

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE *CLONOSTACHYS*
SPP. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS EN TOMATE**

por

Gerónimo Joaquín GIMÉNEZ MARTÍNEZ

Nicolás Javier SILVERA BRUNETTO

**Trabajo final de grado presentado
como uno de los requisitos para obtener
el título de Ingeniero Agrónomo.**

MONTEVIDEO

URUGUAY

2023

PÁGINA DE APROBACIÓN

Trabajo final de grado aprobado por:

Director:

Ing. Agr. Pablo González Rabelino (Mag.)

Tribunal:

Ing. Agr. Pablo González Rabelino (Mag.)

Ing. Agr. Elisa Silvera Pérez (MSc. DSc.)

Ing. Agr. Pedro Mondino Hintz (Dr.)

Fecha: 24 de enero de 2023

Autores:

Gerónimo Joaquín Giménez Martínez

Nicolás Javier Silvera Brunetto

AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo del laboratorio de Fitopatología que estuvo presente durante la realización de las tareas prácticas de este trabajo. En particular a Elisa Silvera, co-tutora de esta tesis.

A todos los que se cruzaron a lo largo de la carrera y contribuyeron en nuestra formación como personas y como técnicos.

A nuestras familias y amigos por todo el apoyo brindado durante este tiempo y a la Udelar por permitirnos llevar a cabo nuestra formación

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TOMATE EN URUGUAY ..	3
2.2. MOHO GRIS	4
2.3. MORFOLOGÍA DE <i>B. CINEREA</i>	6
2.4. CICLO DE LA ENFERMEDAD.....	6
2.5. CONDICIONES FAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD	7
2.6. MANEJO	8
2.6.1. Control cultural	9
2.6.2. Control químico	9
2.6.3. Control biológico	10
2.7. MORFOLOGÍA.....	12
2.8. MODO DE VIDA	12
2.9. ESPECTRO DE ACCIÓN	13
2.10. MECANISMOS DE ACCIÓN	14
2.11. MICOPARASITISMO	14
2.12. COMPETENCIA	14
2.13. INDUCCIÓN DE RESISTENCIA	15
2.14. ANTIBIOSIS	15
2.15. SECRECIÓN DE ENZIMAS	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. SELECCIÓN DEL AISLADO DEL PATÓGENO	17
3.2. SELECCIÓN DE AISLADOS DE <i>CLONOSTACHYS SPP</i>	18

3.3. EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS CON CEPAS DE <i>CLONOSTACHYS</i> SPP. SOBRE PLANTAS DE TOMATE ...	19
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
3.5. Identificación molecular	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. SELECCIÓN DEL AISLADO MÁS AGRESIVO DEL PATÓGENO	24
4.2. SELECCIÓN DE AISLADOS DE <i>CLONOSTACHYS</i> SPP.....	25
4.3. EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS CON CEPAS DE <i>CLONOSTACHYS</i> SPP. SOBRE PLANTAS DE TOMATE.....	27
4.4. ANÁLISIS MOLECULAR	30
5. CONCLUSIONES	32
6. RESUMEN	33
7. SUMMARY	34
8. BIBLIOGRAFÍA	35

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro	Página
1. Aislados de <i>B. cinerea</i>	18
2. Aislados de <i>Clonostachys</i> spp.	19
3. Diámetro de la mancha foliar en hojas de tomate inoculadas con los aislados de <i>B. cinerea</i>	25
4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de <i>B. cinerea</i>	27
5. Área bajo la curva del progreso del índice de severidad de la enfermedad promedio en hojas de plantas de tomate	28
6. Aislados de <i>C. chloroleuca</i> , <i>C. rosea</i> f. <i>rosea</i> y <i>C. rhizophaga</i> identificados mediante la secuencia parcial del gen EF1-alfa	30
Figura	Página
1. Plantas de tomate var. Elpida de 65 días después de la siembra 192. Disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio de <i>B. cinerea</i> sobre folíolo de hoja de tomate	20
3. Inoculación con el antagonista sobre folíolo de hoja de tomate con suspensión de esporas de aislado de <i>Clonostachys</i> sp.	21
4. Plantas de tomate inoculadas cubiertas con bolsas de plástico transparente	21
5. Cultivos duales de los aislamientos Palmitas 14, Paysandú 4 y Corona frutilla en el quinto día de evaluación	25
6. Folíolo de hoja de tomate con disco de micelio de <i>B. cinerea</i> y suspensión de esporas de <i>C. rhizophaga</i>	28
7. Folíolo de hoja de tomate del testigo solo con <i>B. cinerea</i> con síntomas de moho gris 96 horas posinoculación	29

1. INTRODUCCIÓN

Uruguay produce anualmente 36 000 toneladas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de las cuales el 60 % se comercializa en la Unidad Agroalimentaria Metropolitana. Esto lo convierte en el cuarto producto en orden de importancia en cuanto a volumen de ingreso y valor bruto de producción.

La trayectoria de los últimos años refleja una disminución del área dedicada a la producción de tomate, explicada exclusivamente por la reducción del área de cultivos a campo, en un contexto de crecimiento del área dedicada a cultivos protegidos de mayor productividad (MGAP. DIEA, 2018).

El cultivo es susceptible a diferentes plagas y enfermedades que pueden provocar pérdidas importantes de rendimiento. Entre ellas, el moho gris causado por el hongo *Botrytis cinerea* es una de las enfermedades más destacadas en cultivos protegidos, y puede atacar cualquier órgano de la planta en cualquier estado de desarrollo.

En la actualidad, su manejo se basa principalmente en el uso de fungicidas químicos; sin embargo, con el paso del tiempo estos se han vuelto cada vez menos eficientes como consecuencia de variados factores que interactúan entre sí y dificultan el control de dicha enfermedad. Entre ellos, se destaca la aparición de cepas de *B. cinerea* resistentes a los principios activos más usados, debido fundamentalmente a su uso continuo. Además, el mal uso de los productos químicos disponibles ha provocado costos ambientales, como la pérdida de enemigos naturales, la contaminación de recursos, los efectos negativos sobre la salud de trabajadores y la posibilidad de encontrar residuos sobre los alimentos ofrecidos a la población.

En Uruguay, se ha generado un debate en el ámbito político y social sobre este modelo de producción; de hecho, las denuncias ambientales por la mala utilización de agroquímicos aumentan año a año ante Dinama, según los datos del año 2016 del Observatorio Ambiental Nacional (MA. OAN, 2020). En este marco, es importante desarrollar alternativas de producción que permitan controlar la enfermedad de forma eficiente y amigable con la salud de los productores, los consumidores y el ambiente.

Existen diversos estudios que muestran a *Clonostachys rosea* como un potencial antagonista de *B. cinerea*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y evaluar la capacidad antagonista de seis cepas locales de *Clonostachys* spp. para el control del moho gris causado por *B. cinerea* en condiciones *in vitro* y en plantas de tomate en condiciones controladas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE TOMATE EN URUGUAY

El tomate es la hortaliza que más se produce en el mundo. Según FAO, el volumen de producción mundial en 2019 fue de 180,8 millones de kilos (Muñoz, 2021). China se ubica como el principal país productor del mundo; en 2019, llegó a las 59 millones de toneladas, correspondientes al 33 % de la producción mundial (Muñoz, 2021).

En Uruguay, el tomate es uno de los principales productos hortícolas. En la zafra 2014-2015, la producción de tomate fue de 35 527 toneladas por año, la oferta nacional se complementa con aproximadamente 500 toneladas de producto importado desde la región. Estas importaciones se efectúan en momentos puntuales, cuando hay carencia en la oferta nacional de calidad (MGAP. DIEA, 2018).

El sector industrial absorbe el 7 % de la oferta total, y queda el 93 % disponible para consumo. De este último, 61 % se comercializa en la Unidad Agroalimentaria Metropolitana (UAM). A la vez, el 7,8 % del monto bruto total que se comercializa en la UAM corresponde a la comercialización de tomate, de modo que, según montos brutos generados por la comercialización, constituye el cuarto producto en importancia por debajo de la banana, la papa y la manzana (MGAP. DIEA, 2017, 2018).

En cuanto a los destinos, el sector gastronómico es un demandante relevante (9 % del disponible para consumo), pero el consumo de los hogares es el de mayor peso, canalizado a través de supermercados y otros minoristas (MGAP. DIEA, 2017). Así, el consumo aparente de tomate fresco neto de las mermas registradas en la cadena ronda los 8,4 kilos por persona al año (Observatorio Granjero, 2014).

La producción de tomate se realiza en dos zonas: una de ellas en el sur del país, que abarca los departamentos de Canelones, Montevideo y San José; la otra en el litoral norte, más precisamente en Salto, Constitución y Bella Unión (MGAP. DIEA, 2017). En la zona sur existen productores con determinadas especializaciones y con altos niveles de tecnificación, y productores familiares que trabajan en diferentes

rubros en el mismo predio. En la zona norte los predios son de carácter empresarial y altamente especializados. Además, la producción de tomate del norte presenta como característica principal que se realiza contraestación, en consecuencia, aprovecha el nicho de mercado que se genera entre los meses de mayo y diciembre.

Aproximadamente 60 % de la producción nacional proviene del litoral norte, donde casi la totalidad de la producción se realiza bajo invernáculo. En el sur se produce el 40 % restante bajo dos modalidades: invernáculo, que es la predominante y año a año gana participación, y a campo, donde una porción de lo cosechado tiene como destino la industria. El avance tecnológico y la concentración del rubro determinan que la modalidad a campo cada vez sea menos relevante en la composición de la oferta (MGAP. DIEA, 2017).

2.2. MOHO GRIS

El moho gris es una enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, Pers. ex Fr., anamorfo del ascomicete *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, que afecta la producción de numerosos cultivos en todos los estadios de desarrollo y en todas las condiciones de cultivo, pero es más pronunciada en los sistemas protegidos (Morandi, 2001). Este hongo se caracteriza por ser necrotrófico, se establece y multiplica inicialmente en tejidos muertos y, posteriormente, coloniza los tejidos vivos adyacentes (Jarvis, 1989).

Botrytis cinerea tiene una amplia distribución, se encuentra en todas partes donde se realizan cultivos, tiene un amplio número de huéspedes y gran importancia económica, debido a las pérdidas que ocasiona. Por esta razón, es objeto de numerosos estudios relacionados con su fisiología, bioquímica, patogenicidad y control (Espinosa de los Monteros, 2006). En Uruguay, provoca pérdidas importantes debido a la pudrición que produce en frutos y otros órganos de cultivo, como tomate, frutilla, morrón, viña y arándano, y en plantines ornamentales y forestales (Gepp et al., 2012). Según Bernal (2010), este hongo es el más importante de los que atacan los cultivos de tomate bajo invernáculo en la zona norte de Uruguay.

En el cultivo de tomate, los principales síntomas de esta enfermedad son el atizonado de las inflorescencias y pudriciones en los frutos, pero también ocasiona canchales, pudriciones de tallos, ahogamiento de plántulas y manchas foliares (CMI, 1986). Los síntomas ocasionados por *B. cinerea* en el huésped son consecuencia de la producción y liberación de enzimas pectolíticas, ácidos orgánicos y toxinas formadas de polisacáridos (CMI, 1986).

El patógeno suele establecerse en los pétalos de las flores cuando estas comienzan a envejecer y este produce abundante micelio. Si el clima es favorable, con alta humedad relativa y temperaturas frescas, este micelio produce gran cantidad de conidios que ocasionan sucesivas infecciones, causantes de la dispersión de la enfermedad. Desde ese lugar, invade fácilmente los frutos y tallos. Posteriormente a la infección, estos órganos sufren ablandamiento, se tornan acuosos y adquieren un color marrón claro; luego se vuelven grisáceos durante la desecación. Conforme se pudren los tejidos, la epidermis pierde turgencia y se seca; el hongo produce esclerocios negros y aplanados sobre la superficie o hundidos sobre el tejido como estrategia de sobrevivencia (CMI, 1986, Agrios, 2008).

En cuanto a las manchas foliares en sus hospedantes, estas son pequeñas y amarillentas al principio, pero posteriormente se extienden, adquieren un color canela o gris blanquecino, se hunden y a menudo cubren toda la hoja. Además, se pueden extender sobre el tallo y hacer que este se quiebre (Agrios, 2008).

En poscosecha, *B. cinerea* causa pudriciones que pueden iniciarse en las inflorescencias en el extremo del pedúnculo del fruto o en cualquier herida, hendidura o incisión de los tejidos del fruto. Dichas pudriciones tienen el aspecto de un área bien definida, parduzca y acuosa, la cual penetra profundamente y avanza con gran rapidez en los tejidos del órgano. Bajo condiciones de alta humedad, se desarrolla una capa fructífera conspicua de moho aterciopelada granular y de color grisáceo o gris parduzco sobre la superficie de las áreas putrefactas (Agrios, 2008).

2.3. MORFOLOGÍA DE *B. CINEREA*

Botrytis cinerea presenta micelio de color gris, compuesto por hifas o conidióforos largos y ramificados con los conidios en sus extremos finales (Agrios, 2008). Las hifas crecen vegetativamente mediante una división citoplasmática. En ocasiones, ocurre una división nuclear de esos filamentos sin que se haya producido la citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un número de núcleos elevado y variable (Alexopoulos, 1966).

La reproducción sexual en este hongo no presenta gran importancia en la supervivencia ni en la capacidad de ocasionar enfermedad en la planta. La etapa sexual del patógeno ocurre al final del ciclo de los cultivos y se obtiene mediante la fecundación de dos esporas sexuales: una femenina (ascogonio) y otra masculina (espermacio) (Agrios, 2008).

El estado asexual o imperfecto de este hongo presenta como característica un elevado crecimiento de hifas sobre el tejido que coloniza, que luego forma el micelio donde se desarrollan las estructuras básicas del hongo. Por un lado, los conidióforos, que forman conidios. En condiciones favorables, estos pueden germinar y generar un nuevo micelio. Por otro lado, a partir de las hifas del micelio se pueden producir microconidióforos, que originan los microconidios y los esclerocios (Espinosa de los Monteros, 2006).

2.4. CICLO DE LA ENFERMEDAD

Botrytis cinerea puede sobrevivir como esclerocios (estructura de resistencia) que se forman en condiciones ambientales desfavorables, son de consistencia dura y tienen la capacidad de sobrevivir en estado de latencia por mucho tiempo y germinar cuando las condiciones vuelven a ser favorables, a temperaturas entre 15 °C y 20 °C y alta humedad relativa (>90 %) (Alexopoulos, 1966, Jarvis, 1989). El hongo también puede sobrevivir colonizando restos de cultivos; esta es la principal fuente del inóculo primario, donde en condiciones óptimas esporula abundantemente (Jarvis, 1989). Los conidios se dispersan por las corrientes de aire en grandes cantidades y son la principal estructura de dispersión de la enfermedad (Elad et al., 2004). La lluvia por salpicado

contribuye a su liberación y diseminación en pequeñas distancias (Latorre, 1986). Por otro lado, la liberación de las esporas ocurre en las horas más cálidas del día, cuando existen cambios rápidos en la humedad relativa, y posteriormente se transportan por las corrientes de aire hasta alcanzar tejidos vulnerables donde desarrollarse (Jarvis, 1989).

Para poder ingresar el patógeno al tejido vulnerable, las esporas primero desarrollan un tubo germinativo con un apresorio en su extremo distal que se adhiere al substrato, gracias a la secreción de sustancias mucilaginosas. Aparentemente, cuando se dan condiciones limitantes de nutrientes en el sustrato, se induce la formación de un apresorio (Elad et al., 2004). A partir de este surgen pequeñas hifas que se encargan de penetrar el tejido vegetal (Latorre, 1986).

Cuando la penetración se da en forma directa, el patógeno perfora los tejidos de forma mecánica y/o enzimática. La penetración indirecta se da a través de heridas o daños en las plantas no provocados por el patógeno, sino originados por condiciones adversas del clima o insectos, o en el manejo cultural de las plantas. El patógeno también puede ingresar por aberturas naturales, principalmente estomas y estigmas. Independientemente de los mecanismos de penetración que presente *B. cinerea*, se debe establecer un contacto con algún órgano susceptible del cultivo, y a la vez, debe haber condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Latorre, 1986).

Los conidios sobreviven en la superficie vegetal y pueden ser viables a lo largo de toda la temporada de crecimiento del cultivo. En condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, la incubación de *B. cinerea* se da en escasas horas, y da lugar a nuevas infecciones, ya que el inóculo secundario aparece casi al mismo tiempo que los primeros síntomas. Esta se considera una de las enfermedades más agresivas (Latorre, 1986).

2.5. CONDICIONES FAVORABLES PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

La temperatura y la humedad relativa son los dos factores climáticos más relevantes que inciden en la infección de *B. cinerea*; las temperaturas frescas en el

rango de los 15-18 °C son muy favorables. *B. cinerea* tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas que varían desde 0,8 °C a 35 °C (Berg y Lentz, 1968). Para el desarrollo de la enfermedad son fundamentales las condiciones de humedad relativa superior al 80 % en el ambiente. Dada la capacidad del patógeno de crecer a diferentes temperaturas, se considera la humedad relativa como un factor limitante (Giménez et al., 2003). Cuando se presentan lapsos prolongados de precipitaciones durante el período de cosecha, se aconseja posponerla, debido a que se generan condiciones ideales para el desarrollo de *B. cinerea* (Giménez et al., 2003).

En la zona sur del país, los ataques más severos en tomate se registran a partir de marzo-abril; coinciden con el fin de ciclo en cultivos de ciclo largo, con cultivos a campo tardíos y con las variedades de ciclo corto trasplantadas entre enero y febrero. En la zona norte, ataca desde mayo en adelante; dependiendo de las condiciones climáticas, se observan ataques intensos a veces hasta fines de octubre (Giménez et al., 2003).

2.6. MANEJO

Un control eficaz del moho gris requiere pensar en una estrategia de manejo integrado que considere diferentes factores y en la cual se integren medidas de control cultural con la aplicación de fungicidas y con el uso de biofungicidas (Espinosa de los Monteros, 2006). Según Mondino y Vero (2006), la evolución que ha tenido el control de las enfermedades de plantas hace necesario que las medidas o técnicas de control no sean aisladas, sino que se utilicen en forma coordinada en sistemas de manejo integrado. Esto implica una concepción filosófica diferente de la protección vegetal.

El manejo integrado tiene por objetivo reducir el uso de pesticidas como forma de disminuir sus efectos secundarios negativos sobre el ambiente y la salud humana, ya que considera que los patógenos y las plagas son componentes del ecosistema y, por lo tanto, se debe convivir con ellos, sin dejar de tener en cuenta el contexto socioeconómico en el que se desarrolla la producción (Mondino y Vero, 2006).

La implementación de medidas preventivas, métodos culturales, uso de resistencia genética y métodos físicos de control, sumados al control biológico, son la base del manejo integrado, de tal forma que el control químico queda reducido a la mínima expresión (Mondino y Vero, 2006).

2.6.1. Control cultural

Las medidas culturales generalmente están dirigidas a alterar el microclima en el dosel y alrededor de los órganos de plantas susceptibles, y a prevenir la entrada, multiplicación y dispersión del inóculo en el invernadero (Elad y Evensen, 1995). Las prácticas culturales incluyen la eliminación del tejido enfermo de la planta y la alteración de la temperatura y la humedad del ambiente (Elad, 1988, Jarvis, 1989, Elad y Evensen, 1995, Sutton et al., 1997).

Algunas de las estrategias que tienen por objetivo evitar factores predisponentes para el desarrollo del moho gris son sistematizar correctamente los canteros, mantener un marco y densidad de plantación adecuados, evitar excesos de riego y de fertilización nitrogenada, y realizar las tareas de poda, desbrote, deshoje y raleo de frutos en momentos oportunos, intentando evadir días de lluvia y de alta humedad en el ambiente. También es importante eliminar las plantas infectadas una vez finalizado el cultivo (Agrios, 2008).

2.6.2. Control químico

La aplicación de los fungicidas sintéticos ha sido la principal forma de controlar el moho gris (Morandi et al., 2001). Entre los grupos químicos y principios activos más utilizados para el control de *B. cinérea* están los siguientes: hidroxianilidas (fenhexamida), fenilpirroles (fludioxonil), triazoles (tebuconazole), benzamidas (fluopiram), metoxi-carbomatos (pyraclostrobin), anilino pirimidinas (cyprodinil) y piridin carboxamidas (boscalid) (FRAC, 2017). No obstante, la aparición de cepas resistentes ha impulsado el cambio continuo de fungicidas y un incremento de las dosis aplicadas, con el consiguiente riesgo de persistencia de estos productos en el suelo (Espinosa de los Monteros, 2006).

La selección de cepas resistentes se dio primero a los benzimidazoles, como carbendazim, benomil y tiabendazol (Leroux, 1994) y, posteriormente, a las dicarboximidas, como iprodiona, procimidona y vinclozolina (Latorre et al., 1994). La pérdida de sensibilidad a los fungicidas se debe a que su uso continuado ejerce una presión de selección en favor de los individuos resistentes (Van Den Bosch et al., 2011). *Botrytis cinerea* es considerado uno de los patógenos de plantas con mayor capacidad para desarrollar resistencia en sus poblaciones en un período corto. Esto lo convierte en una gran amenaza para diferentes cultivos comerciales (FRAC, 2019).

Con el fin de prevenir, disminuir o retardar el desarrollo de cepas resistentes, se han propuesto varias estrategias: utilizar fungicidas con bajo riesgo de generar resistencia (si se usan de alto riesgo, usarlos en mezclas o hacer rotaciones de fungicidas de distinto modo de acción), racionalizar el número de aplicaciones restringiéndolas solo a los períodos críticos y realizar control integrado con el objetivo de minimizar el uso de fungicidas (FRAC, 2019).

El uso frecuente e inadecuado de fungicidas constituye un riesgo también para la salud de los trabajadores porque incrementa su exposición a estos, y es sabido que dichos productos tienen efectos secundarios negativos sobre la salud de las personas expuestas (Bozzo et al., citados por Gazzano et al., 2021). Además, se suman las restricciones del mercado consumidor de productos agropecuarios, que exigen que no se sobrepasen determinados niveles máximos de residuos (Michereff-Filho et al., 2004)

En muchos casos, el control químico puede llevar también a la muerte de enemigos naturales que son benéficos para el cultivo. De esta manera, se altera la biodiversidad de ese ecosistema específico, y disminuye la resiliencia del sistema (Bostanian y Belanger, 1985).

2.6.3. Control biológico

Según Mondino y Vero (2006), el control biológico hace referencia a la utilización de “microorganismos beneficiosos para reducir los efectos indeseables de los patógenos sobre las plantas”. Los microorganismos benéficos ya se encuentran

naturalmente, pero se deben aislar y aplicar en concentraciones mayores y en momentos oportunos para que ejerzan su acción antagónica. También se pueden potenciar las poblaciones naturales de microorganismos benéficos mediante un apropiado manejo de los cultivos. La mayoría de las plagas y patógenos de plantas presentan en la naturaleza antagonistas o enemigos naturales que se pueden seleccionar y utilizar como estrategia de lucha para emplearse en un programa de control biológico.

El control biológico presenta algunas ventajas que vale la pena resaltar y que han sido las causas del desarrollo de diferentes programas en todo el mundo. Se destaca la reducción de la utilización de plaguicidas químicos de síntesis como fungicidas e insecticidas para el control de enfermedades y plagas en cultivos. A la vez, se pueden evitar diferentes problemáticas que se asocian especialmente a sistemas productivos que basan sus estrategias de control en la utilización de químicos. Estas son el desarrollo de resistencias del patógeno y la disminución de poblaciones de microorganismos benéficos. Esto se debe, básicamente, a los variados mecanismos de acción que presentan los microorganismos que poseen la capacidad de controlar enfermedades vegetales (Rubio y Fereres, 2005).

En los últimos años se han realizado diversos estudios relacionados con el control biológico del moho gris, dada la importancia del patógeno en pre y poscosecha. En la actualidad, se conocen muchos microorganismos, hongos, levaduras y bacterias que han demostrado eficacia para controlar la enfermedad; por ejemplo, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Candida oleophila*, *Clonostachys rosea*, *Cryptococcus albidus*, *Gliocladium catenulatum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Trichoderma atroviridae*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viridae* y *Ulocladium atrum*, entre otros posibles microorganismos controladores. Aún se continúa buscando cepas o aislados que sirvan como biocontroladores de esta enfermedad, ya que el número disponible de productos comerciales es limitado en muchos mercados (Dik et al., 1999, Jacometti et al., 2010).

Clonostachys rosea es un hongo Ascomycota del orden Bionectriaceae y el teleomorfo de *Bionectria ochroleuca* (Schroers et al., 1999). Es una especie muy extendida en todo el mundo que presenta una excelente actividad micoparásita frente

a *B. cinerea*; de hecho, es reconocida como un agente fúngico de control biológico del moho gris en cultivos protegidos y al aire libre (Sutton et al., 1997, Köhl y Fokkema, 1998, Morandi et al., 2000), y con reportes de control de diferentes patógenos de importancia comercial alrededor del mundo. Existe en muchos tipos de hábitats, con mayor frecuencia en el suelo.

2.7. MORFOLOGÍA

Las colonias de *C. rosea* son de color blanco a salmón pálido; el micelio es de aspecto granular, debido a la formación de conidióforos con masas de conidios que se ubican generalmente en el centro de las colonias. Los conidióforos se presentan en micelio aéreo y se producen en dos tipos: verticilados y penicilados. Los primeros presentan fiálides largas y divergentes, mientras que en los segundos son adpresas o convergentes.

Clonostachys rosea produce dos formas diferentes de esporas durante su ciclo de vida: conidios y clamidosporas. Estas últimas se producen cuando *C. rosea* se encuentra en entornos hostiles como pH desfavorables y bajas temperaturas. En comparación con los conidios, las clamidosporas son significativamente más grandes y más resistentes a condiciones ambientales adversas. Los conidios tienen un tamaño de $2,9 \pm 0,3 \times 1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, y las clamidosporas tienen un tamaño de $5,8 \pm 0,4 \times 5,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (Sun et al., 2018). Los conidios (fundamentales para la dispersión del hongo) son hialinos, lisos y ligeramente curvados (Piontelli y Guisiano, 2003).

2.8. MODO DE VIDA

Clonostachys rosea es un hongo filamentoso, saprófito, micoparásito y cosmopolita que en ciertos hospederos puede permanecer por períodos prolongados dentro del huésped, actuando como endófito o creciendo epifíticamente (Hoopen et al., 2003). El hongo coloniza diversos tejidos u órganos de la planta, sin causar enfermedad. Existen relatos de colonización endofítica en tallos de tomate (Sutton et al., 2002).

El hongo presenta un modo de vida saprófito, por lo que puede crecer a partir de materia orgánica en descomposición (Li et al., 2002). Esto tiene una importancia agronómica fundamental, debido a la capacidad de competir por ese nicho y bajar las poblaciones de patógenos de plantas que son saprófitos; de hecho, hay trabajos que demuestran que la aplicación de este hongo en restos de poda o rastrojos aumentan la eficiencia del control de *B. cinerea* (Cota et al., 2009).

2.9. ESPECTRO DE ACCIÓN

Diferentes cepas de *Clonostachys rosea* han mostrado capacidad de antagonizar a diferentes hongos patógenos de plantas, nematodos e insectos. Estos comportamientos están basados en la activación de múltiples mecanismos de acción, entre ellos, la secreción de enzimas que degradan la pared celular, la producción de metabolitos secundarios antifúngicos y la inducción del sistema de defensa de las plantas (Sun et al., 2020).

Se han utilizado diferentes cepas de *C. roseum* para controlar la enfermedad del moho gris en hojas, tallos, flores y frutos de diferentes plantas bajo diversas condiciones de cultivo. Asimismo, presenta una gran eficacia como agente de control biológico frente a *B. cinerea*. Esto podría estar relacionado con una fuerte adaptación ecológica del antagonista a las plantas huésped y a diversos mecanismos de acción empleados en el antagonismo del hongo hacia el patógeno (Sutton et al., 1997). Estudios de Morandi et al. (2003, 2006) reflejan que el antagonista puede suprimir de manera eficiente la esporulación de *B. cinerea* sobre rastrojos de cultivos, incluso en condiciones favorables para el desarrollo del patógeno.

Diferentes autores han utilizado diferentes cepas de *C. rosseum* contra numerosos patógenos fúngicos de plantas como, por ejemplo, *Alternaria dauci*, *A. radicina*, *Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis aclada*, *B. cinerea*, *Drechslera teres*, *Fusarium crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *Helminthosporium solani*, *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Rhynchosporium commune* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Krauss y Soberanis, 2001, Jensen et al., 2004, Yohalem et al., 2004, Kosawang et al., 2014,

Schöneberg et al., 2015, Sun et al., 2015a, 2015b, Dubey et al., 2016, Lysøe et al., 2017, Samsudin et al., 2017).

2.10. MECANISMOS DE ACCIÓN

Algunos de los mecanismos de acción involucrados en el control biológico de cepas de *C. rosea* contra diferentes patógenos han sido la competencia por nutrientes, el micoparasitismo (Sutton et al., 1997, Roberti et al., 2008), la producción de metabolitos secundarios, como antibióticos y toxinas, y la inducción de resistencia en las plantas (Chatterton y Punja, 2009, Fatema et al., 2018).

2.11. MICOPARASITISMO

Uno de los mecanismos de control más estudiados en numerosos aislados de *C. rosea* es el micoparasitismo. Estudios realizados mediante microscopía electrónica demostraron que las hifas del aislado PG-A-Fr-88-710 de *G. roseum*, sinónimo de *C. rosea*, parasitaban las hifas del aislado YU-92-1 de *B. cinerea* (Yu y Sutton, 1997). En el año 2002, Li et al. demostraron a partir de micrografías electrónicas de barrido que hifas del aislado GR-8 de *G. roseum* obtenidas de esclerocios deteriorados de *Sclerotinia sclerotiorum* colonizan tubos germinativos y conidios de *B. cinerea*. También observaron que la penetración de las hifas se daba de forma directa, sin formación de apresorios en los sitios de penetración.

Clonostachys rosea es capaz de interpretar ciertos mecanismos de defensa expresados por hongos patógenos a la hora de la interacción entre ambas especies (Dubey et al., 2014). Esto se explica fundamentalmente debido a que presenta múltiples variantes de los genes necesarios para la actividad de micoparasitismo y expresa diferentes copias dependiendo del patógeno con el que interactúe (Nygren et al., 2018).

2.12. COMPETENCIA

La competencia por nutrientes es otro de los mecanismos encontrados en la interacción de cepas de *C. rosea* con cepas de *B. cinerea*. Esta competencia ocurre

principalmente en las zonas donde se encuentra tejido herido y flores y hojas en senescencia (Yu y Sutton, 1999).

2.13. INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Aislados de *Clonostachys rosea* tienen la posibilidad de colonizar la rizósfera y el interior de las raíces e inducir positivamente los genes que están involucrados en las vías biosintéticas del ácido jasmónico/etileno y fenilpropanoide. De esta manera, desencadenan la resistencia sistémica inducida (ISR) (Lahlali y Peng, 2014).

En estudios de la Universidad del Noreste en Harbin, China, se estudiaron sobre hojas de tomate los mensajeros secundarios y los compuestos fitohormonales relacionados con las defensas que se generan cuando las plantas se inoculaban con *Botrytis* y con una suspensión de 10^7 UFC esporas/ml de una cepa de *C. rosea*. Los tratamientos inoculados solo con *B. cinerea* presentaron el mayor contenido de ABA, mientras que las plantas inoculadas con *C. rosea* presentaron el mayor contenido de GA3.

Mouekouba et al. (2014), estudiando el efecto sobre plantas de tomate de un aislado de *C. rosea* obtenido de un suelo con césped, observaron que este aislado era capaz de inducir la expresión de mecanismos de resistencia al moho gris en la planta de tomate y así aumentar la actividad enzimática de PAL, PPO y GST, y también la producción de AIA.

2.14. ANTIBIOSIS

El control biológico de *C. rosea* contra patógenos se atribuye principalmente a la secreción de enzimas que degradan la pared celular y la producción de metabolitos secundarios como antibióticos y toxinas (Chatterton y Punja, 2009, Fatema et al., 2018).

Estudios de Zhai et al. del año 2016 sostienen que algunos metabolitos secundarios secretados por *C. rosea* pueden interferir con el crecimiento de patógenos. Los metabolitos secundarios que incluyen bisorbicilinoideos y TMC-151 C y E derivados de este hongo antagonista mostraron una potente actividad antibacteriana

contra seis bacterias diferentes: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Micrococcus tetragenus* y *Staphylococcus aureus*.

2.15. SECRECIÓN DE ENZIMAS

Los componentes de las paredes celulares de los hongos son complejos; están constituidos principalmente por quitina, glucanos y glicoproteínas (Bowman y Free, 2006). Las enzimas secretadas por *C. rosea* pueden degradar la pared celular del huésped, que es una barrera importante que se utiliza para proteger la célula (Sun et al., 2020).

Estudios han demostrado que *C. rosea* tiene la capacidad de producir enzimas como glucanasas, quitinasas y celulasas (Dávila et al., 1999, Goedegebuur et al., 2002, Inglis y Kawchuk, 2002, Lübeck et al., 2002, Roberti et al., 2002). Chatterton y Punja, en el año 2009, demostraron que la producción de quitinasa en *C. rosea* fue inducida por paredes celulares de *Fusarium* sp. La expresión de los genes que codifican la quitinasa también se desencadenó por la presencia de paredes celulares de diferentes hongos, como *F. culmorum*, *R. solani* y *R. cerealis*.

La expresión de genes que codifican la producción de determinadas enzimas está inducida por la presencia de ciertos patógenos. Esto se demuestra mediante investigaciones llevadas a cabo en el año 2017, en las que se concluye que la sobreexpresión del gen de endoquitinasa Chi67-1 en *C. rosea* aumentó significativamente su actividad de control biológico contra *S. sclerotiorum*. (Sun et al., 2017).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio y en el solarío del Grupo Disciplinario de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Agronomía en el período desde junio del 2018 hasta junio del 2020.

3.1. SELECCIÓN DEL AISLADO DEL PATÓGENO

Siete aislados del patógeno de la colección del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía (cuadro n.º 1) se utilizaron para determinar la severidad en hojas de tomate. El aislado más agresivo se seleccionó para el ensayo de cultivo dual y de control del moho gris en planta.

Para recuperar los aislados del patógeno conservados en papel a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se cortaron secciones pequeñas en condiciones de asepsia, se colocaron en placas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días. A partir de la punta de hifa de cada aislado se repicó a nuevas placas de Petri con PDA y se incubaron a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 días (Martínez, 2012). Una vez esporuladas las colonias del patógeno, se agregó a cada placa 2 ml de agua destilada con 0,1 % de Tween 20 estéril, y con una espátula de Drigalsky se la esparció superficialmente para liberar los conidios. La suspensión de esporas se filtró a través de una gasa estéril hacia un vaso de bohemia esterilizado, y la concentración de esporas se ajustó por medio de cámara de Neubauer para llegar a la concentración de 1×10^6 esporas por ml.

Posteriormente se utilizaron hojas sanas y expandidas de plantas de tomate provenientes de un cultivo comercial bajo invernáculo sin aplicación de agroquímicos, de variedad Elpida. Las hojas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1 % por 1 minuto, luego se hicieron dos enjuagues de 1 minuto cada uno en agua destilada estéril. A continuación, se retiró el excedente de humedad con papel absorbente por 30 segundos, los pecíolos de las hojas se cubrieron en algodón humedecido con 2 ml de agua destilada estéril y se colocaron en bandejas plásticas con tapa (Martínez, 2012). Se provocó una herida en cada folíolo con una aguja estéril y sobre las heridas se inoculó con una gota de 20 μl una de las ocho suspensiones preparadas previamente.

La agresividad de las cepas de *B. cinerea* se determinó midiendo el diámetro mayor de la mancha en centímetros del avance de la enfermedad sobre los folíolos. Las evaluaciones comenzaron a las 48 horas de la inoculación y las medidas se hicieron cada 24 horas durante 5 días consecutivos.

Cuadro n.º 1. Aislados de *B. cinerea*

Nombre de aislados	Cultivo	Año
Bt 11, Bt 21, Bt 117, Bt 133, Bt 143, Bt 160, Bt 181	Tomate	2015

3.2. SELECCIÓN DE AISLADOS DE *CLONOSTACHYS* SPP.

Seis aislados de *Clonostachys* spp. pertenecientes a la micoteca del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (cuadro n.º 2) se evaluaron por su capacidad antagónica frente a *B. cinerea* utilizando la técnica de cultivos duales.

A partir de colonias puras de *Clonostachys* spp. y de *B. cinerea* de 10 y 5 días de edad, respectivamente, se obtuvieron mediante sacabocado discos de micelio de 5 mm de diámetro de la zona de avance de la colonia. Cada disco del antagonista y del patógeno se colocó sobre el medio PDA a 30 mm del borde de una placa de Petri de 90 mm de diámetro. Como testigo se colocó el disco de micelio de *B. cinerea* en la zona central de la placa de Petri. Todas las placas se incubaron a 19 °C en estufas de crecimiento durante 5 días.

Para evaluar la capacidad antagónica se midió el radio de crecimiento del patógeno (RCP) cada 24 horas durante 5 días consecutivos. Conjuntamente, a partir de los datos recabados al quinto día, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) empleando la fórmula de Ezziyyani et al. (2004), donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento en el cultivo dual.

$$\text{PICR} = (R1 - R2)/R1 \times 100$$

Cuadro n.º 2. Aislados de *Clonostachys* spp.

Nombre del aislamiento	Cultivo	Órgano	Región	Año
Pay 2	Cannabis	Tallo	Paysandú	2018
Pay 4	Cannabis	Tallo	Paysandú	2018
Pal 10	Cannabis	Tallo	Palmitas	2018
Pal 14	Cannabis	Tallo	Palmitas	2018
CF 1	Frutilla	Tallo	Salto	2017
ACC 28	Frutilla	Tallo	Salto	2018

3.3. EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS CON CEPAS DE *CLONOSTACHYS* SPP. SOBRE PLANTAS DE TOMATE

Se utilizaron plantas de tomate var. Elpida de 65 días postsiembra plantadas en macetas de 1000 cc con sustrato comercial (figura n.º 1).



Figura n.º 1. Plantas de tomate var. Elpida de 65 días después de la siembra

Para la obtención del inóculo del patógeno se repicó el aislado más virulento en placas de Petri con PDA, se incubó en oscuridad durante 5 días a 20 °C y a partir del borde de la colonia se cortaron con sacabocado discos de micelio de 5 mm de diámetro. La inoculación de *B. cinerea* consistió en colocar un disco sobre el haz de

las hojas de plantas de tomate, con previa perforación en su centro con una aguja estéril (Lumbreras, 2017) (figura n.º 2).



Figura n.º 2. Disco de agar de 5 mm de diámetro con micelio de *B. cinerea* sobre folíolo de hoja de tomate

Para la aplicación del antagonista se picaron en placas de Petri con PDA los dos aislados de *Clonostachys* spp. con mayor capacidad antagónica. Las placas se incubaron durante 15 días a 25 °C. Tres colonias de cada aislado se rastrillaron a través de un asa de Drigalsky con agua destilada con 0,1% de Tween 20 estéril para obtener una suspensión de esporas. La concentración de conidios de cada aislado se midió en cámara de Neubauer y se ajustó a 10^6 esporas ml^{-1} (Morandi et al., 2003). La aplicación de ambas cepas de *Clonostachys* sp. se efectuó 24 horas antes de la inoculación del patógeno. Con un asperjador manual (figura n.º 3) se aplicó 1,5 mL de la suspensión de conidios en cada folíolo de tomate. Las perforaciones con aguja estéril se hicieron en todos los tratamientos al mismo tiempo, previamente a la aplicación de *Clonostachys* spp., con independencia de cada tratamiento. Adicionalmente, se hizo una segunda aplicación de la suspensión de esporas de *Clonostachys* spp. el mismo día que se inoculó con el disco de micelio, antes de colocarlo sobre el folíolo de la hoja de tomate.

Las plantas de los tratamientos se cubrieron con bolsas de plástico transparente para mantener la humedad y evitar la contaminación entre los tratamientos (figura 4). El ensayo se realizó en condiciones de fotoperiodo y temperatura controlada. El fotoperiodo utilizado fue de 12 horas de luz y la temperatura de 25 °C.



Figura n.º 3. Aplicación con el antagonista sobre folíolo de hoja de tomate con suspensión de esporas de aislado de *Clonostachys* sp.



Figura n.º 4. Plantas de tomate inoculadas cubiertas con bolsas de plástico transparente

A partir de las 24 horas posteriores a la inoculación del patógeno se evaluaron los síntomas en hojas mediante observación visual por escala durante cinco días. Los valores de la escala fueron de 0 a 5 en función de la extensión de la mancha en la superficie del folíolo. El valor 0 correspondió a la ausencia de síntoma; el valor 1, de 1 a 25 %; el valor 2, de 25 a 50 %; el valor 3, de 50 a 75 %; el valor 4, de 75 a 100 %, y el valor 5, a la totalidad de la superficie de folíolo infectada.

Estos datos se transformaron en índice de severidad (IS) mediante la siguiente ecuación propuesta por Townsend y Heuberguer (Orjeda, 1998):

$$IS = \sum nb / (N-1) T * 100$$

IS: índice de severidad

n: número de folíolos en cada nivel

b: grado de severidad

N: número de grado máximo en la escala (5)

T: número total de folíolos evaluados

Los valores del índice de severidad se integralizaron como área bajo la curva de progreso del índice de severidad de la enfermedad (ABCPISE), conforme a la ecuación de integración trapezoidal descrita por Campbell y Madden (1990).

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental fue en bloques completamente al azar para la evaluación de la agresividad de los aislados de *B. cinerea* con ocho tratamientos (ADE + 0,1% Tween 20, Bt 11, Bt 21, Bt 117, Bt 133, Bt 143, Bt 160, y Bt 181), cinco repeticiones y la unidad experimental, una bandeja plástica transparente con tres folíolos. Además, se utilizó el mismo diseño experimental en la evaluación del control del moho gris en planta con seis tratamientos (ADE + 0,1 % Tween 20, Bt 181, Pay 4, Pal 14, Pay 4 + Bt 181, Pal 14 + Bt 181), tres repeticiones y la unidad experimental de cinco plantas.

Para el ensayo del cultivo dual el diseño experimental fue completamente al azar. Se evaluaron siete tratamientos (Bt 181, Bt 181 + Pay 2, Bt 181 + Pay 4, Bt 181 + Pal 10, Bt 181 + Pal 14, Bt 181 + CF 1 y Bt 181 + ACC 28) con cinco repeticiones y la placa como unidad experimental. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y las medias de los tratamientos se compararon por Tukey (5%) (R student).

3.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identidad de la especie de los aislados se realizó mediante análisis de biología molecular. Inicialmente, los aislados de *Clonostachys* spp. se cultivaron en placas de Petri con el medio papa dextrosa agar por cinco días a 25 °C y se extrajo ADN a través del kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial de la marca Zymo Research, siguiendo el protocolo recomendado por sus fabricantes.

La amplificación del ADN se realizó mediante reacciones en cadena mediadas por una enzima polimerasa (técnica conocida como PCR) en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler. Para las reacciones se formó una mezcla de 25 µl compuesta por Buffer, 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), nucleótidos (20 mM), MgCl₂ (2,5 mM), cebadores EF1-728 (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG)/ EF1-986 (TACTTGAAGGAACCCTTAC) (Carbone y Kohn, 1999) (0,4 µM de cada uno), Taq polimerasa (1,25 U, SBS Genetech Co., Ltd., China) y 1 µl de ADN (100 ng/µl). Las condiciones de la PCR fueron una primera desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, seguida por 34 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos y, por último, a 72 °C durante 10 minutos.

Luego de la amplificación, se analizaron dos microlitros del producto obtenido 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). El tamaño de las bandas se estimó a través del uso de 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 sin ADN como control negativo con el objetivo de descartar una posible contaminación en la PCR.

Los productos de la PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea), y las secuencias resultantes se editaron manualmente en el programa MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011) para luego compararse con las depositadas en el GenBank mediante búsqueda BLAST.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SELECCIÓN DEL AISLADO MÁS AGRESIVO DEL PATÓGENO

En la evaluación de la agresividad de las siete cepas del patógeno, Bt 181 mostró un diámetro mayor de infección a los demás tratamientos, pero no se diferenció de las cepas Bt 143 ni Bt 117. Las hojas del tratamiento testigo con agua no se infectaron (cuadro n.º 3). De esta manera, se seleccionó la cepa Bt 181 de *B. cinerea* para los ensayos posteriores.

Los diferentes aislados de *Botrytis* spp. evaluados mostraron diferencias en la agresividad cuando se inocularon en hojas de tomate (cuadro n.º 3), lo que comprueba la importancia de realizar ensayos de selección previos a su utilización en ensayos de biocontrol. Este ensayo permitió descartar los aislados más débiles o menos agresivos del patógeno y seleccionar un aislado (Bt 181) dentro del grupo de los más agresivos.

La existencia de diferencias en cuanto a la agresividad entre varios aislados de *Botrytis* fue anteriormente comunicada por Kumari et al. (2014), quienes descubrieron que en el proceso de infección de *B. cinerea* intervienen enzimas líticas y el ácido oxálico, y que la concentración de estos juega un rol muy importante. Tal como reporta este autor, se ha visto que la actividad de estas enzimas podría explicar las diferencias en la patogenicidad de los aislados.

Cuadro n.º 3. Diámetro de la mancha foliar en hojas de tomate inoculadas con los aislados de *B. cinerea*

Aislados	Diámetro promedio (mm)
Bt 181	34,267 A
Bt 143	23,333 BA
Bt 117	18,400 BA
Bt 160	18,133 B
Bt 21	8,2670 B
Bt 11	8,0000 B
Bt 133	1,4000 B
Testigo	0,0000 B

Las medias de los tratamientos seguidas de la misma letra no difieren significativamente por el test Tukey ($p = 0,05$).

4.2. SELECCIÓN DE AISLADOS DE *CLONOSTACHYS* SPP.

La totalidad de los aislados causó inhibición de crecimiento del patógeno en el orden de 25-35 % (cuadro n.º 4). El mayor porcentaje de inhibición fue de 35 %, un porcentaje relativamente bajo en comparación con otros antagonistas de *B. cinerea* evaluados en diferentes trabajos (Calvo-Araya et al., 2012, You et al., 2016).



Figura n.º 5. Cultivos duales de los aislamientos Palmitas 14, Paysandú 4 y Corona frutilla en el quinto día de evaluación

Esto se puede explicar debido a la lenta capacidad que presentaron los aislados de *Clonostachys* spp. en colonizar el medio utilizado en las condiciones

evaluadas en relación con el crecimiento que presentó la cepa de *B. cinerea*. Ninguno de los aislados de *Clonostachys* spp. logró cubrir toda la superficie de la placa.

No se observaron diferencias en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno entre la mayoría de los aislados (cuadro n.º 4). Se seleccionaron los aislados Pay 4 y Pal 14 con mayor valor de inhibición de micelio de *B. cinerea* para el ensayo de control del moho gris en plantas de tomate.

En el caso de los cultivos duales, el mecanismo de acción para la inhibición del crecimiento del patógeno puede ser la antibiosis. Esto se deduce con base en la observación de las colonias que no llegaron a tener contacto entre ellas durante el período de evaluación. Asimismo, existe bibliografía que confirma que existen diferentes especies del género *Clonostachys* spp. que producen gran diversidad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales presentan elevada actividad antifúngica (Chatterton y Punja, 2009, Rodríguez et al., 2011, Fatema et al., 2018, Han et al., 2020, Sun et al., 2020).

La forma utilizada para evaluar el ensayo, que finaliza cuando el patógeno coloniza la totalidad de la placa de Petri, impidió evaluar otros mecanismos de acción, como el micoparasitismo, reportado como mecanismo de control de *C. rosea* (Yu y Sutton, 1997, Li et al., 2002). Tampoco el cultivo dual permite evaluar otros mecanismos, como la competencia con el patógeno en los sitios de acción o la inducción de resistencia (Mondino y Vero, 2006). Bajo las condiciones del ensayo, la cepa del patógeno completó la totalidad de la placa al quinto día del inicio del ensayo.

Cuadro n.º 4. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *B. cinerea*

Tratamiento	Media de PICR (mm)
Bt181 + Pay4	34,974 A
Bt181 + Pal14	34,205 A
Bt181 + CF2	33,333 A
Bt181 + Pay2	31,641 BA
Bt181 + ACC28	30,769 BA
Bt181 + Pal10	25,436 B
Bt181	0 C

Las medias de los tratamientos seguidas de la misma letra no difieren significativamente por el test Tukey ($p = 0,05$).

4.3. EVALUACIÓN DEL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO GRIS CON CEPAS DE *CLONOSTACHYS* SPP. SOBRE PLANTAS DE TOMATE

El testigo con la aplicación del patógeno fue el único que se diferenció del resto de los tratamientos. Las hojas tratadas con las cepas de *C. rhizophaga* y el patógeno presentaron menor severidad comparado con el tratamiento solo con *B. cinerea* (cuadro n.º 5). También se comprobó que las cepas de *C. rhizophaga* no son patógenas de tomate por no desarrollar síntomas en los folíolos inoculados (cuadro n.º 5).

Los resultados obtenidos muestran que existe un efecto de control de ambas cepas en la interacción con *B. cinerea* (figura n.º 4). El testigo solo con *B. cinerea* mostró que la totalidad de las plantas inoculadas expresaron el síntoma característico del moho gris (figura n.º 5).

Cuadro n.º 5. Área bajo la curva del progreso del índice de severidad de la enfermedad promedio en hojas de plantas de tomate

Tratamiento	ABCPISE
Bt 181	126,67 A
Pay 4 + Bt 181	29,17 B
Pay 14 + Bt 181	17,50 B
Pay 4	0 C
Pal 14	0 C
ADE + 0,1% Tween	0 C

Las medias de los tratamientos seguidas de la misma letra no difieren significativamente por el test Tukey ($p = 0,05$).



Figura n.º 6. Foliolo de hoja de tomate con disco de micelio de *B. cinerea* y suspensión de esporas de *C. rhizophaga*



Figura n.º 7. Foliolo de hoja de tomate del testigo solo con *B. cinerea* con síntomas de moho gris 96 horas posinoculación

En el ensayo en planta se observó control del moho gris por parte de las dos cepas de *C. rhizophaga* evaluadas. En la planta mediante la interacción con el patógeno se pueden haber expresado otros mecanismos de acción no evaluados *in vitro*. Estos pueden haber sido el micoparasitismo, la competencia o incluso la secreción de enzimas que degradan la pared celular de los hongos, también la producción de metabolitos secundarios como antibióticos y toxinas con elevada actividad antifúngica (Chatterton y Punja, 2009, Fatema et al., 2018). La expresión y la sumatoria de estos permitieron que el antagonista ejerciera un control efectivo sobre el moho gris en las condiciones del ensayo.

En relación con el control biológico de *C. rhizophaga* frente al moho gris, no hay antecedentes; sin embargo, existen estudios para otras enfermedades. Así, el trabajo de Dugan (2012) destaca la utilización de *C. rhizophaga* como micoparásito, además de su utilización en diversos experimentos de control biológico; por ejemplo, resalta la utilización de sus aislados como micoparásitos de *Didymella rabiei* (Dugan et al., 2005). También se destaca la utilización de este hongo para el control de la pudrición de raíz causada por *Rosellinia* sp. en el cultivo de cacao (Mendoza García et al., 2003). En estudios realizados en Brasil demostraron la capacidad de biocontrol de diferentes aislados de *C. rhizophaga* y *C. chlorolecua* frente al tizón temprano causado por *Alternaria solani* en el cultivo de papa (Silva, 2020).

El método más utilizado para inocular *B. cinerea* es a partir de aspersiones con suspensión de esporas con concentraciones que oscilan entre 10^6 y 10^8 esporas/ml (Sutton y Peng, 1993, Sutton et al., 1997). En nuestros ensayos preliminares no se logró infectar las plantas con el método descrito anteriormente, por tanto, se optó por la inoculación con discos de micelio. Este método resultó demasiado agresivo e impidió continuar con mediciones luego del quinto día. Esto sucedió debido a la rotura de muchos de los folíolos inoculados de esta forma en diferentes tratamientos.

La forma de evaluación empleada y los resultados obtenidos permitieron la aproximación a la búsqueda de posibles controladores biológicos a partir de las cepas utilizadas.

4.4. ANÁLISIS MOLECULAR

Las especies identificadas de los seis aislados de *Clonostachys* spp. fueron una *C. chloroleuca*, dos *C. rosea f. rosea* y tres *C. rhizophaga* (cuadro n.º 6). En estos resultados se puede observar que en los seis aislados evaluados se identifican tres especies diferentes sobre el mismo género.

Cuadro n.º 6. Aislados de *C. chloroleuca*, *C. rosea f. rosea* y *C. rhizophaga* identificados mediante la secuencia parcial del gen EF1-alfa

Nombre del aislamiento	Especie	Porcentaje de identidad	n.º accesión ¹
Paysandú 4	<i>C. rhizophaga</i>	99,49 %	KX184992.1
Paysandú 2	<i>C. rosea f. rosea</i>	99,75 %	KX185001.1
Palmitas 10	<i>C. rhizophaga</i>	100 %	KX184992.1
Palmitas 14	<i>C. rhizophaga</i>	100 %	KX184992.1
Corona frutilla 2	<i>C. rosea f. rosea</i>	99,75 %	KX185001.1
ACC 28	<i>C. chloroleuca</i>	99,75 %	KX184988.1

¹ Número de accesión Gen Bank.

Dentro de estas especies, *C. rosea* presenta mayor número de antecedentes como agente de control biológico, particularmente frente a la enfermedad del moho gris. Sin embargo, la capacidad de biocontrol del resto de las especies identificadas, *C. chloroleuca* y *C. rhizophaga*, todavía se están estudiando. Estudios recientes de Broberg et al. (2021) secuenciaron once aislados pertenecientes a cinco especies del género, dentro de estas se encontraban *C. rhizophaga* y *C. chloroleuca*, determinando la capacidad de estas especies de disminuir la tasa de crecimiento del patógeno *Fusarium graminearum* en plántulas de trigo.

Dentro de las diferentes especies del género *Clonostachys* spp. existen antecedentes sobre patogenicidad de algunas cepas en diferentes cultivos y regiones del mundo. Tal es el caso del primer reporte de *C. rhizophaga* como patógeno del bambú gigante (*Dendrocalamus giganteus*) en Mozambique (Zazzerine et al., 2010). A esto se suma el primer reporte de patogenicidad en garbanzo (*Cicer arietinum*) en Siria (Abang et al., 2009) y en México (Cota-Barreras et al., 2022). Todos estos reportes indican que es fundamental determinar la patogenicidad de las cepas antagonistas en las especies hortícolas con la finalidad de evitar la introducción de un agente de control biológico que termine siendo un fitopatógeno de plantas de cultivos comerciales.

En futuros estudios de búsqueda de agentes de biocontrol es importante pensar en todas las aptitudes que debe tener una cepa para poder viabilizar su uso comercial. En este sentido, se deberán continuar los trabajos para determinar otros modos de acción de los aislados de la colección, caracterizarlos determinando la temperatura óptima de crecimiento y la compatibilidad con otros métodos de control, así como evaluar su efecto de control del moho gris en planta en condiciones controladas y en campo. Una vez seleccionadas las cepas, se deberá continuar con la optimización de las condiciones de producción del antagonista, el desarrollo y el registro de la formulación.

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados y en las condiciones que se realizó el estudio, se concluye:

Las cepas de *C. rosea f. rosea*, *C. chloroleuca* y *C. rhizophaga* son antagonistas de *B. cinerea*.

Las cepas Pay4 y Pal14 de *C. rhizophaga*, evaluadas en plantas presentan potencial para el manejo del moho gris en tomate.

6. RESUMEN

El moho gris causado por *Botrytis cinerea* es una de las enfermedades más destacadas en cultivos protegidos, entre ellos el tomate. Esta enfermedad puede afectar cualquier órgano de la planta en cualquier estado de desarrollo. El manejo se basa principalmente en el uso de productos químicos; sin embargo, la selección de cepas resistentes del patógeno y los efectos negativos sobre la salud de los trabajadores y consumidores demandan el desarrollo de alternativas de control para los cultivos. En este sentido, el control biológico aparece como una alternativa viable para la protección de cultivos hortícolas. De manera de contribuir al desarrollo de agentes de biocontrol para el manejo de moho gris en tomate, el objetivo del trabajo es caracterizar seis aislados de *Clonostachys* spp. y evaluar su potencial de control biológico del moho gris en plantas de tomate a partir de enfrentamientos en cultivos duales de seis aislados de *Clonostachys* spp. frente a la cepa más agresiva de *B. cinerea*. Se seleccionaron dos aislados, Pay 4 y Pal 14, para la evaluación del control de moho gris en plantas de tomate en condiciones controladas de humedad y temperatura. De las seis cepas se identificaron tres especies: dos *C. rosea* f. *rosea*, una *C. chlorolecua* y dos *C. rhizophaga*. Ambos aislados seleccionados para el ensayo en planta pertenecen a la especie *C. rhizophaga*, y demostraron potencial para el control biológico del moho gris.

Palabras claves: *Botrytis cinerea*, *C. rosea* f. *rosea*, *C. chlorolecua*, *C. rhizophaga*, antagonista, biocontrol, horticultura

7. SUMMARY

Grey mould caused by *Botrytis cinerea* is one of the most prominent diseases in protected crops, including tomato. This disease can affect any plant organ at any stage of development. Management is mainly based on the use of chemical products; however the selection of resistant strains of the pathogen, the negative effects on the health of workers and consumers, demand the development of control alternatives for crops. In this sense biological control appears as a viable alternative for the protection of horticultural crops. In order to contribute to the development of biocontrol agents for the management of grey mould in tomato, the aim of this work was to characterise six isolates of *Clonostachys spp.* and evaluate their potential for biological control of grey mould in tomato plants. Based on dual-culture confrontations of six isolates of *Clonostachys spp.* against the most aggressive strain of *B. cinerea*. Two isolates, Pay 4 and Pal 14, were selected for evaluation of grey mould control on tomato plants under controlled conditions of humidity and temperature. Of the six isolates, three species were identified: two *C. rosea f. rosea*, one *C. chlorolecua* and two *C. rhizophaga*. Both isolates selected for the plant trial belonged to the species *C. rhizophaga* and showed potential for biological control of grey mould.

Keywords: *B. cinerea*, *C. rosea f. rosea*, *C. chlorolecua*, *C. rhizophaga*, antagonist, biocontrol, horticulture

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abang, M. M.; Kabbabeh, S.; Ahmed, S.; Murad, S.; Chilvers, M. I.; Peever, T. L.; Schroers, H.-J. 2009. First report of chickpea wilt caused by *Clonostachys rhizophaga* in Syria. (en línea). *Plant Disease*. 93(6): 666. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0666A>
2. Agrios, G. N. 2008. *Fitopatología*. 2a. ed. México, UTEHA. 838 p.
3. Alexopoulos, C. J. 1966. *Introducción a la micología*. Buenos Aires, EUDEBA. 615 p.
4. Berg, L. V. D.; Lentz, C. P. 1968. The effect of relative humidity and temperature on survival and growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*. 46(12): 1477 - 1481.
5. Bernal, R. 2010. *Enfermedades de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión*. (en línea). Montevideo, INIA. 49 p. (Serie Técnica no. 181). Consultado 12 ago. 2019. Disponible en <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429230710110412.pdf>
6. Bostanian, N. J.; Belanger, A. 1985. The toxicity of three pyrethroids to *Amblyseius fallacis* (Garman) Acari. *Phytoseiidae* and their residues on apple foliage. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 14(3-4): 243 - 250.
7. Bowman, S. M.; Free, S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. 28(8): 799 - 808.
8. Broberg, M.; Dubey, M.; Iqbal, M.; Gudmundsson, M.; Ihrmark, K.; Schroers, H. J.; Karlsson, M. 2021. Comparative genomics highlights the importance of drug efflux transporters during evolution of mycoparasitism in *Clonostachys* subgenus *Bionectria* (Fungi, Ascomycota, Hypocreales). *Evolutionary Applications*. 14(2): 476 - 497.

9. Calvo-Araya, J. A.; Rivera-Coto, G.; Orozco-Cayasso, S.; Orozco-Rodríguez, R. 2012. Aislamiento y evaluación in vitro de la Antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*. 23(2): 225 - 231.
10. Campbell, C. L.; Madden, L. V. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York, Wiley. 532 p.
11. Carbone, I.; Kohn, L. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91(3): 553 - 556.
12. Chatterton, S.; Punja, Z. K. 2009. Chitinase and b-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 55(4): 356 - 367.
13. CMI description of pathogenic fungi and bacteria. 1986. *Mycopathologia*. 96(3): 171 - 196.
14. Cota, L. V.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Macedo, P. E. F. 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control*. 50(3): 222 - 230.
15. Cota-Barreras, C. I.; García-Estrada, R. S.; León-Félix, J.; Valenzuela-Herrera, V.; Mora-Romero, G. A.; Leyva-Madrigal, K. Y.; Tovar-Pedraza, J. M. 2022. First report of *Clonostachys chloroleuca* causing chickpea wilt in Mexico. (en línea). *New Disease Reports*. 46: 12123. Consultado dic. 2022. Disponible en <https://doi.org/10.1002/ndr2.12123>
16. Dávila, M.; Acosta, N.; Betancourt, C.; Negrón, J. 1999. Chitinolytic capacity of fungi isolated from agricultural soils infested with the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 83(3-4): 189 - 199.
17. Dik, A. J.; Koning, G.; Köhl, J. 1999. Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 105(2): 115 - 122.

18. Dubey, M. K.; Jensen, D. F.; Karlsson, M. 2014. An ATP-binding cassette pleiotropic drug transporter protein is required for xenobiotic tolerance and antagonism in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. (en línea). *Molecular Plant Microbe Interactions*. 27(7): 725 - 732. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-13-0365-R>
19. _____.; _____.; _____. 2016. The ABC transporter ABCG29 is involved in H₂O₂ tolerance and biocontrol traits in the fungus *Clonostachys rosea*. *Molecular Genetics and Genomics*. 291(2): 677 - 686.
20. Dugan, F. M.; Lupien, S. L.; Hernandez-Bello, M.; Peever, T. L.; Chen, W. 2005. Fungi resident in chickpea debris and their suppression of growth and reproduction of *Didymella rabiei* under laboratory conditions. *Journal of Phytopathology*. 153: 431 - 439.
21. _____.; _____.; Chen, W. 2012. *Clonostachys rhizophaga* and other fungi from chickpea debris in the Palouse region of the Pacific Northwest, USA. *North American Fungi*. 7(6): 1 - 11.
22. Elad, Y. 1988. Latent infection of *B. cinerea* in rose flowers and combined chemical and physiological control of the disease. *Crop Protection*. 7(6): 361 - 366.
23. _____.; Evensen, K. 1995. Physiological aspects of resistance to *B. cinerea*. *Phytopathology*. 85(6): 637 - 643.
24. _____.; Wiliamson, P.; Tudzynski, P.; Delen, N. 2004. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, Springer. 403 p.
25. Espinosa de los Monteros, M. C. 2006. Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *B. cinerea*. Tesis Dr. Cádiz, España. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. 206 p.

26. Ezziyani, M.; Pérez Sánchez, C.; Requena, M. E.; Rubio, L.; Candela Castillo, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* —Ziyani—, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. no. 26: 69 - 78.
27. Fatema, U.; Broberg, A.; Jensen, D. F.; Karlsson, M.; Dubey, M. 2018. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. (en línea). *Scientific Reports*. 8: 15009. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33391-1>
28. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, AL). 2017. FRAC Code List 2017: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Limburgerhof. 12 p.
29. _____. 2019. Pathogen risk list. (en línea). Limburgerhof. 2 p. Consultado 10 ene. 2023. Disponible en <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf>
30. Gazzano, I.; Achkar, M.; Apezteguía, E.; Ariza, J.; Gómez, A.; Pivel, J. 2021. Ambiente y crisis en Uruguay: La agroecología como construcción contrahegemónica. *Revista de Ciencias Sociales*. 34(48): 13 - 40.
31. Gepp, V.; Vero, S.; Cassanello, M. E.; Romero, G.; Silvera, E.; González, P.; Rebellato, J.; Ferreira, Y.; Bentancur, O. 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*. 16(1): 97 - 107.
32. Giménez, G.; Paullier, J.; Maeso, D.; Leoni, C. 2003. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla. Montevideo, INIA. 63 p. (Boletín de Divulgación no. 82).
33. Goedegebuur, F.; Fowler, T.; Phillips, J.; Van Der Kley, P.; Van Solingen, P.; Dankmeyer, L.; Power, S. D. 2002. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Current Genetics*. 41(2): 89 - 98.
34. Han, P.; Zhang, X.; Xu, D.; Zhang, B.; Lai, D.; Zhou, L. 2020. Metabolites from *Clonostachys* Fungi and their biological activities. (en línea). *Journal of Fungi*. 6(4): 229. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.3390/jof6040229>

35. Hoopen, G. M.; Robert, R. E. E. S.; Philo, A. I. S. A.; Stirrup, T.; Krauss, U. 2003. Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Mycological Research*. 107(5): 587 - 596.
36. Inglis, G. D.; Kawchuk, L. M. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*. 48(1): 60 - 70.
37. Jacometti, M. A.; Wratten, S. D.; Walter, M. 2010. Alternatives to synthetic fungicides for *B. cinerea* management in vineyards. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 16(1): 154 - 172.
38. Jarvis, W. R. 1989. Managing diseases in greenhouse crops. (en línea). *Plant Disease*. 73(3): 190 - 194. Consultado 10 set. 2019. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1989Articles/PlantDisease73n03_190.PDF
39. Jensen, B.; Knudsen, I. M. B.; Madsen, M.; Jensen, D. F. 2004. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology*. 94(6): 551 - 560.
40. Köhl, J.; Fokkema, N. J. 1998. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: Boland, G.; Kuykendall, L. eds. *Plant microbe interactions and biological control*. New York, Marcel Dekker. pp. 49 - 88.
41. Kosawang, C.; Karlsson, M.; Véléz, H.; Rasmussen, P. H.; Collinge, D. B.; Jensen, B.; Jensen, D. F. 2014. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. *Fungal Biology*. 118(4): 364 - 373.
42. Krauss, U.; Soberanis, W. 2001. Biocontrol of cocoa pod diseases with Mycoparasite mixtures. *Biological Control*. 22(2): 149 - 158.

43. Kumari, S.; Tayal, P.; Sharma, E.; Kapoor, R. 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiological Research*. 169(11): 862 - 872.
44. Lahlali, R.; Peng, G. 2014. Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. *Plant Pathology*. 63(2): 447 - 455.
45. Latorre, B. A. 1986. Manejo de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. *Revista Frutícola*. 7: 75 - 88.
46. _____; Flores, V.; Sara, A. M.; Roco, A. 1994. Dicarboximide-resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grape in Chile: Survey and characterization. *Plant Disease*. 78(10): 990 - 994.
47. Leroux, P. 1994. Influence du pH, d'acides aminés et de diverses substances organiques sur la fongitoxicité du pyriméthanol, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil vis-à-vis de certaines souches de *Botrytis cinerea*. (en línea). *Agronomie*. 14(8): 541 - 554. Consultado ene. 2023. Disponible en https://www.agronomy-journal.org/articles/agro/pdf/1994/08/Agronomie_0249-5627_1994_14_8_ART0006.pdf
48. Li, G. Q.; Huang, H. C.; Kokko, E. G.; Acharya, S. N. 2002. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 43: 211 - 218.
49. Lübeck, M.; Knudsen, I. M. B.; Jensen, B.; Thrane, U.; Janvier, C.; Jensen, D. F. 2002. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycological Research*. 106(7): 815 - 826.
50. Lumberras, P. 2017. Influencia de PO212 y el ritmo circadiano sobre la resistencia de pimiento a *B. cinerea*. Trabajo Máster Biología Molecular, Celular y Genética. La Coruña, España. Universidad de La Coruña. Facultad de Ciencias. 40 p.

51. Lysøe, E.; Dees, M. W.; Brurberg, M. B. 2017. A three-way transcriptomic interaction study of a biocontrol agent (*Clonostachys rosea*), a fungal pathogen (*Helminthosporium solani*), and a potato host (*Solanum tuberosum*). *Molecular Plant Microbe Interactions*. 30(8): 645 - 655.
52. MA. OAN (Ministerio de Ambiente. Observatorio Ambiental Nacional, UY). 2020. Denuncias ambientales. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado ene. 2023. Disponible en https://www.ambiente.gub.uy/oan/wp-content/uploads/2020/04/denuncias_ambientales.xls
53. Martínez, E. S. 2012. Correlación entre la evaluación “in vitro” e “in vivo” de la sensibilidad a fungicidas de *B. cinerea*: anilopirimidinas. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 48 p.
54. Mendoza García, R. A.; Ten Hoopen, G. M.; Kass, D. C. J.; Sánchez Garita, V. A.; Krauss, U. 2003. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. *Biological Control*. 27(2): 210 - 227.
55. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2017. Anuario estadístico agropecuario 2017. (en línea). Montevideo. 214 p. Consultado 10 ene. 2023. Disponible en <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2017/DIEA-Anuario2017.pdf>
56. _____. _____. 2018. Anuario estadístico agropecuario 2018. (en línea). Montevideo. 211 p. Consultado 16 ago. 2019. Disponible en https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf
57. Michereff-Filho, M.; Guedes, R. N. C.; Della-Lucia, T. M. C.; Michereff, M. F. F.; Cruz, I. 2004. Non-target impact of chlorpyrifos on soil arthropods associated with no-tillage cornfields in Brazil. *International Journal of Pest Management*. 50(2): 91 - 99.
58. Mondino, P.; Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos en plantas. Montevideo, Udelar. 158 p.

59. Morandi, M. A. B.; Sutton, J. C.; Maffia, L. A. 2000. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *B. cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 439 - 448.
60. _____. 2001. Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de *Clonostachys rosea* em tecidos de roseira e controle biológico de *Botrytis cinerea* pelo antagonista em restos culturais. Tese Dr. Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. Faculdade de Agronomia. 79 p.
61. _____.; _____.; _____. 2001. Development of *Clonostachys rosea* and Interactions with *B. cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica*. 29(2): 103 - 113.
62. _____.; Maffia, L. A.; Mizubuti, E. S.; Alfenas, A. C.; Barbosa, J. G. 2003. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: A valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological Control*. 26(3): 311 - 317.
63. _____.; _____.; _____.; _____.; _____.; Cruz, C. D. 2006. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *Biocontrol Science and Technology*. 16(6): 619 - 630.
64. Mouekouba, L. D. O.; Zhang, L.; Guan, X.; Chen, X.; Chen, H.; Zhang, J.; Zhang, J.; Li, J.; Yang, Y.; Wang, A. 2014. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves. (en línea). *Plos One*. 9(7): 102690. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102690>
65. Muñoz, M. 2021. Tomate: Una especie de exportación. (en línea). Santiago de Chile, ODEPA. 21 p. Consultado 21 dic. 2021. Disponible en <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/71089/ArtTomate202109.pdf>

66. Nygren, K.; Dubey, M.; Zapparata, A.; Iqbal, M.; Tzelepis, G. D.; Durling, M. B.; Karlsson, M. 2018. The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. *Evolutionary Applications*. 11(6): 931 - 949.
67. Observatorio Granjero, UY. 2014. Tendencias en la comercialización mayorista de tomate en el Mercado Modelo. (en línea). Montevideo, MGAP. 10 p. Consultado 10 ene. 2023. Disponible en <https://studylib.es/doc/4964150/tendencias-en-la-comercializaci%C3%B3n-mayorista-de>
68. Orjeda, G. 1998. Evaluación de la resistencia de los bananos a las enfermedades de sigatoka y marchitamiento por *Fusarium*: Guías técnicas Inibap. Roma, International Plant Genetic Resources Institute. 61 p.
69. Piontelli, E.; Giusiano, G. 2003. Notas micológicas VI: Selección de microhongos asociados a material vegetal y queratina desde Argentina y Chile. *Boletín Micológico*. 18: 89 - 99.
70. Roberti, R.; Zakrisson, E.; Flamigni, F.; De Vero, L.; Cesari, A. 2002. Antagonistic fungi producing hydrolytic enzymes, active in degrading the cell wall of some foot rot pathogens (*Fusarium* spp.) of wheat. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 109(1): 101 - 108.
71. _____; Veronesi, A.; Cesari, A.; Cascone, A.; Di Bernardino, I.; Bertini, L.; Caruso, C. 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*. 175(3): 339 - 347.
72. Rodríguez, M. A.; Cabrera, G.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Godeas, A. 2011. *Clonostachys rosea* BAF3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: Mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. (en línea). *Journal of Applied Microbiology*. 110(5): 1177 - 1186. Consultado 01 set. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x>

73. Rubio, V.; Ferreres, A. 2005. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. *In*: Marin, I.; Sanz, J. L.; Amils, R. eds. *Biología y medio ambiente*. Madrid, Ephemera. pp. 215 - 229.
74. Samsudin, N. I.; Rodríguez, A.; Medina, A.; Magan, N. 2017. Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, FUM1 gene expression and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* on maize cobs of different ripening stages. *International Journal of Food Microbiology*. 246: 72 - 79.
75. Schöneberg, A.; Musa, T.; Voegelé, R. T.; Vogelgsang, S. 2015. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. *Journal of Applied Microbiology*. 118(5): 1165 - 1179.
76. Schroers, H. J.; Samuels, G. J.; Seifert, K. A.; Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*. 91(2): 365 - 385.
77. Silva, H. A. O. D. 2020. Control of potato and tomato early blight with conidial suspensions and secondary metabolite extracts of *Clonostachys* spp. *Tese Mag. Scientiae*. Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Viçosa. Faculdade de Agronomia. 63 p.
78. Sun, Z. B.; Sun, M. H.; Li, S. D. 2015a. Draft genome sequence of mycoparasite *Clonostachys rosea* strain 67-1. (en línea). *Genome Announcements*. 3(3): 0054615. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1128/genomeA.00546-15>
79. _____.; _____.; _____. 2015b. Identification of mycoparasitism-related genes in *Clonostachys rosea* 67-1 active against *Sclerotinia sclerotiorum*. (en línea). *Scientific Reports*. 5(1): 18169. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1038/srep18169>
80. Sun, Z. B.; Sun, M. H.; Zhou, M.; Li, S. D. 2017. Transformation of the endochitinase gene *Chi67-1* in *Clonostachys rosea* 67-1 increases its biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. (en línea). *AMB*

- Express. 7(1): 1. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0313-x>
81. _____.; Zhang, J.; Sun, M. H.; Li, S. D. 2018. Identification of genes related to chlamydospore formation in *Clonostachys rosea* 67-1. (en línea). *Microbiologyopen*. 8(1): 00624. Consultado ene. 2023. Disponible en <https://doi.org/10.1002/mbo3.624>
 82. _____.; Li, S.; Ren, Q.; Xu, J.; Lu, X.; Sun, M. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology*. 129(3): 486 - 495.
 83. Sutton, J. C.; Peng, G. 1993. Biocontrol of *B. cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*. 83(6): 615 - 621.
 84. _____.; Li, D. W.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P.; Valdebenito-Sanhueza, R. M. 1997. *Gliocladium Roseum* a versatile adversary of *B. Cinerea* in crops. *Plant Disease*. 81(4): 316 - 328.
 85. _____.; Liu, W.; Huang, R.; Owen-Going, N. 2002. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*. 12(4): 413 - 425.
 86. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731 - 2739.
 87. Van Den Bosch, F.; Paveley, N.; Shaw, M.; Hobbelen, P.; Oliver, R. 2011. The dose rate debate: Does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology*. 60(4): 597 - 606.
 88. Yohalem, D. S.; Nielsen, K.; Green, H.; Funck Jensen, D. 2004. Biocontrol agents efficiently inhibit sporulation of *Botrytis aclada* on necrotic leaf tips but spread to adjacent living tissue is not prevented. *FEMS Microbiology Ecology*. 47(3): 297 - 303.

89. You, J.; Zhang, J.; Wu, M.; Yang, L.; Chen, W.; Li, G. 2016. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *B. cinerea* on tomato. *Biological Control*. 101: 31 - 38.
90. Yu, H.; Sutton, J. C. 1997. Effectiveness of Bumblebees and Honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. *Biological Control*. 10(2): 113 - 122.
91. _____.; _____. 1999. Density dynamics of *Gliocladium roseum* in relation to biological control of *B. cinerea* in red raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 21(1): 23 - 32.
92. Zazzerine, A.; Quaglia, M.; Davolio Marani, O. 2010. First report of *Clonostachys rhizophaga* as a pathogen of *Dendrocalamus giganteus* in Mozambique. *Plant Disease*. 94(3): 372.
93. Zhai, M. M.; Qi, F. M.; Li, J.; Jiang, C. X.; Hou, Y.; Shi, Y. P.; Di, D. L.; Zhang, J. W.; Wu, Q. X. 2016. Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(11): 2298 - 2306.