDA e incubados a 25 °C durante 5 y 7 días respectivamente.

El cultivo dual se realizó en placas de Petri de 9 cm de diámetro, conteniendo 20 ml de Agar Papa Dextrosa (PDA). Se colocó en la caja de Petri un disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio de *Sclerotium rolfsii* y a 5 cm el disco de 5 mm con micelio de *Trichoderma spp.* (Howell, 2003). Posteriormente, los cultivos se incubaron a 25±1 °C, haciéndose mediciones cada 24 horas del crecimiento radial del micelio de los hongos.

Como testigo, se sembró en una placa un disco de micelio de *S. rolfsii* y el ensayo finalizó cuando el testigo cubrió la totalidad de la placa.

3.2.1 Inhibición de crecimiento radial

Al finalizar el ensayo de enfrentamiento dual, se midieron los radios de crecimiento del patógeno y los antagonistas, con un calibre Kamasa Professional (0-150 mm/0-6", Suárez et al., 2008). Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyyani et al. (2004), $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo (creciendo en ausencia del antagonista) y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

3.2.2 Capacidad antagónica

Se realizaron observaciones macroscópicas de los cultivos duales, concluido el ensayo, tomándose como índice de micoparasitismo, la invasión del antagonista sobre la superficie del micelio patógeno, teniéndose en cuenta la escala del cuadro No. 1 creada por Bell (1982).

Cuadro No. 1. Escala de colonización y esporulación de los aislados de *Trichoderma spp.* sobre las colonias del patógeno.

Grado	Capacidad antagónica
1	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> , que coloniza toda la superficie del medio y reduce la colonia de <i>S. rolfsii</i>
2	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> , que coloniza al menos $\frac{2}{3}$ de la superficie del medio
3	<i>Trichoderma</i> y <i>S. rolfsii</i> colonizan la mitad(más que $\frac{1}{3}$ y menos que $\frac{2}{3}$)
4	<i>S. rolfsii</i> coloniza al menos $\frac{2}{3}$ de la superficie del medio y resiste la invasión por <i>Trichoderma</i>
5	Sobrecrecimiento de <i>S. rolfsii</i> que coloniza toda la superficie del medio

3.3 CONTROL BIOLÓGICO DE MUFA EN PLANTAS DE MORRÓN

De las 19 cepas evaluadas en cultivo dual se seleccionaron tres cepas de *Trichoderma spp.* con el mayor porcentaje de inhibición de *Sclerotium rolfsii* y la mejor aptitud antagónica.

3.3.1 Producción del inóculo

La producción del antagonista se realizó en el laboratorio de la Sociedad de Fomento Rural de los Arenales. Para la misma se utilizan granos de arroz lavados 5 veces con agua para eliminar impurezas, se fracciona en bolsas de 200 g y se esteriliza en autoclave, 30 minutos a 121 °C y 1 atm.

Previamente, se realizó el cultivo de las diferentes cepas en placas de Petri conteniendo 20 ml de Agar Papa Dextrosa (PDA), y se incubó 5 días a 25±1 °C, sin luz. Con el micelio y conidios producidos y agua destilada que se agrega a las placas, se realizó una suspensión y se colocaron 15 ml de esta suspensión por bolsa de arroz.

Las bolsas de arroz ya inoculadas se incubaron a 24°C, con luz continua, por 15 días, moviéndose cada dos días para favorecer la distribución del *Trichoderma spp.* en todos los granos de arroz.

3.3.2 Evaluación in vivo de la capacidad antagonista de *Trichoderma spp.*

Se utilizaron plantines de morrón de 80 días, se trasplantaron a macetas de 1 litro con sustrato estéril de turba rubia y se les aplicó una fertilización inicial de N.P.K. (14-10-27) con microelementos. Las plantas se colocaron en el solarío del Centro Regional Sur a una temperatura de 25°C, con 12 horas de luz y riego diario por 15 días, para permitir una buena implantación.

Posteriormente se realizó la aplicación del agente de control biológico, favoreciendo su buen desarrollo inicial en el suelo. Se realizó el conteo de conidios con cámara de Neubauer, para estimar la concentración de *Trichoderma* en 2 g de arroz, siendo de 3×10^7 . Se colocaron por planta 2 g de arroz colonizado con *Trichoderma*. La unidad experimental por tratamiento consistió de seis plantas, con cuatro repeticiones. Se utilizaron bandejas que permitieran aislar los tratamientos, evitando la contaminación de *Trichoderma* por agua de riego entre los diferentes tratamientos.

Una semana después se colocan en cada planta cuatro esclerotos cosechados en placas de 10 días, a 1 cm del tallo.

Se midió la incidencia de *S.rolfsii*, siendo los tratamientos: *Trichoderma* 1 con *Sclerotium rolfsii* (1), *Trichoderma* 2 con *Sclerotium rolfsii* (2), *Trichoderma* 3 con *Sclerotium rolfsii* (3), combinación de los 3 *Trichodermas* con *Sclerotium rolfsii* (4) y Testigo- *Sclerotium rolfsii* (5).

3.3.3 Evaluación de *Trichoderma* como promotor de crecimiento

Plantines de morrón de 80 días, se trasplantaron a macetas de 1 litro con sustrato estéril de turba rubia y se les aplicó una fertilización inicial de N.P.K. (14-10-27) con microelementos. Al igual que en el caso anterior, las plantas fueron colocadas en el solarío del Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía a 25°C, con 12 horas de luz y riego controlado.

Los tratamientos fueron: *Trichoderma* 1 (1), *Trichoderma* 2 (2), *Trichoderma* 3 (3), combinación de los 3 *Trichodermas* (4) y Testigo- planta sin ACB (5).

Las variables evaluadas fueron diámetro de la base del tallo, altura de plantas y número de hojas. Al finalizar el ensayo, se pesaron las muestras frescas y secas, luego de secarlas en estufa a temperatura constante, para obtener las variables peso fresco y peso seco. Las fechas de medición fueron: 22 de marzo, 3 de abril, 19 de abril y 3 de mayo.

3.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Se realizó el análisis molecular para identificar la especie de las tres cepas seleccionadas en el cultivo dual.

3.4.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo de Paolocci et al. (1999) con modificaciones, el cual consiste en retirar micelio de la superficie de cada placa de colonias puras de cinco 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, 100 µl/ ml NaCl 250 Mm, 100 µl/ ml SDS 0,5 %, 100 µl/ ml EDTA 25 Mm + NaOH 10%) a cada tubo para permitir la ruptura de

las paredes celulares y se los llevó al freezer (-20° C) por dos horas. Se retiraron los tubos del freezer y se rompió el micelio mediante pistilos esterilizados para luego agregarle 200 µl más buffer de lisis. Posteriormente se homogeneizó por 10 segundos y después se colocó los tubos a baño maría (65° C) durante 30 minutos.

Se adicionó 300 µl de NaCl y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4° C. Tras sacar los tubos de la centrífuga, se observó dos fases: una líquida y otra sólida. Se retiró 500 µl del sobrenadante y se lo colocó en un nuevo tubo y se añadió 500 µl de Isopropanol (-20° C) y luego se llevó al freezer 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 alcohol 70 % y se centrifugó por dos minutos a 13000 rpm (4° C). Se descartó el alcohol y se dejó secando el pellet en estufa (aproximadamente dos horas a 40° C). Luego se lo resuspendió en 100 µl de solución buffer TE estéril y filtrada (0,2 mM y pH 8,0) y se llevó a 65° C por 15 minutos. Se adicionó 2 µl de ARNasa/ tubo y se llevó los tubos a 37° C por 20 minutos para luego guardarlos en el freezer.

Se determinó la concentración de ADN de las muestras mediante Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific. Para ello se utilizó 2 µl de ADN (de la extracción) de cada muestra y se comparó con un patrón de agua MQ. Finalmente se ajustó a una concentración de 100 ng/ µl de ADN.

3.4.2 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 (20 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 25 µl. Los cebadores que se utilizaron se listan en el cuadro No.2.

Cuadro No. 2. Características de los cebadores ITS, EF 1- α .

Locus	Cebadores	Secuencias 5' -3'	Fragmentos (pb)	Referencia
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTTGCGG	560	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
EF 1- α	EF1688F	CGGTCACTTGATCTACAAGTGC	884	Phillips et al. (2005)
	EF11251R	CCTCGAACTCACCAGTACCG		

Los fragmentos de la región ITS (utilizando los cebadores ITS1/ITS4) se amplificaron mediante la desnaturalización inicial a 94° C por 3 minutos, seguida por 34 ciclos a 94° C por 30 segundos, 57° C por 30 segundos y 72° C por 45 segundos. La extensión final fue a 72° C durante 10 minutos.

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 34 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 5 minutos.

De los productos de amplificación, dos microlitros se analizaron a través de electroforesis en gel de agarosa (SBS, China) al 1 %, utilizando Buffer TBE 0.5 (tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH=8,0) a 90 voltios durante 25 minutos. 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 μ l GelRed, 2 ml NaCl 0,1 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).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado tanto para las variables de crecimiento como de infección fue de bloques completos al azar con 5 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada unidad experimental consistió de 6 plantas que fueron evaluadas como submuestras. En ambos ensayos se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + P_{k(ij)} + \mathcal{E}_{ijk}$$

donde,

Y_{ijk} : es la variable de interés en el i -ésimo tratamiento, j -ésimo bloque, y en la k -ésima planta.

μ : media poblacional.

T_i : efecto relativo del i -ésimo tratamiento.

β_j : efecto relativo del j -ésimo bloque.

$P_{k(ij)}$: efecto relativo a la k -ésima planta anidada en el i -ésimo tratamiento y el j -ésimo bloque.

$\mathcal{E}_{ijk}$: error experimental (residual) asociado al i -ésimo tratamiento, j -ésimo bloque, y la k -ésima planta.

Para estimar medias de tratamientos y sus respectivas comparaciones se realizaron análisis de varianza (ANAVA) para las variables de interés. Para la comparación entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los análisis fueron implementados mediante el programa estadístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2011).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Todos los aislados de *Trichoderma spp.* inhibieron el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*, con porcentajes de inhibición que oscilaron entre 38% y 70%. Dichos porcentajes se obtienen comparando el crecimiento del patógeno con y sin la presencia del antagonista. Estos resultados coinciden con los reportados por Hoyos-Carvajal et al. (2008), donde de ocho aislados de *Trichoderma spp.* que fueron evaluados contra *S. rolfsii*, el 100% mostró actividad antagónica en evaluaciones *in vitro*.

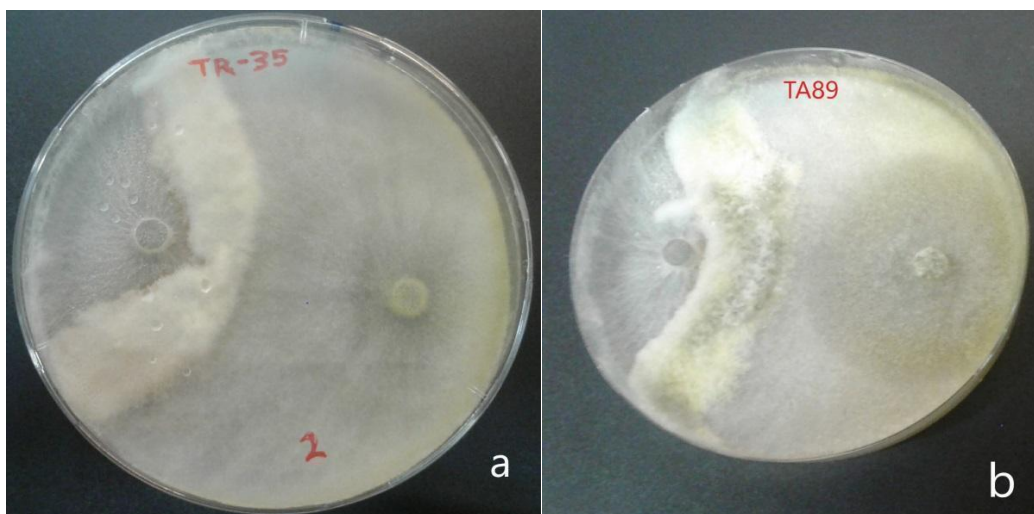
La cepa TA89 fue la que presentó actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *S. rolfsii* a las 120 h, por lo que recibió calificación de 1 en la escala de clasificación de Bell et al. (1982). Las cepas Tr35, S30, LL1, TA46, TCu y TRG, manifestaron buenas propiedades como colonizadoras del patógeno, y recibieron calificación de 1.5 en la misma escala (cuadro No. 3).

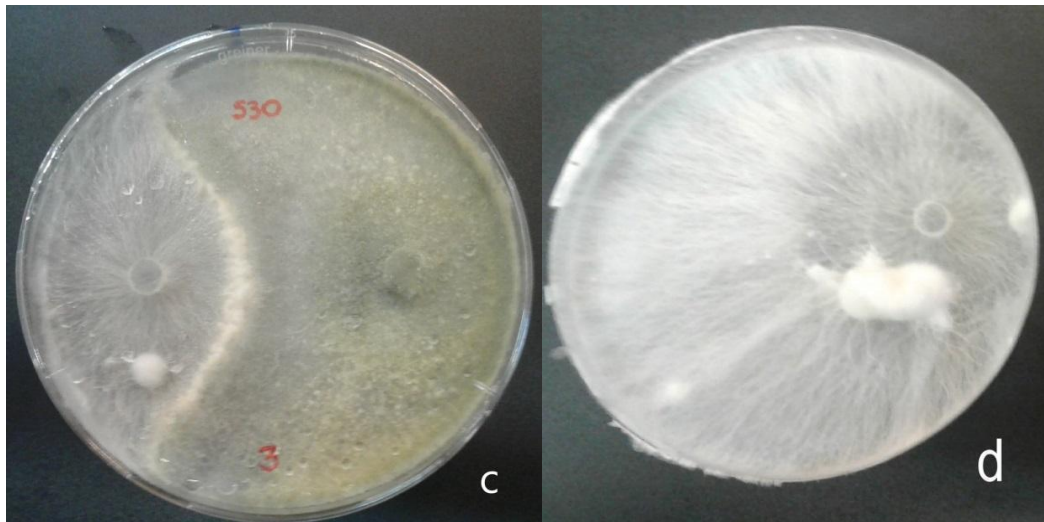
Los aislados TA89 y Tr35 son los que presentaron mejores resultados, con diferencias significativas respecto al resto, inhibiendo el desarrollo de *S. rolfsii*. Posteriormente, de los restantes aislados se seleccionó el aislado S30, por ser el de mayor porcentaje de inhibición dentro del grupo. Estos tres aislados fueron finalmente utilizados para evaluar su comportamiento a campo (cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial y colonización.

Trichoderma	% de inhibición	Colonización
TA89	70.2 a	1
Tr35	57.9 b	1.5
S30	50.6 c	1.5
LL1	49.7 cd	1.5
T46	49.2 cde	1.5
BEN	49.0 cde	3
TCu	48.7 cde	1.5
TRG	47.9 cdef	1.5
TR45	47.2 cdefg	2
TGC	46.1 cdefg	2
DL2	45.8 cdefg	2
VD1	45.0 cdefg	2
FB3	44.8 cdefg	2
TTnoM	44.2 defg	2.5
OL2	43.4 efgh	2.5
TR251	42.3 fgh	2.5
P28	41.6 gh	2.5
T17	41.3 gh	2.5
TL92	38.4 h	3

* Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey; $p=0,05$).





Tr35 (a), *T. TA89* (b), *T. S30* (c), patógeno sin *T.* (d)

Figura No. 1. Colonización y esporulación de los aislados de *Trichoderma*

4.2 EVALUACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD

4.2.1 Muerte de plantas por *Sclerotium rolfsii*

Diferencias significativas fueron encontradas entre tratamientos cuando fueron comparados en términos de porcentaje de mortalidad por *S. rolfsii* (cuadro No. 4). En general, la presencia de los aislados en el suelo tuvo un efecto antagónico frente a *S. rolfsii*, impidiendo un correcto desarrollo del patógeno, logrando disminuir la muerte de plantas con respecto al testigo.

Los resultados obtenidos en los tratamientos 1, 2 y 3, coinciden con los reportados por Arias y Duarte (2006), quienes afirman que utilizando cualquier dosis de *Trichoderma* de las evaluadas en su ensayo, logran controlar la enfermedad causada por *S. rolfsii* en morrón.

En particular, no se encontraron diferencias significativas entre el testigo y el uso de los 3 aislados combinados, presentando los mayores niveles de mortalidad (cuadro No. 4). Esto se puede explicar por la competencia que se genera entre los diferentes aislamientos por nutrientes, ya que todos presentan requerimientos similares. Sin embargo, los menores niveles de mortalidad fueron identificados mediante el uso de aislados de manera individual en comparación al testigo.

Por otra parte, en el estudio efectuado por Portalanza y Vivas (2010), donde se evaluó la incidencia y severidad de *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotium rolfsii* y *Ralstonia solanacearum*, también se obtuvieron resultados positivos con la utilización de *Trichoderma*, disminuyendo la incidencia de la enfermedad de 14.54% a 0.87% aplicándose 7 días luego del trasplante.

Ambas investigaciones fueron realizadas utilizando aislados únicos.

Cuadro No. 4. Incidencia de la mufa por *Sclerotium* en plantas de morrón tratadas con *Trichoderma*

Tratamiento	% de mortalidad por <i>S. rolfsii</i>	
	Media	Error St.
<i>Trichoderma</i> Tr35 con <i>S. rolfsii</i> (1)	0.0 b	0.04
<i>Trichoderma</i> TA89 con <i>S. rolfsii</i> (2)	4.2 b	0.04
<i>Trichoderma</i> S30 con <i>S. rolfsii</i> (3)	0.0 b	0.04
<i>Trichoderma</i> S30, Tr35, TA89 con <i>S. rolfsii</i> (4)	12.5 ab	0.04
Testigo - <i>S. rolfsii</i> (5)	25.0 a	0.04

* Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey; p=0,05).



Figura No. 2. Marchitamiento (a) y necrosis en la base del tallo con esclerotos y micelio de *Sclerotium rolfsii* (b)

Los datos obtenidos en planta, no coinciden con los observados en el ensayo *in vitro*, donde el aislado TA89 fue el que presentó mejores resultados. Existe una baja correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y en plantas. Esto se debe a que un agente de control biológico puede producir un amplio halo de inhibición y antagonizar de forma efectiva al patógeno cuando se lo enfrenta en una placa, y luego no poder impedir el desarrollo de la enfermedad cuando es aplicado sobre la planta. Los métodos de selección *in vitro*, sólo permiten detectar antagonistas que actúan mediante ciertos mecanismos de acción, como la antibiosis o parasitismo directo, no teniendo en cuenta aquellos 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), afirman que cuando se aplica un microorganismo sobre el material vegetal o el suelo, su actividad antagónica puede estar disminuida por efecto de factores ambientales como la luz UV, la humedad relativa, la competencia con otros microorganismos, entre otros.

4.2.2 *Trichoderma spp.* como promotor del crecimiento

Para ninguna de las fechas de evaluación ni para el promedio del periodo experimental se encontraron diferencias significativas en términos de número de hojas (cuadro No. 5) o altura de plantas (cuadro No. 6). El análisis de la variable diámetro de base de tallos indica que existieron diferencias significativas entre tratamientos como promedio del periodo experimental (cuadro No. 7), no explicada por la presencia de *Trichoderma*.

Cuadro No. 5. Número de hojas promedio de las plantas en los diferentes tratamientos

Trat.	Fecha									
	22-mar.		3-abr.		19-abr.		3-may.			
	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.
1	18,75	1,78	22,50	1,78	28,07	1,78	29,17	1,78	24,62 A	1,27
2	17,26	1,78	21,83	1,78	28,33	1,78	30,17	1,78	24,40 A	1,27
3	17,83	1,78	22,42	1,78	28,00	1,78	30,41	1,78	24,67 A	1,27
4	16,58	1,78	20,58	1,78	28,83	1,78	31,67	1,78	24,42 A	1,27
5	16,75	1,78	23,66	1,78	31,08	1,78	28,66	1,78	25,04 A	1,27
Prom.	17,43	0,79	22,20	0,79	28,86	0,79	30,02	0,79		

* Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (p-valor<0.05)

Cuadro No. 6. Altura de plantas (cm)

Trat.	Fecha									
	22-mar.		3-abr.		19-abr.		3-may.			
	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.
1	21.69	1.17	22.88	1.17	25.33	1.17	27.17	1.17	24,24 A	0.89
2	21.54	1.17	22.69	1.17	25.54	1.17	27.5	1.17	24,32 A	0.89
3	21.10	1.17	23.20	1.17	24.91	1.17	27.08	1.17	24,07 A	0.89
4	20.55	1.17	22.78	1.17	25.39	1.17	27.41	1.17	24,03 A	0.89
5	22.62	1.17	24.19	1.17	26.04	1.17	26.66	1.17	24,88 A	0.89
Prom.	21.50	0.79	23.15	0.79	25.44	0.79	27.164	0.79		

* Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (p-valor<0.05)

Cuadro No. 7. Diámetro de la base de tallos (cm)

Trat.	Fecha							
	22-mar.		3-abr.		19-abr.		Prom.	Error St.
	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.		
1	4.364	0.227	5.448	0.227	5.814	0.236	5,387 AB	0.137
2	4.038	0.227	4.993	0.227	5.405	0.236	4,966 B	0.137
3	4.304	0.227	4.910	0.227	5.869	0.236	5,157 AB	0.137
4	4.650	0.227	5.637	0.227	6.464	0.236	5,772 A	0.137
5	4.027	0.227	5.451	0.227	6.171	0.236	5,388 AB	0.137
Prom.	4,027 C	0.102	5,287 B	0.102	5,944 A	0.102		

* Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (p-valor<0.05)

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo para las variables peso de materia fresca, peso en materia seca y % de materia seca (cuadro No. 8).

Cuadro No. 8. Peso en materia fresca (g), peso en materia seca (g) y % de materia seca

Trat.	PMF		PMS		% MS	
	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.	Prom.	Error St.
1	18,81 B	0.78	6,00 A	0.15	0,323 A	0.007
2	22,10 A	0.78	6,33 A	0.15	0,291 B	0.007
3	19,78 AB	0.78	6,12 A	0.15	0,313 AB	0.007
4	19,57 AB	0.78	6,01 A	0.15	0,312 AB	0.007
5	20,36 A	0.78	6,27 A	0.15	0,312 AB	0.007

* Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (p-valor<0.05)

Probablemente los *Trichodermas* del trabajo no demostraron efecto promotor del crecimiento debido a que se utilizaron plantas con 80 días desde la siembra, lo que impidió una buena colonización de *Trichoderma* sobre la raíz.

Estos resultados no coinciden con lo de Candelero et al. (2015), quienes en su trabajo encontraron que diferentes cepas del género *Trichoderma spp.* ejercen efecto promotor del crecimiento, al obtener plantas más vigorosas y altas de *Capsicum chinense*. Estos resultados fueron obtenidos luego de la aplicación del *Trichoderma* en plántulas de 45 días. El efecto promotor del crecimiento en plántulas con las aplicaciones de *Trichoderma spp.* se ha atribuido a la presencia de ácido indolacético, que actúa como regulador de

crecimiento, y de ácidos orgánicos, que retienen cationes y acidifican la rizosfera, solubilizando nutrientes para su absorción por las plantas (Harman 2000, Valencia et al. 2005). La estimulación del crecimiento también se atribuye a la liberación de estructuras quelatantes o sideróforos que favorecen la asimilación de iones como Ca, Fe₂O₃, MnO₂, Cu y Zn (Altomare, 1999).

4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Por medio del alineamiento de las secuencias de los aislados obtenidos y la comparación con diferentes secuencias tipo depositadas en el GenBank, se identificaron los organismos a nivel de especie. El cuadro No. 9 muestra el porcentaje de identidad de los aislados S30, Tr35, TA89 con especies del GenBank para las regiones génicas del factor de elongación y ADN ribosómico. Se observa que los tres aislados presentan un 99% de identidad respecto a los *Trichodermas* que se utilizaron como referencia. Chavarri et al. (2017), incluyen 14 especies al complejo de *Trichoderma harzianum*, siendo *T. aphroharzinum* una de estas nuevas especies descriptas.

Cuadro No. 9. Especies de *Trichoderma*, identificados por amplificación de los espaciadores transcritos internos ITS 1-4 y EF1- α .

Cepa	Accesión	Identificación	% de identidad (BLAST)
Tri S30	FI463324	<i>Trichoderma pseudoharzianum</i>	99
Tri Tr35	FI463301	<i>Trichoderma aphroharzianum</i>	99
Tri TA89	FI463301	<i>Trichoderma aphroharzianum</i>	99

5. CONCLUSIONES

La cepa S30 de *Trichoderma pseudoharzianum* y las cepas TA89 Y Tr35 de *Trichoderma aphroharzianum*, utilizadas individualmente, tienen potencial para el desarrollo de productos de control biológico para la mufa por *Sclerotium* en cultivos de morrón.

6. RESUMEN

El cultivo de morrón (*Capsicum annuum* L.) es uno de los principales cultivos bajo protección en Uruguay. El mismo se ubica como la tercer hortaliza con mayor importancia económica en el mercado. Una de las principales causas que afecta sus niveles de producción es la muerte de plantas producida por patógenos que sobreviven en el suelo. Mufa por *Sclerotium* ha sido identificada como una de las principales enfermedades que afectan el cultivo. El control habitual de esta enfermedad es a través del uso de fungicidas de síntesis química, los cuales son de uso genérico en agricultura y carecen de especificidad. El uso de herramientas de control biológico, ha mostrado ser eficiente en el control de diferentes patógenos en la producción hortícola. Esto lleva a la búsqueda de nuevas opciones para el control de la enfermedad, ya que actualmente es escasa la información que evalúa el comportamiento del patógeno frente a la utilización de algún agente de biocontrol. El objetivo de este trabajo es evaluar el comportamiento de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. disponibles en el país, como inhibidoras de la mufa en morrón y su efecto en el crecimiento del cultivo. Para ello, se realizó un ensayo de evaluación de 19 aislados de *Trichoderma*, donde se midieron diferentes variables de crecimiento. En el laboratorio se realizó un cultivo dual, donde se midió la colonización y el porcentaje de inhibición producido por *Trichoderma* sobre *S. rolfsii*, y los tres aislados con mejor comportamiento antagonista fueron seleccionados. Posteriormente se realizó la identificación molecular de los aislados elegidos. La evaluación a campo fue realizada en plantas de 80 días, en un diseño en bloque completamente al azar con cuatro repeticiones y cinco tratamientos, realizándose mediciones quincenales. Con respecto a la promoción de crecimiento, la aplicación de *Trichoderma* en plantines de 80 días no favorece el crecimiento del cultivo. Por otro lado, la utilización de los aislados únicos de *Trichoderma pseudoharzianum* y *T. aphroharzianum*, pueden controlar efectivamente la mufa por *Sclerotium*. Este tipo de control puede ser una potencial herramienta para comenzar a utilizar en sistemas de producción de morrón bajo protección. Sus principales ventajas son el bajo costo de producción, su efecto positivo en el control de *S. rolfsii* y su bajo impacto ambiental. En particular, sistemas de producción orgánicos se verán altamente beneficiados.

Palabras clave: Control biológico; *Sclerotium rolfsii*; Agente de biocontrol.

7. SUMMARY

The pepper crop (*Capsicum annuum* L.) is one of the main crops under protection in Uruguay. Nowadays, is the third most economically important vegetable crop in the Uruguayan market. One of the main causes that affect their levels of production is the death of plants produced by pathogens that survive in the soil. Mufa by *Sclerotium* has been identified as one of the main diseases that affect the crop. The causal agent of this disease is *Sclerotium rolfsii*, which is characterized by generating total losses. The most common control of this disease is through the use of chemical synthetic fungicides, which are of generic use in agriculture and lack of specificity. The use of biological control tools has shown to be efficient in the control of different pathogens in horticultural production. This leads to the search for new options for disease control, being that currently there is little information that evaluates the behavior of the pathogen against the use of any biocontrol agent. The objective of this study was to evaluate the behavior of different strains of *Trichoderma* spp. available in Uruguay, as inhibitors of the mufa in pepper and its effect on the growth. An experiment using 19 *Trichoderma* isolates was carried out, where different growth and mortality variables were measured. In the laboratory, a dual culture was carried out, where the percentage of inhibition and colonization was measured, and the 3 isolates with higher antagonist control were selected. Subsequently, the molecular identification of the three chosen isolates was performed. The field evaluation was carried out in plants of 80 days, using a randomized complete block design with four replications and five treatments, with biweekly measurements. With regard to the promotion of growth, the application of *Trichoderma* in plants of 80 days does not promote the growth of the crop. On the other hand, it was found that the use of the unique *Trichoderma pseudoharzianum* and *T. aphroharzianum* can effectively control the mufa by *Sclerotium*. This type of control can be a potential tool to start using in protected production systems. Its main advantages are the low cost of production, its positive effect on the control of *S. rolfsii*, and its low environmental impact. In particular, organic production systems will be greatly benefited.

Keywords: Biologic control; *Sclerotium rolfsii*; Biocontrol agent.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. 2007. Fitopatología. 2ª. ed. México, Limusa. 838 p.
2. Ahmad, J.; Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. (en línea). Phytopathology. 77: 182-189. Consultado oct. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n02_182.PDF
3. Altomare, C.; Norvell, W.; Bjorkman, T.; Harman, G. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 65: 2926-2933. Consultado set. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91438/>
4. Arias, O.; Duarte, C. 2006. Determinación de las dosis efectivas del biopreparado *Trichoderma (koningii y harzianum)* sobre *Sclerotium rolfsii* causante del mal del talluelo en chile dulce (*Capsicum annum*) en época lluviosa. (en línea). Tesis Ing. Agr. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador. 80 p. Consultado mar. 2019. Disponible en <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/1506/1/13100002.pdf>
5. Aycock, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. Raleigh, North Carolina Agricultural Experiment Station. Technical bulletin no. 174: 136-202.
6. Barak, R.; Chet, I. 1986. Determination by fluorescein diacetate staining of fungal viability during mycoparasitism. (en línea). Soil Biology Biochemistry. 18: 315-319. Consultado set. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0038071786900672>
7. _____.; _____. 1990. Lectin of *Sclerotium rolfsii*: its purification and possible function in fungal-fungal interaction. (en línea). Applied Bacteriology. 69: 101-112. Consultado set. 2018. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02917.x>

8. Barnett, H.; Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd. ed. Minneapolis, Burgess. 241 p.
9. Beebe, S. 1981. Pudriciones radicales de frijol y su control. (en línea). Cali, CIAT. 52 p. Consultado oct. 2018. Disponible en https://books.google.com.co/books?id=UgQXAYK7dDIC&printsec=frontcover&source=gbs_slider_thumb&hl=es#v=onepage&q&f=false
10. Belanger, R.; Bowen, P.; Ehret, D.; Menzies, J. 1995. Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. (en línea). Plant Disease. 79: 329-336. Consultado ago. 2018. Disponible en http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1995Articles/PlantDisease79n04_329.PDF
11. Bell, D.; Well, H.; Markham, C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. (en línea). Phytopathology. 72: 379-382. Consultado may. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF
12. Benhamou, N.; Chet, I. 1996. Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. (en línea). Phytopathology. 86: 405-416. Consultado dic. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n04_405.PDF
13. Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M. C.; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. (en línea). International Microbiology. 7 (4): 249-260. Consultado set. 2018. Disponible en http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sci_arttext&lng=pt
14. Brown, E.; Hendrix, F. 1980. Distribution and control of *Sclerotium rolfsii* on apple. (en línea). Plant Disease. 64: 205-206. Consultado oct. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1980Articles/PlantDisease64n02_205.PDF

15. Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge, Cambridge University Press. 218 p.
16. Candelero, D.; Cristóbal, A.; Reyes, A.; Tun, S.; Gamboa, A.; Ruíz, S. 2015. *Trichoderma spp.* promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. (en línea). International Journal of Experimental Botany. 84: 113-119. Consultado abr. 2018. Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v84n1/v84n1a16.pdf>
17. Carsolio, C.; Benhamou, N.; Haran, S.; Cortés, C.; Gutiérrez, A.; Chet, I.; Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 65 (3): 929-935. Consultado set. 2018. Disponible en <https://aem.asm.org/content/65/3/929.short>
18. Cazzulo, Y.; Gerald, E. 2017. Agentes asociados a muerte de plantas de morrón (*Capsicum annuum* L.) en cultivos protegidos en el sur de Uruguay, relacionados a diferentes medidas de manejo. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 82 p.
19. Chaverri, P.; Castlebury, L. A.; Overton, B. E.; Samuels, G. J. 2003. *Hypocrea/ Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. (en línea). Mycologia. 95: 1100-1140. Consultado dic. 2018. Disponible en <https://www.jstor.org/stable/pdf/3761915.pdf>
20. _____; Branco-Rocha, F.; Jaklitsch, W.; Gazis, R.; Degenkolb, T.; Samuels, G. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains (en línea). Mycologia. 107(3): 558-590. Consultado mar. 2018. Disponible en <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3852/14-147>
21. Chet, I.; Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. (en línea). Applied Biochemistry and Biotechnology. 48: 37-43. Consultado ago. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02825358>
22. _____; _____; Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. Environmental and microbial relationships. Berlin, Springer-Verlag. pp. 165-184.

23. _____.; Benhamou, S. H. 1998. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: Harman, G. E.; Kubice, C. P. eds. *Trichoderma & Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications*. London, Taylor and Francis. v. 2, pp. 152-153.
24. Contreras, C.; Macías, L.; Cortés, P.; López, B. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. (en línea). Plant Physiology. 149: 1579-1592. Consultado set. 2018. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/149/3/1579>
25. Corrêa, S.; Mello, M.; Ávila, Z.; Minaré, L.; Pádua, R.; Gomes, D. 2007. Cepas de *Trichoderma spp.* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* sacc. (en línea). Fitosanidad. 11(1): 3-9. Consultado jul. 2018. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116144001>
26. Cubillos-Hinojosa, J.; Valero, N.; Mejía, L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *Flavicar* Degener). (en línea). Agronomía Colombiana. 27 (1): 81-86. Consultado mar. 2019. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180314730011>
27. Danger, H. L.; Liens, T.; Jiménez, A.; González, O. 2000. Efectividad de *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento de posturas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y el control de *Meloidogyne incognita* en fase de semillero. Centro Agrícola. 27(1): 35-40.
28. Dennis, C.; Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. production of non-volatile antibiotics. (en línea). Transactions British Mycological Society. 57:25-39. Consultado dic. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153671800773>
29. Dogliotti, S. 2017. Teórico manejo de los cultivos de tomate y morrón. (en línea). Montevideo, Facultad de Agronomía. 45 p. Consultado mar. 2018. Disponible en http://agros.fagro.edu.uy/moodle/pluginfile.php/24599/mod_resour

[ce/content/1/Manejo%20de%20los%20cultivos%20de%20Tomate%20y%20Morr%C3%B3n.pdf](https://www.nature.com/articles/nrmicro2637)

30. Druzhinina, I.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B.; Kenerley, C.; Monte, E.; Mukherjee, P.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I.; Kubicek, C. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. (en línea). Nature Reviews Microbiology. 9: 749-759. Consultado jul. 2018. Disponible en <https://www.nature.com/articles/nrmicro2637>
31. Elad, Y.; Katan, J.; Chet, I. 1980. Physical, biological, and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. (en línea). Phytopathology. 70: 418-422. Consultado oct. 2018. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/249297337_Physical Biological and Chemical Control Integrated for Soilborne Diseases in Potatoes](https://www.researchgate.net/publication/249297337_Physical_Biological_and_Chemical_Control_Integrated_for_Soilborne_Diseases_in_Potatoes)
32. _____; Chet, I.; Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. (en línea). Canadian Journal Microbiology. 28: 719-725. Consultado set. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Yigal_Elad/publication/237192695_Degradation_of_plant_pathogenic_fungi_by_Trichoderma_harzianum/links/55fc545008ae07629e0b9b0b/Degradation-of-plant-pathogenic-fungi-by-Trichoderma-harzianum.pdf
33. _____; Bake, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium spp.* by *Pseudomonas spp.* (en línea). Phytopathology. 75 (9): 1053-1059. Consultado ago. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n09_1053.PDF
34. _____; Chet, I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. (en línea). Phytopathology. 77: 190-195. Consultado ago. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n02_190.pdf
35. El-Katatny, M.; Gudelj, M.; Robra, K.; Elnaghy, M.; Gübitz, G. 2001. Characterization of a Chitinase and an Endo- β -1,3-Glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 Involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. (en línea). Applied Microbiology

and Biotechnology. 56: 137-143. Consultado ago. 2018.
Disponible en
<https://link.springer.com/article/10.1007/s002530100646>

36. Ezziyyani, M.; Pérez Sánchez, C.; Requena, M.; Rubio, L.; Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. (en línea). Anales de Biología. 26: 69-78. Consultado may. 2018. Disponible en
<http://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471/29651>
37. Fernández, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. (en línea). Manejo Integrado de Plagas. 62: 96-100. Consultado ago. 2018. Disponible en
<http://www.sidalc.net/repdoc/A2120e/A2120e.pdf>
38. Folch, C.; Baraibar, A. 1995. Control integrado de *Sclerotium rolfsii*. (en línea). In: Reunión Técnica sobre Resultados Experimentales en Ajo (1995, Las Brujas, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 50-51 (Actividades de Difusión no. 58). Consultado mar. 2019. Disponible en
<http://www.ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=8679&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22Baraibar,%20A.%22&qFacets=autoria:%22Baraibar,%20A.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>
39. Ghini, R.; Bettiol, W.; Caldari, P. 1997. Solarização do solo para o controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. (en línea). Summa Phytopathologica. 23: 143-145. Consultado mar. 2019. Disponible en
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/12820/1/1997AP024GhiniSolarizacao3411.pdf>
40. Golman, G.; Haynes, C.; German, G. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma spp.* (en línea). Trends in Biotechnology. 12: 478-482. Consultado set. 2018. Disponible en
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167779994900558>
41. González, A. 2013. *Sclerotium rolfsii*, un patógeno de judía que produce daños de forma ocasional. (en línea). Tecnología Agroalimentaria.

- 11: 19-20. Consultado set. 2018. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4229393>
42. Grondona, I.; Hermosa, R.; Tejada, M.; Gomis, M.; Mateos, P.; Bridge, P.; Monte, E.; García-Acha, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 63 (8): 3189-3198. Consultado may. 2018. Disponible en <https://aem.asm.org/content/63/8/3189.short>
43. Guédez, C.; Cañizalez, L.; Castillo, C.; Olivar, R. 2012. Evaluación in vitro de aislamientos 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 ago. 2018. Disponible en http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_vm/article/view/3110/2975
44. Guigón, L.; González, G. 2004. Selección de Cepas Nativas spp. con actividad sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología. 22: 117-124. Consultado set. 2018. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222115>
45. Haram, S.; Schickler, H.; Chet, I. 1996. Molecular mechanisms of litic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. (en línea). Microbiology. 142: 2321-2331. Consultado set. 2018. Disponible en <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/142/9/mic-142-9-2321.pdf?expires=1540336802&id=id&accname=quest&checksum=21B916525DC0A9ADAEEE4AD281E14E8D>
46. Harlton, C.; Lévesque, C.; Punja, Z.K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium* (Athelia) *rolfsii* and related species. (en línea). Molecular Plant Pathology. 85 (10): 1269-1281. Consultado ago. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n10_1269.PDF
47. Harman, G. 2000. Mythos and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T-22.

(en línea). Plant Disease. 84: 377-393. Consultado ago. 2018.
Disponible en
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>

48. Hernández, C. A.; Quintero, E.; Herrera, L. 2012. Respuesta varietal y pérdidas causadas por el hongo *Sclerotium rolfsii* en frijol común en diferentes épocas de siembra. (en línea). Centro Agrícola. 39 (1): 75-78. Consultado oct. 2018. Disponible en
https://www.researchgate.net/publication/317044900_Respuesta_varietal_y_perdidas_causadas_por_el_hongo_Sclerotium_rolfsii_en_frijol_comun_en_diferentes_epocas_de_siembra
49. Hjeljord, L.; Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. (en línea). In: Kubicek, C.; Harman, G. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications. London, UK, Taylor and Francis. v. 2, pp. 131-151.
50. Howell, C. 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 abr. 2018. Disponible en
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
51. Hoyos-Carvajal, L.; Chaparro, P.; Abramsky, M.; Chet, I.; Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.* Contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. (en línea). Agronomía Colombiana. 26 (3): 451-458. Consultado jul. 2018. Disponible en
<http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n3/v26n3a10.pdf>
52. Inbar, J.; Chet, I. 1992. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon. (en línea). Journal of Bacteriology. 174: 1055-1059. Consultado set. 2018. Disponible en
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC206195/pdf/jbacter0069-0411.pdf>
53. Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. (en línea). Protección Vegetal. 24(1): 14-21. Consultado jul. 2018. Disponible en
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

54. Jenkins, S.; Averre, C. 1986. Problems and progress in integrated control of southern blight vegetables. (en línea). Plant Disease. 70: 614-619. Consultado oct. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n07_614.PDF
55. Klein, E.; Eveleigh, D. E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. (en línea). In: Kubicek, C. P.; Harman, G. E. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. London, UK, Taylor and Francis. v.1, pp. 57-74. Consultado jul. 2018. Disponible en https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=F01ZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA57&dq=Ecology+of+Trichoderma+klein&ots=2ZLuA830R4&sig=HH_yvWCRxVvApzV9ZoMieSCwwXY#v=onepage&q=Ecology%20of%20Trichoderma%20klein&f=false
56. Kopchinskiy, A.; Komon, M.; Kubicek, C.; Druzhinina, I. 2005. TrichoBlast: a Multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. (en línea). Mycological Research. 109: 658-660. Consultado dic. 2018. Disponible en <https://www.cambridge.org/core/journals/mycological-research/article/trichoblast-a-multilocus-database-for-trichoderma-and-hypocrea-identifications/950CA3238FFA6729201837B449440540>
57. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. (en línea). Molecular Biology and Evolution. 33: 1870-1874. Consultado dic. 2018. Disponible en <https://academic.oup.com/mbe/article/30/12/2725/1017851>
58. Landero, N.; Nieto, D.; Téliz, D.; Alatorre, R.; Fredy, C.; Orozco, M. 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma spp.* on maradol papaya fruit. (en línea). Biological Control. 91: 88-93. Consultado set. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964415300190>
59. Lima, L.; Ulhoa, C. J.; Fernandes, A. P.; Felix, C. R. 1997. Purification of a Chitinase from *Trichoderma sp.* and Its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. (en línea). Journal of Applied Microbiology. 43: 31-37. Consultado dic. 2018. Disponible en https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam1955/43/1/43_1_31/pdf

60. Liu, S.; Liao, C.; Lo, C.; Yang, H.; Lin, K.; Peng, K. 2016. Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. (en línea). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 96:1-7. Consultado set. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0885576516300686?via%3Dihub>
61. López, Y.; Pineda, J.; Hernández, A.; Ulacio, D. 2010. Efecto diferencial de seis aislamientos de *Trichoderma* sobre la severidad de *Rhizoctonia solani*, desarrollo radical y crecimiento de plantas de maíz. (en línea). *Bioagro*. 22 (1): 37-42. Consultado mar. 2019. Disponible en [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/REV22\(1\)/5.%20Efecto%20diferencial%20de%20seis%20aislamientos.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/REV22(1)/5.%20Efecto%20diferencial%20de%20seis%20aislamientos.pdf)
62. Marcelis, L.; Heuvelink, E.; Hofman-Eijer, L.; Bakker, J.; Xue, L. 2004. Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 55: 2261-2268. Consultado mar. 2019. Disponible en <https://academic.oup.com/jxb/article/55/406/2261/585850>
63. Martínez, B.; Reyes, Y.; Infante, D.; González, E.; Baños, H.; Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia sp.* en arroz. (en línea). *Revista Protección Vegetal*. 23 (2): 118-125. Consultado dic. 2018. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v23n2/rpv09208.pdf>
64. Martínez-Scott, M. 2016. Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma spp.* para el control de hongos fitopatógenos del suelo en tomate. (en línea). *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 3 (6): 32-42. Consultado abr. 2019. Disponible en https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/vol3num6/Revista_Ciencias_Naturales_V3_N6_6.pdf
65. MGAP. DIEA; MGAP. DIGEGRA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY; Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de la Granja, UY). 2014. Encuesta hortícola zona Sur y litoral Norte 2013. (en línea). Montevideo. 22 p. (Serie de Encuestas no. 318). Consultado mar. 2018. Disponible en

<http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-iproduccion-vegetal-horticultura,O,es,0>

66. _____. _____. 2015a. Anuario estadístico agropecuario 2015. (en línea). Montevideo. pp. 107-109. Consultado mar. 2018. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-anuario-2015,O,es,0>
67. _____. _____. _____. 2015b. Encuesta hortícola litoral Norte 2015: comunicado de prensa. (en línea). Montevideo. 4 p. Consultado mar. 2018. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-iproduccion-vegetal-horticultura,O,es,0>
68. _____. _____. _____. 2015c. Encuesta hortícola zona Sur y litoral Norte 2014. (en línea). Montevideo. 19 p. (Serie de Encuestas no. 330). Consultado mar. 2018. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-iproduccion-vegetal-horticultura,O,es,0>
69. _____. _____. _____. 2016. Encuesta hortícola zona Sur 2015/2016: comunicado de prensa. (en línea). Montevideo. 5 p. Consultado mar. 2018. Disponible en <http://www2.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-iproduccion-vegetal-horticultura,O,es,0>
70. _____. DIGEGRA; CAMM; IMM (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de la Granja, UY; Comisión Administradora del Mercado Modelo, UY; Intendencia Municipal de Montevideo, UY). 2017. Anuario estadístico 2015. (en línea). Montevideo. 23 p. Consultado jun. 2018. Disponible en http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=5da8d67e-fa88-4216-83f1-4196e7c25a45&groupId=42766
71. Mihuta-Grimm, L.; Rowe C. 1986. *Trichoderma spp.* as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Phytopathology*. 76 (3):306-312. Consultado dic. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n03_306.PDF

72. Mondino, P.; Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 158 p.
73. Morgulis, A.; Coulouris, G.; Raytselis, Y.; Madden, T. L.; Agarwala, R.; Schäffer, A. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. (en línea). Bioinformatics. 15: 1757-1764. Consultado dic. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696921/>
74. Nalim, F. A.; Starr, J. L.; Woodard, K. E.; Segner, S.; Keller, N. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. (en línea). Molecular Plant Pathology. 85 (12): 1507-1512. Consultado ago. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n12_1507.PDF
75. Ortuño, N.; Miranda, C.; Claros, M. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma spp.* generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. (en línea). Journal Selva Andina Biosphere. 1:16-24. Consultado set. 2018. Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592013000100003
76. Papavizas, G.; Lewis, J. A.; Abd-Elmoity, T. H. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. (en línea). Phytopathology. 72: 126-132. Consultado ago. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n01_126.pdf
77. Phillips, A.; 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 feb. 2018. Disponible en <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15572536.2006.11832826>
78. Pernezny, K.; Roberts, P.; Murphy, J.; Goldberg, N. 2003. Compendium of pepper diseases. St. Paul, Minnesota, APS. 63 p.
79. Portalanza, D.; Vivas, L. 2010. Agentes biocontroladores para manejo de fitopatógenos de suelo y mosca blanca en pimiento (*Capsicum*

- annum*). (en línea). Revista de la Universidad de Guayaquil. (108): 19-25. Consultado mar. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Diego_Portalanza/publication/298346358_Biological_control_agents_for_the_soil_pathogen_management_and_whitefly_on_bell_pepper_crop_Capsicum_annum/inks/56e829ae08ae166360e4efcb/Biological-control-agents-for-the-soil-pathogen-management-and-whitefly-on-bell-pepper-crop-Capsicum-annum.pdf
80. Punja, Z. K.; Grogan, R.; Unruh, T. 1982. Chemical Control of *Sclerotium rolfsii* on Golf Greens in Northern California. (en línea). Plant Disease. 66: 108-111. Consultado oct. 2018. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1982Articles/PlantDisease66n02_108.PDF
81. _____. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. (en línea). Annual Review of Phytopathology. 23: 97-127. Consultado ago. 2018. Disponible en <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.23.090185.000525?journalCode=phyto>
82. _____.; Carter, J.; Campbell, G.; Rossel, E. 1986. Effects of calcium and nitrogen fertilizers, fungicides, and tillage practices on incidence of *Sclerotium rolfsii* on processing carrots. (en línea). Plant Disease. 70: 819-824. Consultado ago. 2018. Disponible en http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1986Articles/PlantDisease70n09_819.pdf
83. Punja, Z. F.; Damiani, A. 1996. Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. Mycologia. 88: 694-706.
84. Schwan-Estrada, K.; Stangarlin, J.; Cruz, M. 2000. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. (en línea). Revista Floresta. 30: 129-137. Consultado mar. 2019. Disponible en https://scholar.google.com.uy/scholar?q=Uso+de+extratos+vegetais+no+controle+de+fungos+fitopatog%C3%AAnicos.&hl=es&as_sd t=0&as_vis=1&oi=scholar
85. Sid-Ahmed, A.; Ezziyyani, M.; Pérez-Sánchez, C.; Candela, M. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus spp.* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. (en línea). European Journal of Plant

Pathology. 109: 633-637. Consultado ago. 2018. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024734216814>

86. Sosa, A.; Álvarez, V.; González, M. 2006. Nuevos aislados de *Bacillus* spp. antagonistas a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*. (en línea). Fitosanidad. 10 (1): 73-74. Consultado jul. 2018. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116158010.pdf>
87. Stefanova, M.; Leiva, A.; Larriganaga, L.; Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. (en línea). Revista Facultad de Agronomía. 16: 509-516. Consultado jul. 2018. Disponible en <http://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/11831/11820>
88. Suárez, C.; Fernández, R.; Valero, N.; Gómez, R.; Páez, A. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifaii sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Revista Colombiana de Biotecnología. 10(2): 35-43.
89. 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. (en línea). In: Bonilla, M. ed. Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque alto andino en la cordillera oriental de Colombia. Bogotá, Unibiblos. pp. 177-193. Consultado set. 2018. Disponible en http://bdigital.unal.edu.co/47915/3/9587014812_Part02.PDF
90. Vero, S.; Mondino, P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. (en línea). Horticultura Internacional. 7: 1-10. Consultado set. 2018. Disponible en <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/MIE/CBiologico1.htm>
91. Villegas, M. 2005. *Trichoderma*: características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. (en línea). Villavicencio, Orius Biotech. s.p. Consultado jul. 2018. Disponible en <https://www.oriusbiotech.com/>
92. Wells, H.; Bell, D.; Jaworski, C. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. (en línea). Phytopathology. 62: 442-447. Consultado oct. 2018. Disponible en

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1972Articles/Phyto62n04_442.PDF

93. White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Innis, M.; Gelfand, D.; Sininsky, J.; White, T. eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, California, Academic Press. pp. 315-322.
94. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 65: 1061-1070. Consultado ago. 2018. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049864>
95. Youssef, S.; Tartoura, K.; Abdelraouf, G. 2016. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. (en línea). Biological Control. 100: 79-86. Consultado set. 2018. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964416301049?via%3Dihub>