UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. FRENTE A *Bipolaris sorokiniana y Pyrenophora tritici-repentis*

por

Florencia DE LUCCA AGRELO

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2015

Tesis aprobada por:

Director: ----------

Ing. Agr. Msc. PhD. Carlos Pérez

Ing. Agr. Mag. Dra. Elisa Silvera

Ing. Agr. Mag. Cintia Palladino

Fecha: 13 de octubre de 2015

Autor: ----------

Florencia De Lucca Agrelo

AGRADECIMIENTOS

A todos los que contribuyeron en la realización de este trabajo, especialmente a mi familia.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN.....II
AGRADECIMIENTOS..... III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... VII

1. NTRODUCCIÓN 1

1.1 OBJETIVO GENERAL.....2

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 IMPORTANCIA DE LA AGRICULTURA EN EL URUGUAY 3

2.1.1 Caracterización de los sistemas agrícolas.....3

2.1.2 Efecto de la intensificación agrícola sobre los patógenos.....9

2.1.3 Importancia de *Bipolaris sorkiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis* en los sistemas agrícolas de Uruguay.....13

2.2 CONTROL BIOLÓGICO.....15

2.2.1 Agentes de control biológico.....16

2.2.1.1 Potencial de uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol. 17

2.2.2 *Trichoderma* spp. 17

2.2.2.1 Biología y clasificación.....17

2.2.2.2 Morfología y características culturales.....21

2.2.2.3 Mecanismos de antagonismo 22

2.2.2.5 Antecedentes en el uso de *Trichoderma* spp. como biofungicida en cultivos agrícolas 27

2.2.2.6 Ambientes que favorecen el desarrollo de comunidades de *Trichoderma* spp. 31

3. MATERIALES Y MÉTODOS 34

3.1 LOCALIZACIÓN 34
3.2 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* Y PATÓGENOS 34
3.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO IN VITRO 35
3.3.1 Cultivos duales de patógeno-antagonista 35
3.3.1.1 Interacción miceliar 35
3.3.2 Producción de compuestos volátiles antifúngicos 35
3.3.3 Producción de compuestos solubles antifúngicos en medio líquido 36
3.4 DETERMINACIONES 36
3.4.1 Cultivos duales de patógeno-antagonista 36
3.4.2 Producción de compuestos volátiles antifúngicos 38
3.4.3 Producción de compuestos solubles antifúngicos en medio líquido 38
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL 39
3.5.1 Modelo estadístico 39

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 40
4.1 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL PATÓGENO EN CULTIVOS DUALES 40
4.1.1 Tasa de crecimiento del patógeno 46
4.1.2 Tipo de reacción en la interacción 47
4.1.2.1 Interacción miceliar 50
4.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL PATÓGENO DEBIDO A COMPUESTOS VOLÁTILES ANTIFÚNGICOS 51
4.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DELCRECIMIENTO DEL PATÓGENO DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS SOLUBLES EN MEDIO LÍQUIDO 56
5. CONCLUSIONES 65

6. RESUMEN..... 66

7. SUMMARY 67

8. BIBLIOGRAFÍA..... 68

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No. **Página**

1. Relación entre la cantidad de esporas de *Bipolaris sorokiniana* 12

2. Lista de cepas de cada una de las especies de *Trichoderma* utilizadas en las pruebas de antagonismo. Se indica además el sustrato del cual fueron aisladas. 34

3. Radio de avance de las colonias de *Pyrenophora tritici repentis* en cultivos duales frente a las distintas cepas de *Trichoderma* utilizadas como antagonista, medido a los 10 días de crecimiento. 45

4. Radio de avance de las colonias de *Bipolaris sorokiniana* en cultivos duales frente a las distintas cepas de *Trichoderma* utilizadas como antagonista, medido a los 10 días de crecimiento. 46

5. Tasa de Crecimiento (TC) promedio por día para *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici repentis* frente al antagonismo de *Trichoderma* spp, a los 10 días de crecimiento, expresada en micras/día. 47

6. Patrones de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* frente a *Bipolaris sorokiniana*, evaluados a los 10 días de crecimiento. 48

7. Nivel de eficiencia de las cepas de *Trichoderma* en la prueba de cultivos difusibles frente a *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*.. 599

8. Cepas de *Trichoderma* ordenadas por prueba antagónica (Cultivos duales, compuestos volátiles, compuestos difusibles), en orden decreciente según su capacidad antagónica frente a *Pyrenophora. tritici-repentis* 633

8. Cepas de *Trichoderma* ordenadas por prueba antagónica (Cultivos duales, compuestos volátiles, compuestos difusibles), en orden decreciente según su capacidad antagónica frente a *Bipolaris sorokiniana* 6364

Figura No.

1. Relación del área de siembra cultivos de invierno-cultivos de verano.....5

2. Evolución del área de cultivos de invierno y praderas asociadas, en los años seleccionados (como % del área de invierno)..…..6

3. Evolución del área destinada a trigo y soja.…..7

4. Evolución del área sembrada de los cultivos de secano.…..8

5. Participación relativa de los fungicidas en el total de agroquímicos importados...…..9

6. Inhibición del crecimiento de *Pyrenophora tritici repentis* frente a las distintas cepas de *Trichoderma* en cultivos duales de patógeno-antagonista promedio de 5 repeticiones, expresado en relación al crecimiento del patógeno en medio de cultivo sin el antagonista, y medido a los 10 días de crecimiento. 40

7. Inhibición del crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* frente a las distintas cepas de *Trichoderma* en cultivos duales de patógeno-antagonista promedio de 5 repeticiones, expresado en relación al crecimiento del patógeno en medio de cultivo sin el antagonista, a los 10 días de crecimiento.....41

8. Crecimiento de la cepa de *Pyrenophora tritici-repentis* en enfrentada con las cepas 403 y 546 de *Trichoderma* en prueba de cultivos duales a los 3, 5 y 15 días de crecimiento.…..43

9.Crecimiento de la cepa de *Pyrenophora tritici-repentis* en presencia de las cepas S77 y R122 de *Trichoderma* en prueba de cultivos duales a los 3, 5 y 15 días de crecimiento.…..43

10. Crecimiento de la cepa de *Bipolaris sorokiniana* en presencia de las cepas de *Trichoderma* R408 y S449 en prueba de cultivos duales a los 3, 5 y 15 días de crecimiento.…..44

11. Crecimiento de la cepa de *Bipolaris sorokiniana* en presencia de las cepas de *Trichoderma* R200 y S354 en prueba de cultivos duales a los 3, 5 y 15 días de crecimiento.….. 44

12.Relación existente entre el % de inhibición de *Bipolaris sorokiniana* y el % de inhibición *Pyrenophora tritici repentis* de las cepas de *Trichoderma* en la prueba de cultivos duales, evaluado a los 10 días post-inoculación 49

13. Interacción entre *Bipolaris sorokiniana* y distintas cepas del antagonista *Trichoderma* en cultivos duales observados en microscopio óptico.. 50

14. Efecto de las distintas cepas de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento de *Pyrenophora tritici-repentis* en la prueba de cultivos volátiles.. 51

15. Efecto de las distintas cepas de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* en la prueba de compuestos volátiles. 52

16. Relación existente entre el % de inhibición de *Bipolaris sorokiniana* y el % inhibición de *Pyrenophora tritici repentis* causado por distintas cepas de Trichoderma en prueba de cultivos volátiles.. 53

17. Relación existente entre la inhibición del crecimiento causada por distintas cepas de *Trichoderma* en las pruebas de Cultivos Duales y Volátiles para *Bipolaris sorokiniana*. 54

18. Relación existente entre la inhibición del crecimiento causada por distintas cepas de *Trichoderma* en las pruebas de Cultivos Duales y Volátiles para *Pyrenophora tritici repentis*. 55

19. Capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Pyrenophora tritici repentis* mediante la formación de compuestos solubles.. 57

20. Capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris sorokiniana* mediante la formación de compuestos solubles.. 57
57

21. Relación entre el % de inhibición del crecimiento de *Pyrenophora tritici repentis* y de *Bipolaris sorokiniana* como causa de la exposición de ambos patógenos a compuestos solubles producidos por distintas cepas de *Trichoderma*. 60

22. Colonias de *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici- repentis* (creciendo en prueba de cultivos difusibles a los 7 días post-inoculación..... 61

1. INTRODUCCIÓN

El sector agrícola en el Uruguay sufrió una gran expansión durante la década del 2000, principalmente basada en el aumento del precio internacional de los granos, la incorporación de nuevas tecnologías como la siembra directa y los cultivos transgénicos. Estos cambios resultaron en aumento de relevancia de los cultivos de verano, disminución de las pasturas en la rotación, y la expansión de la agricultura hacia zonas tradicionalmente no agrícolas.

La siembra directa y la tendencia creciente al monocultivo, han llevado al incremento de la incidencia de enfermedades en los cultivos de invierno (trigo y cebada), con un sustancial incremento del uso de fungicidas con el objetivo de disminuir la interferencia de las enfermedades sobre la producción. Este aumento en el uso de fungicidas resulta en un aumento directo de los costos de producción, riesgo de generación de patógenos resistentes o insensibles a los fungicidas, y riesgo de residuos de agroquímicos en los alimentos producidos.

Esto lleva a la búsqueda de prácticas sostenibles utilizando tecnologías alternativas que sean menos nocivas para el ambiente, menos dependientes de los agroquímicos y menos perjudiciales para los recursos hídricos y edáficos. Estas nuevas tecnologías deben permitir obtener resultados que permitan reducir el uso de agroquímicos, y que sean de fácil implementación en cultivos extensivos, además de no aumentar significativamente los costos.

Es aquí donde surge la implementación del control biológico como práctica alternativa y/o complementaria al uso de agroquímicos para el control fitosanitario. El uso de microorganismos antagonistas tiene cada vez más importancia ya que su aplicación no genera desequilibrios biológicos, regulando las poblaciones de fitopatógenos, conduciendo a la disminución del uso de agroquímicos. En la actualidad se conocen más de 1500 especies de microorganismo que pueden ser utilizados como controladores biológicos, entre los que se encuentran hongos, bacterias y virus.

Entre las alternativas disponibles para la protección fitosanitaria de cultivos extensivos se encuentran los hongos del género *Trichoderma* como uno de los más importantes y más utilizados como agente de control biológico, por sus diversos mecanismos de acción y por actuar sobre un amplio espectro de hongos fitopatógenos.

El presente estudio buscó estimar el potencial antagónico de distintas cepas de *Trichoderma* spp. colectadas desde rastrojo y suelo de distintas rotaciones agrícolas.

1.1 OBJETIVO GENERAL

-Caracterizar la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* frente a *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar si existen diferencias entre especies de *Trichoderma* en la capacidad antagónica frente a *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*.

-Determinar si existen diferencias intra-especie respecto a la capacidad antagónica frente a *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DE LA AGRICULTURA EN EL URUGUAY

2.1.1 Caracterización de los sistemas agrícolas

El proceso de expansión agrícola que se ha dado en Uruguay, está basado principalmente en la inclusión del cultivo de la soja, la aparición de nuevas empresas con lógicas de producción diferentes al productor tradicional y la inclusión de innovaciones tecnológicas tales como la siembra directa y los cultivos transgénicos (Arbeletche y Gutiérrez, 2010b).

Las transformaciones ocurridas en los últimos años en los sistemas de producción, han inducido cambios en la dinámica de las poblaciones de patógenos y sus problemáticas asociadas. La adopción de la siembra directa, la creciente intensificación en la agricultura, el empleo de cultivos transgénicos, la menor diversificación en la secuencias de los cultivos, el paso de una agricultura basada en cultivos de invierno a una basada en cultivos de verano, el incremento en el área de algunos cultivos fundamentalmente soja, el incremento en el uso de agroquímicos, junto con la escasa diversidad de los cultivares sembrados, son todos factores que resultan en un aumento del riesgo de ocurrencia de epidemias. Esta situación ha ocasionado una mayor ocurrencia de problemas sanitarios como mancha parda, roya de la hoja y fusariosis de la espiga en el cultivo (Altieri y Nicholls 2000, Arbeletche et al. 2010a, Pereyra y Díaz 2011).

La permanencia del rastrojo en superficie es clave para que el sistema sea realmente sustentable. Disminuye la erosión por un menor escurrimiento superficial del agua al reducir el impacto de las gotas de lluvia sobre el suelo debido a la cubierta vegetal, atenuando la rotura de agregados y la formación de costra superficial (FAO, 2000), a su vez aumenta la conservación del agua en el perfil por una disminución de la evaporación (Martino, 1999).

Si bien grandes volúmenes de rastrojo son beneficiosos para la conservación del suelo pueden significar problemas, ya que alojan una gran

variedad de microorganismos patógenos, siendo sustrato para éstos (Martino, 1999). Patógenos dependientes del rastrojo (necro-hemiobiotróficos) como los causales de manchas foliares y fusariosis de la espiga se ven favorecidos por la presencia de rastrojo infectado en la superficie del suelo, producto de la siembra directa y las rotaciones cortas con alta frecuencia de trigo (Pereyra y Germán, 2012).

Como consecuencia de los altos precios de los granos, en especial la soja, la variedad de cultivos utilizados en la rotación disminuyó, derivando en modificaciones biológicas en el ambiente, como ser la pérdida de biodiversidad al simplificar el agroecosistema al cultivar un número determinado de especies, y la generación de resistencia en organismos patógenos, dependiente de la actividad del hombre junto con el un uso creciente de agroquímicos (Altieri y Nicholls 2000, Stewart et al. 2004).

Los cultivos de verano dejan de tener un rol secundario en la siembra de cultivos de secano. El crecimiento de la soja de forma ininterrumpida cambió la relación de superficie sembrada entre los cultivos de invierno y de verano. De esta forma se produce un proceso de “veranización de la agricultura” ya que el 70% del área corresponde a los cultivos de verano que dejan de jugar un papel secundario dentro del área de siembra de secano, para pasar a ser el componente principal. Este proceso se vio conjuntamente acompañado por una “intensificación” en el uso de la tierra, realizándose un doble cultivo invierno/verano (Arbeletche et al., 2010a). El área de doble cultivo pasó de ocupar un 5% del área agrícola, a ocupar actualmente más del 50% del área, predominando la rotación trigo-soja (MGAP.DIEA, 2012). Esta intensificación agrícola resulta en una tendencia hacia la siembra de más de un cultivo por año (Figura No. 1). Hasta el año 2003 existe una predominancia de los cultivos de invierno sobre los de verano, en ese momento esta situación se revierte por la influencia de la expansión sojera (Saavedra, 2011).

En los últimos 8 años, la superficie agrícola en Uruguay se ha multiplicado por 5 alcanzando nuevas zonas. A pesar de la aparición de nuevas regiones agrícolas como Tacuarembó, Melo, Durazno y Rocha, el 70% de la superficie sembrada sigue ubicándose en el litoral oeste del país. Esto es producto de la expansión hacia suelos con menor aptitud dentro de cada predio, y una intensificación en el uso de los suelos de mejor aptitud agrícola. La superficie agrícola se ubicó en torno a 1:000.000 ha con una intensidad de 1,6

cultivos por año (Ernst y Siri, 2011). Al desparecer los problemas de erosión y degradación de los suelos por el laboreo, la inclusión de pasturas en la rotación no sería una necesidad tan marcada como en sistemas convencionales (Martino, 1999). Esto llevó a que la proporción de trigo sembrado con praderas se redujo linealmente en los últimos años, lo que implica que el sistema pasó de agrícola-ganadero a agrícola (Ernst y Siri 2011).

El cultivo de soja explica la expansión del área agrícola. En el invierno 2009, casi la mitad del área fue sembrada con cultivos de invierno (trigo o cebada), mientras que el resto permaneció en barbecho. Casi la totalidad del área de cultivos de invierno fue sembrada con soja de segunda (doble cultivo anual). En el siguiente verano casi la totalidad del área se encontraba sembrada con cultivos de verano. Se discontinuó el sistema agrícola-ganadero tradicional, evidenciado por la evolución del % del área que está sembrado con praderas consociadas (Figura No. 2). La mayoría del trigo se siembra sobre rastrojo de soja, pero una proporción del mismo se siembra sobre trigo del año anterior (secuencia trigo/soja de segunda/trigo) (Figura No.1, Ernst y Siri, 2011).

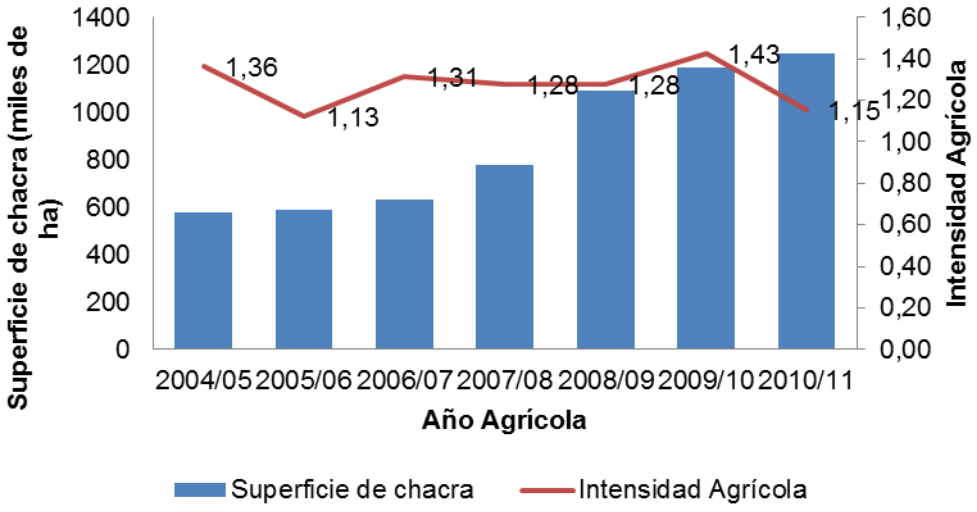

Figura No. 1. Relación del área de siembra cultivos de invierno-cultivos de verano (Fuente: elaborado en base a datos de MGAP. DIEA, 2012).

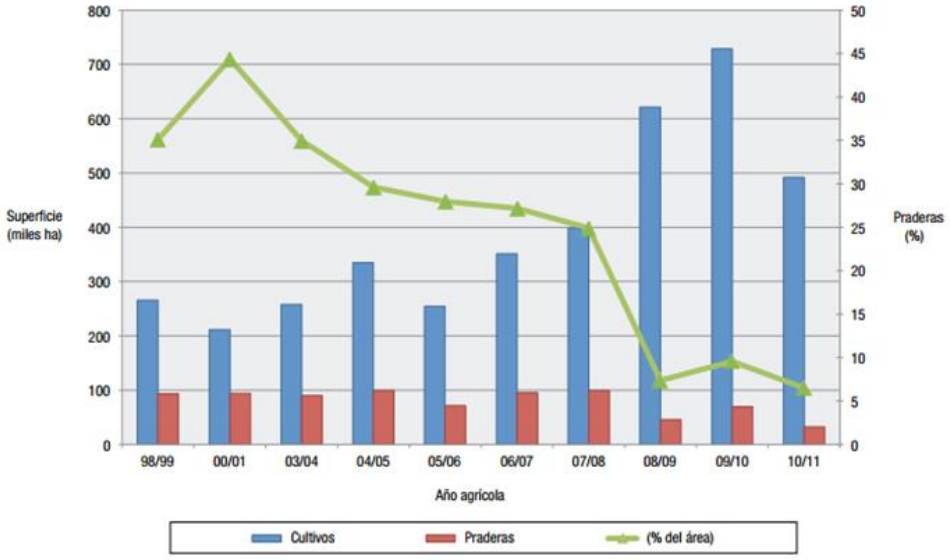

Figura No. 2. Evolución del área de cultivos de invierno y praderas asociadas, en los años seleccionados (como % del área de invierno). (Fuente: MGAP.DIEA, 2012).

En las últimas décadas, los cultivos de oleaginosos experimentaron un comportamiento dinámico, creciendo el doble de rápido que la agricultura mundial. La historia de estos mercados gira en torno al potencial de expansión de estos cultivos en América del Sur y la creciente demanda de China y otros países en desarrollo (Uruguay XXI, 2013). La expansión del cultivo de soja se da a comienzos del siglo XXI, y su crecimiento se mantiene a un ritmo sostenido. Pasó de ocupar una superficie de 12 mil hectáreas en la zafra 2000/2001, a ocupar 1050 mil hectáreas en la zafra 2012/2013. Esto convierte a la soja en el principal cultivo agrícola del país, cubriendo más del 80% del área de cultivo de verano. Luego de la cosecha el 55% del área de soja fue destinada a trigo, el 36% quedó como barbecho de invierno que luego volverían a ser sembradas en su mayoría con soja, y un 9% se destinó a rotación con forrajeras u otros usos (MGAP.DIEA, 2013. Figura No. 3).

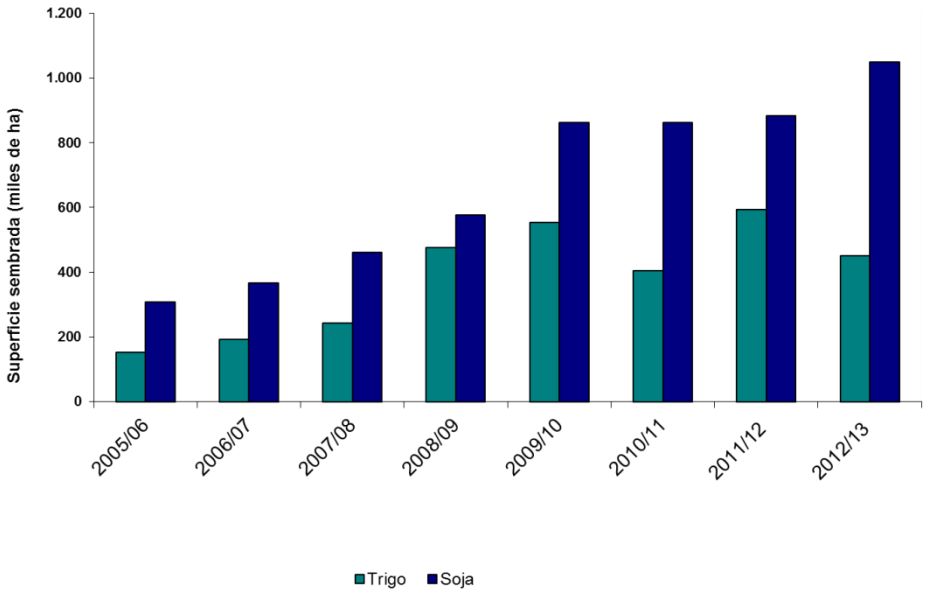

Figura No. 3. Evolución del área destinada a trigo y soja (Fuente: elaborado en base a datos de MGAP. DIEA, 2013).

A comienzo de siglo, el trigo fue sembrado alcanzando un área cercana a 300 mil hectáreas (ha) por año, superando las 500 mil ha por año hacia fines de los 40. Más tarde, entre los años 60 y 80 la tendencia fue decreciente, llegando a estabilizarse entre las 150 y 300 mil ha/año. En 1999 se registró una nueva reducción del área, del que no se recuperó hasta el 2008, a partir de ese momento se mantuvo hasta el presente. Debe señalarse que, a pesar de los altibajos, el área de trigo siempre fue superior a 115 mil ha (Saavedra, 2011).

Las características agroecológicas de producción de trigo en Uruguay determinan que las enfermedades sean uno de los factores limitantes más importantes para el logro de rendimientos y calidad adecuados, estables a través de los años, así como una de las causas de retiro de cultivares de producción.

De acuerdo al área agrícola del país y a la superficie sembrada con trigo y soja, resulta evidente que gran parte del área de dichos cultivos se está realizando sobre rastrojo del mismo cultivo, con las implicancias sanitarias que ello tiene (Figura No. 4). Como resultado de esto, las enfermedades (principalmente aquellas causadas por patógenos que sobreviven en el rastrojo) han pasado a tener una mayor importancia relativa como factor limitante de la producción de los distintos cultivos. La mayor interferencia de estos patógenos sobre el rendimiento y la calidad de la producción se ve reflejada en el uso más intensivo de fungicidas que se ha observado en los últimos años, no solo en cultivos de invierno, sino también en cultivos de verano (Pérez y Villar, 2011).

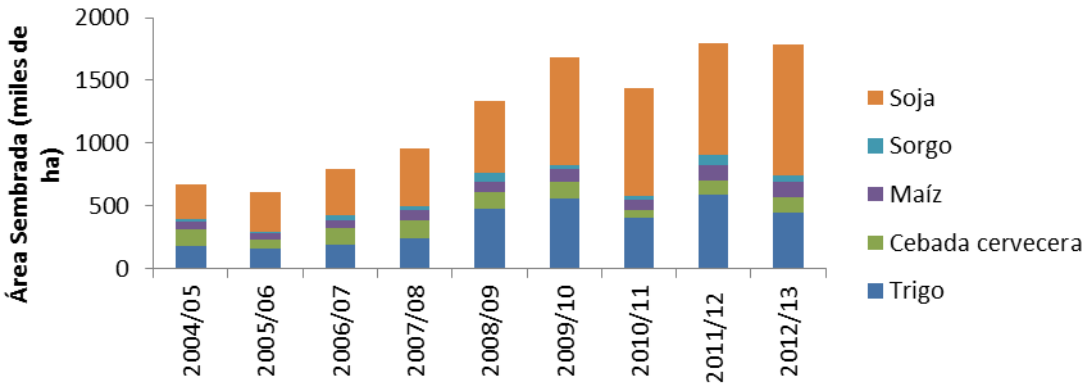

Figura No. 4. Evolución del área sembrada de los cultivos de secano (Fuente: elaborado en base a datos de MGAP. DIEA, 2013).

A partir del año 2001, junto al incremento en el área sembrada y el mayor consumo de los principales principios activos (Epoxiconazole+Carbendazim, Tebuconazole, Azoxistrobina y Propiconazole), los fungicidas se consolidan como el producto de mayor importancia para el cultivo de trigo, representando entre el 45% y el 50% del mercado (Figura No. 5, Pérez y Anastasio, 2007).

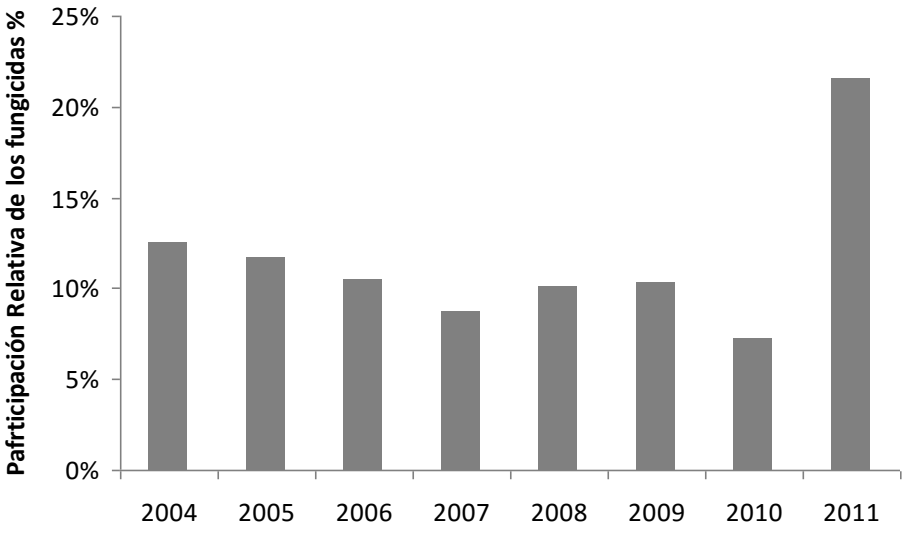

Figura No. 5. Participación relativa de los fungicidas en el total de agroquímicos importados (Fuente: elaborado en base a datos de MGAP. DGSSA, 2012).

2.1.2 Efecto de la intensificación agrícola sobre los patógenos

Son bien conocidos los beneficios que otorga la presencia del rastrojo en la superficie del suelo, como lo es la disminución de la erosión por un menor escurrimiento superficial de agua, y por una disminución en la energía cinética de la gota de lluvia. A su vez, éste aumenta la conservación del agua en el perfil por una disminución de la evaporación, aumentando la posibilidad de siembra. Pero para el caso de las enfermedades, la permanencia del rastrojo del cultivo anterior puede condicionar la sanidad del cultivo a implantar, debido a la capacidad que presentan algunos patógenos de sobrevivir en el mismo (Pérez, 2004.). La expansión del área del cultivo no solo implica una mayor cantidad de sustrato disponible para el hongo, sino que las mayores tasas de multiplicación del mismo aumentan las probabilidades de mutación y surgimiento de nuevas razas (Stewart et al., 2004).

Stewart et al. (2001), plantean que el rastrojo que se encuentra en la superficie del suelo en sistemas de siembra directa genera importantes transformaciones en el sistema, como ser modificaciones en la dinámica del agua y nutrientes, actúa como aislante térmico, atenúa la velocidad del viento, y provoca efectos directos e indirectos en el desarrollo de enfermedades. Estos efectos, están relacionados con: 1) modificaciones en el microclima o ambiente físico en el cual se desarrolla la enfermedad y 2) requerimientos nutricionales del microorganismo.

Modificaciones en el microclima o ambiente físico en el cual se desarrolla la enfermedad**:** la siembra directa modifica las condiciones del ambiente físico donde se encuentran el patógeno y el huésped, como temperatura y humedad del suelo, interacciones complejas entre patógenos y otros microorganismos o sustancias tóxicas liberadas por los rastrojos en descomposición, inciden en el desarrollo de la enfermedad (Stewart et al., 2001). Un ejemplo son las enfermedades de raíz causadas por *Pythium*, cuyo desarrollo se ve favorecido por suelo húmedo y temperaturas bajas, condiciones asociadas a la siembra directa, ya que la cubierta de rastrojo actúa como aislante térmico y reduce la tasa de evaporación (Martino, citado por Stewart et al., 2001). Esto a su vez, determina que la velocidad de implantación del cultivo sea más lenta favoreciendo el contacto de la planta con el patógeno por más tiempo, además de que al no remover el suelo, se concentra la población de *Pythium* en los primeros 10 cm, si se la contrasta con la población del hongo luego de un laboreo (Summer et al., citados por Stewart et al., 2001).

Requerimientos nutricionales del microorganismo: Los parásitos denominados biótrofos, presentan solo una fase parasítica, y solo pueden crecer y reproducirse sobre organismos vivos, denominándose parásitos obligados. Por otro lado, otros parásitos como la mayoría de los hongos y bacterias, pueden desarrollarse tanto en un hospedante vivo como muerto, a éstos se les denomina parásitos no obligados. Algunos de éstos viven la mayor parte o casi todo el ciclo de su vida como parásitos, pero bajo determinadas condiciones pueden desarrollarse de manera saprófita sobre tejido vegetal muerto, aquí se les llama saprófitos facultativos. Por otra parte, hay otros que pasan la mayor parte del ciclo de su vida alimentándose de material vegetal muerto, pero bajo determinadas condiciones atacan plantas vivas, denominándose parásitos facultativos (Agrios, 2006).

Patógenos de trigo tales como *Drechslera tritici-repentis* (teleomorfo *Pyrenophora tritici-repentis*) agente causal de la mancha parda o amarilla, *Septoria tritici* agente causal de la septoriosis o mancha de la hoja, y de cebada como *Drechslera teres* (teleomorfo *Pyrenophora teres*) agente causal de la mancha en red, *Bipolaris sorokiniana* agente causal de la mancha borrosa, *Rhynchosporium secalis* agente causal de la escaldadura, están incluidos dentro de los ”dependientes” del rastrojo y por lo tanto son afectados directamente por el rastrojo en superficie (Stewart et al., 2001).

La severidad de la enfermedad en un cultivo está determinada por la fuente de inóculo, la tasa de descomposición del rastrojo, la intensidad de la enfermedad en el cultivo anterior, el barbecho químico y el microclima (Stewart et al., 2001). Los cultivos de invierno se siembran generalmente bajo condiciones de alta presión de inóculo, por lo que, si se dan las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del hongo, es altamente probable que ocurra la enfermedad (Pérez, 2004).

El rastrojo en superficie no sólo funciona como reservorio de esporas, sino que además induce a ciertos hongos a reproducirse sexualmente, lo que genera una nueva fuente de inóculo primario en sistemas de siembra directa, pudiendo además crear nuevas recombinaciones genéticas del patógeno, generando nuevos biotipos (Stewart et al., 2001).

Por lo tanto, la presión de inóculo está dada por la cantidad de rastrojo presente en la superficie del suelo, y por el grado de infestación del mismo. Esto podría implicar que partiendo de concentraciones similares de esporas por gramo de rastrojo, es posible llegar a grados de infección distintos por unidad se superficie (Cuadro No.1).

Cuadro No. 1. Relación entre la cantidad de esporas de *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis* por gramo de rastrojo y unidad de superficie

Patógeno	**No. esporas/g rastrojo**	**gr rastrojo/m^2**	**No. esporas/m^2**
Bipolaris sorokiniana	16137 16125	74 208	1207458 3354000
Pyrenophora tritici-repentis	4995 4298	74 208	369630 893984

Fuente: adaptado de Stewart et al. (2001)

A su vez la cantidad de rastrojo también determina la severidad y el desarrollo inicial de la enfermedad. Partiendo de grandes cantidades de rastrojo infectado, es posible alcanzar valores altos de severidad en etapas tempranas del cultivo, bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Pérez 1988, Stewart et al. 2001). El tipo de laboreo permite manejar la cantidad de rastrojo que permanece en superficie y por consiguiente la densidad de inóculo a la que estará sometido el cultivo a sembrar; esto se ve reflejado en la severidad de la enfermedad alcanzada cuando se dan las condiciones correspondientes (Pérez, 2004.).

La velocidad de descomposición del rastrojo determinara la supervivencia del patógeno en el suelo. Bajo siembra directa la descomposición del rastrojo se ve enlentecida ya que al encontrarse sobre la superficie del suelo se encuentra menos accesible a los microorganismo degradadores; mientras que en sistemas bajo laboreo convencional, los rastrojos son incorporados al suelo y entran en contacto con los microorganismos, acelerando su descomposición (Stewart et al., 2001).

La rotación de cultivos para el control de enfermedades tiene como objetivo la supresión del sustrato nutricional de los microorganismos, siendo efectiva únicamente para los patógenos necrotróficos. Esta medida de manejo se ha visto limitada debido a la predominancia de la rotación trigo-soja como se expuso líneas arriba, resultando en un importante porcentaje del área sembrada

en presencia de rastrojo de la misma especie vegetal, con el riesgo que ello implica.

La utilización extensiva de compuestos químicos para el control de enfermedades y la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas, hacen que surja la necesidad de implementar alternativas para la protección de los cultivos que tengan en cuenta la conservación del ambiente (Mondino y Vero 2006, Tovar 2008). Es aquí que aparece la utilización de microorganismos, como bacterias, hongos y virus, que presentan capacidad antagónica sobre fitopatógenos. Se conocen actualmente más de 1500 especies de microorganismos con estas características (Elósegui, 2006).

El uso de microorganismos antagonistas de fitopatógenos habitantes del suelo, cobra cada vez más importancia ya que su aplicación no genera desequilibrios biológicos, sino que regula o minimiza las poblaciones de fitopatógenos. Esta acción de los antagonistas, indudablemente, conduce a la disminución o eliminación del uso de productos químicos que son nocivos para el entorno. Dentro del grupo de hongos se destaca el género *Trichoderma*, un eficiente controlador biológico que es ampliamente usado en agricultura debido a su habilidad para colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos patógenos. El efecto inhibitorio de sus antibióticos y la degradación de componentes de la pared celular de patógenos de plantas, es citado como aspecto importante de su actividad antagonista (Tovar, 2008).

2.1.3 Importancia de *Bipolaris sorkiniana y Pyrenophora tritici-repentis* en los sistemas agrícolas de Uruguay

Las manchas foliares causadas por hongos son una de las principales limitantes para lograr rendimientos altos y estables a través de los años (Van den Berg, Mathre, citados por Gamba, 2011). En Uruguay, en un análisis de regresión de 19 años (1976 a 1994), en 7 años se han observado promedios de rendimiento nacionales por debajo de los esperados. Estas fluctuaciones de rendimiento fueron atribuidas a las enfermedades, dentro de las cuales se destacan las royas y las manchas foliares (Díaz de Ackermann, citado por Díaz de Ackermann, 1996). Las mermas de rendimiento nacionales oscilaron entre 4

y 44%. Las condiciones climáticas, directamente o a través de su efecto sobre el desarrollo de las enfermedades, han sido sin duda las responsables de esos bajos promedios nacionales (Díaz de Ackermann, citado por Díaz de Ackermann, 1996).

Los hongos necrotróficos son los que se encuentran en los sistemas de siembra directa y tienen mayores condiciones para reproducirse y alcanzar los tejidos más susceptibles de manera eficiente. Esta es una de las principales razones por las cuales las enfermedades del trigo causadas por éstos parásitos ocurren en forma más temprana e intensa en el escenario productivo de siembra directa (Díaz de Ackermann, 2011), sumado a la falta de cultivares con niveles aceptables de resistencia genética (Gamba, 2011). La problemática sanitaria de la cebada se hace aún más importante por su incidencia en la calidad maltera (Arias, citado por Gamba, 2011).

La mancha borrosa junto con la mancha en red y la fusariosis de la espiga representan las limitantes principales para obtener rendimientos y calidad de granos adecuados en los cultivos de cebada en Uruguay. La magnitud de las pérdidas es función de la enfermedad presente, del momento del ciclo del cultivo en que la misma se establece, de la susceptibilidad del cultivas, y de las condiciones ambientales imperantes (Gamba y Estramil, Pereyra et al., citados por Silva, 2011).

Díaz de Ackermann y Kohli (1998), reportaron la ocurrencia de mancha amarilla en el norte de Uruguay a principios de los años 90, desde ese entonces es la mancha más predominantes en el norte del país y en los sistemas de siembra directa con rotaciones que incluyan trigo-trigo en su secuencia, pudiendo generar pérdidas de entre un 3% y 84% (Díaz de Ackermann, 2011).

La incidencia y severidad de la mancha amarilla en trigo ha aumentado principalmente por las prácticas culturales, como la conservación de suelos con rastrojos en superficie rastrojos, mínimo y cero laboreo; los cultivares y aumento en el reconocimiento del hongo y de la enfermedad (Díaz de Ackermann, 2011).

Por su parte, la mancha borrosa puede aparecer en una amplia gama de especies vegetales, siendo económicamente más importante en trigo y cebada. Existe una gran variabilidad genética del patógeno con distintos grados de virulencia, lo que determina distintos niveles de enfermedad en los cultivos (Gamba, 2011).

2.2 CONTROL BIOLÓGICO

El conocimiento referente al comportamiento de algunos hongos como antagonistas es esencial para su efectivo uso, debido a que pueden actuar contra organismos blanco de varias formas constituyéndose en una alternativa biológica al empleo de compuestos químicos convencionales, considerados nocivos para el medio ambiente (Jeffries y Young, citados por Tovar, 2008).

Mediante el uso de hongos y bacterias antagonistas se han podido conocer estrategias con mayor potencial para el control de enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo (Cook y Baker, 1983). El éxito de las cepas de *Trichoderma* spp. como agentes de control biológico es debido a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción de crecimiento en plantas e inducción de mecanismos de defensa (Benítez et al., 2004). Estas propiedades han hecho que *Trichoderma* se presente en cualquier hábitat en una alta proporción.

Según Baker y Cook (1974), se define al control biológico como la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad patogénica de un patógeno, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o del antagonista. Esta es una definición muy amplia que Mondino y Vero (2006) sintetizan en la introducción artificial de organismos antagonistas (agentes de control biológico) en el patosistema, para controlar el patógeno y favorecer a la planta, reduciendo el inóculo del patógeno y/o la intensidad de los síntomas posteriores a la infección.

En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos; es decir, que el control biológico funciona naturalmente (Cook y Baker, 1983). Los microorganismos benéficos se encuentran naturalmente en el ambiente, manteniendo un equilibrio dinámico con el resto de los microorganismos (Fajardo y Guzmán, 2012).

En algunos casos el control biológico ocurre naturalmente, sin la intervención humana. En otros, el hombre debe influir en mayor o menor grado,

introduciendo cambios en el patosistema, de forma de poder favorecer la ocurrencia del mismo (Mondino y Vero, 2006). Esta intervención puede consistir en selección y aumento de las poblaciones de microorganismos benéficos y su posterior aplicación masiva al cultivo (aumentativo), así como prácticas culturales como ser la rotación de cultivos (conservativo) que favorezca el ambiente para el desarrollo de los agentes de control biológico natural y sus efectos (Andrade, 2012).

2.2.1 Agentes de control biológico

Como agentes antagonistas han sido utilizados varios tipos de microorganismos, entre ellos se encuentran bacterias, hongos filamentosos, levaduras y virus, además de compuestos derivados de plantas y animales.

Para que un antagonista sea considerado como tal, debe ser capaz de impedir que un patógeno pueda colonizar un determinado ambiente, impidiendo así también, el inicio de la infección o la ocurrencia de niveles epifíticos de la enfermedad (Martín, 2001).

Según Vero (2006), los microorganismos utilizados como agentes de control biológico deben cumplir con una serie de requisitos, entre los cuales se destacan:

- Deben ser genéticamente estables
- Efectivos a bajas concentraciones
- Fáciles de cultivar en medios sencillos y económicos
- Efectivos frente a un amplio rango de patógenos, pero sin provocar efectos adversos en flora benéfica
- Compatibles con otros métodos de control
- No deben ser tóxicos para humanos ni animales
- No deben producir metabolitos tóxicos en el sitio de acción
- No deben ser fitotóxicos.

2.2.1.1 Potencial de uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol

Se conocen las capacidades de biocontrol de numerosos microorganismos y sus metabolitos como *Trichoderma* spp.*, Bacillus* spp*, Streptomyces* spp*, Pseudomonas* spp, y sus mecanismos de acción como mico parasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes, resistencia inducida y/o inactivación de enzimas de patógenos (González, 2001).

Trichoderma posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora, Rhizoctonia, Sclerotium, Pythium* y *Fusarium* entre otros (Ezziyani et al., 2004). Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su difusión, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al., citados por Ezziyani et al., 2004). *Trichoderma* es el género de hongos más estudiado como agente de control biológico de hongos fitopatógenos, además de presentar capacidad como promotor de crecimiento vegetal (Cubillos et al., Andrade, Arias, citados por Cevallos y Vivas, 2010).

2.2.2 *Trichoderma* spp.

2.2.2.1 Biología y clasificación

Clasificación taxonómica:

Reino	MYCETAE
División	EUMYCOTA
Subdivisión	DEUTEROMYCOTINA
Clase	HIPHOMYCETALES
Orden	HIPHALES
Género	*Trichoderma*

Trichoderma es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo (Michel et al*.,* 2001). El mismo coloniza una amplia gama de nichos de suelo en lugar fresco y templado a los climas tropicales. Estos incluyen suelos agrícolas, forestales, pasturas y desierto. La naturaleza saprofitas de *Trichoderma* hace que se sitúen en los horizontes superiores del suelo (Domsch et al., Hagn et al., Roiger et al., citados por Bora, 2013). Es considerado un colonizador secundario dado su frecuente aislamiento a partir de la superficie de raíces de varias plantas y parasitando estructuras de diferentes hongos patógenos, debido a la competencia por nutrientes y microparasitismo (Camargo et al., citados por Tovar, 2008).

La alta versatilidad de este género hace que algunas especies de *Trichoderma* hayan sido encontradas en ambientes extremos, donde las condiciones adversas de potencial osmótico alto representan un verdadero desafío para la supervivencia de estos hongos, tal es el caso de la especie *Trichoderma viride* (Moratto et al*.* 2005, Tovar 2008, Infante et al. 2009, Cano 2011). Por su parte, *Trichoderma harzianum*, se encuentra ampliamente distribuido en la rizósfera de cultivos como el trigo, la papa y el tabaco, y también puede ser aislado de las raíces de las plantas perennes. Por lo tanto, es posible decir que el género *Trichoderma* puede desarrollarse en un amplio rango de hábitats (Bora, 2013).

Las limitantes más importantes que presenta el género *Trichoderma* para el desarrollo de poblaciones para biocontrol son las referidas a las condiciones ambientales necesarias para la proliferación y dispersión de determinadas especies. La composición, actividad, biomasa y biología de las comunidades microbianas en el suelo depende de importantes factores físicos y químicos (Bourguignon, 2008).

Los parámetros ambientales tales como temperatura, humedad, atmósfera, pH, materia orgánica, contenido de nutrientes y tipos de plantas son los factores claves que influyen en la colonización del suelo por las especies de *Trichoderma* (Carreiro y Koske, Danielson y Davey, Domsch et al., Eastburn y Butler, Klein y Eveleigh, Widden y Abitbol, citados por Bourguignon, 2008).

La gama de temperaturas a las que pueden crecer especies de *Trichoderma* es bastante amplia, pudiendo ser tan baja como 0 °C para *T. polysporum* y tan altas como 40 °C para *T. koningii* (Tronsmo y Dennis, Domsch et al., citados por Bora, 2013). La temperatura no sólo afecta al crecimiento de

especies de *Trichoderma*, también afecta a su actividad metabólica, especialmente la producción de antibióticos volátiles (Tronsmo y Dennis, citados por Bora, 2013) y enzimas (Bourguignon, 2008).

La humedad y el agua del suelo son también factores importantes que influyen en el establecimiento de las poblaciones de *Trichoderma* (Lavelle y España, citados por Bora, 2013). El potencial hídrico depende estrechamente de la temperatura del suelo y se hace más negativo a medida que aumenta la temperatura (Dix y Webster, citados por Bora, 2013). El crecimiento de las hifas, la producción de esporas, su germinación, y por consiguiente la actividad de control biológico de especies de *Trichoderma* son generalmente afectados por altos valores negativos de potencial hídrico del suelo (Clarkson et al., Eastburn y Butler, citados por Bora, 2013).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* requieren un bajo potencial hídrico en el suelo para lograr un óptimo crecimiento y las poblaciones son generalmente más abundantes en el suelo húmedo, especialmente en la hojarasca húmeda (Danielson y Davey, citados por Kubicek et al., 2008). A pesar de ello, algunas especies como *T. viride* han sido capaces de lograr crecimiento en los potenciales de agua en el suelo de -240 MPa (Domsch et al., citados por Bourguignon, 2008).

Trichoderma spp. presenta capacidad para tolerar condiciones extremas de pH y salinidad (Widden y Scattolin, Jackson et al., citados por Argumedo et al., 2009). El rango de pH para el desarrollo de *Trichoderma* spp. es amplio, ubicándose entre 2.0 y 9.0 (Domsch et al., citados por Cruz, 2007), siendo el óptimo entre 4.5 y 6.0 (Agamez et al. 2009, Przybylowicz y Donoghue, citados por Romero et al. 2012).

Debido al crecimiento extremadamente rápido y la gran producción de esporas, *Trichoderma* logra rápidamente colonizar el sustrato del suelo (Cook y Baker, 1983).

El organismo crece y se ramifica mediante hifas fúngicas típicas de 5 a 10 micras de diámetro. En la esporulación asexual se producen conidios unicelulares, generalmente de color verde (entre 3 y 5 m de diámetro) que se liberan en grandes cantidades. De forma intercalada pueden formarse clamidosporas, también unicelulares, aunque dos o más pueden estar fusionados (Harrman et al., 2004).

La mayoría de especies de *Trichoderma* no poseen reproducción sexual y están adaptadas al ciclo de vida asexual (Chet, citado por Amboya, 2012); sin embargo, se conoce la etapa sexual de unas pocas especies pero no son las que se utilizan para control biológico (Martínez, 2009). En ausencia de la meiosis, la plasticidad cromosómica es normal, y las diferentes cepas tienen diferentes números y tamaños de cromosomas. La mayoría de las células tienen numerosos núcleos, con algunas células vegetativas que poseen más de 100. Varios factores asexuales genéticos, tales como recombinación parasexual, mutación y otros procesos contribuyen a la variación genética entre los núcleos en un solo organismo. Por lo tanto, estos microorganismos son muy adaptables y evolucionan rápidamente. Existe una gran diversidad en el genotipo y el fenotipo de las cepas silvestres (Harman et al., 2004a).

Trichoderma además de ser abundante en suelos presenta gran plasticidad ecológica y capacidad enzimática para degradar varios sustratos orgánicos, sumado a su versatilidad metabólica y su resistencia a inhibidores microbianos, hacen que el hongo posea la habilidad de sobrevivir en varios nichos ecológicos, dependiendo de las condiciones que prevalezcan y sobre las especies involucradas (Tovar 2008, Infante et al. 2009).

Se han caracterizado algunas especies del género *Trichoderma* como controlador biológico de patógenos de suelo tanto en asociación con la planta como a distancia por ser capaces de parasitar estructuras de resistencia y propagación de hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo. Las cepas de diferentes especies del género *Trichoderma* han demostrado habilidad para colonizar efectivamente la rizósfera, y en algunos casos llegar al interior de las raíces de plantas, logrando así un efectivo control de patógenos radiculares (Mondino y Vero, 2006).

Se han identificado más de 100 especies diferentes dentro del género *Trichoderma*, dentro de las cuales se ha destacado *Trichoderma harzianum* como microorganismo controlador de hongos patógenos, especie que ha mostrado ser competidor ventajoso en la colonización de sustratos y que además es resistente a algunos compuestos químicos de los pesticidas, siendo capaz de asimilar una variedad de materiales complejos, como el Arachlor, DDT, Aldrín, Dieldrín, Malation y Dalation (Harman y Kubicek, 1998).

*Trichoderma harzianum (*Rifai) utilizado como controlador biológico muestra una amplia gama de acción sobre hongos fitopatógenos de

importancia, como ser *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Fusarium roseum* Link, *Botrytis cinerea* Pers, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp*., Phytophthora* spp*., Alternaria* spp., entre otros (Infante et al., 2009).

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos produciendo metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, ocasionando los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa.

El género *Trichoderma* es el más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, esto se debe a su difusión, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su rápido crecimiento en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al., citados por Ezziyyani et al., 2004). Los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* actúa sobre los hongos fitopatógeno pueden ser de tres tipos: competición directa por el espacio o por los nutrientes (Elad y Baker, Elad y Chet, Chet e Ibar, Belanger et al., citados por Ezziyyani et al., 2004), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet et al., Sid Ahmed et al., Sid Ahmed et al., Infante et al., citados por Ezziyyani et al., 2004) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al., citados por Ezziyyani et al., citados por Ezziyyani et al., 2004).

Trichoderma spp. posee resistencia innata a fungicidas agrícolas, siendo la misma variable según cepa. Según Woo et al., citados por Rossi (2010), la presencia de un gran número de proteínas afectivas para el transporte ubicadas en la membrana celular es la razón principal que explica el alto nivel de resistencia innata de estos hongos a una gran variedad de productos químicos y toxinas naturales producidas por otros hongos.

2.2.2.2 Morfología y características culturales

Las colonias de *Trichoderma* se desarrollan muy rápido en PDA (Potato Dextrosa Agar), a una temperatura óptima de 25°C-30°C (Cruz 2007, Papavizas, Klein y Eveleigh, citados por Tijerino 2010, Vargas et al. 2012), formando colonias de 35-41µm durante las primeras 24 horas, después de las

96 horas de crecimiento coloniza toda la caja de Petri. Su crecimiento va formando una colonia delgada sobre la superficie del agar, debido a la conidiación que presenta a través de su desarrollo. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan micelio aéreo, blancos y algodonosos, conformando una red densa, responsable del pigmento característico (Barnett y Hunter, citados por Tovar, 2008).

Al microscopio, el micelio es ralo y fino. Los conidióforos son ramificados y se presentan como penachos compactados formando anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, citado por Infante et al., 2009). Además de los conidióforos, las esporas pueden producirse sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Rifai, citado por Baker y Cook, 1983). Este mecanismo de esporulación es lo que le permite al género colonizar rápidamente los sustratos orgánicos.

2.2.2.3 Mecanismos de antagonismo

Existen diferentes mecanismos de acción a través de los cuales las especies del género *Trichoderma* regulan el desarrollo y proliferación de hongos. Pueden dividirse en mecanismos de acción directa sobre el hongo fitopatógeno, dentro de los cuales se destacan la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo y la antibiosis; y mecanismos de acción indirecta, como lo son la inducción de resistencia, la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección. Los mecanismos de acción directa se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera de las plantas (Infante et al., 2009).

Competencia por nutrientes y espacio

En este caso, *Trichoderma* compite con el microorganismo, imponiéndose uno de ellos por ser capaz de procurarse de manera más rápida

y eficiente los nutrientes y/o el sitio necesario para desarrollarse (Mondino y Vero, 2006).

La competencia se define como la interacción de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (Ahmad et al., Hjeljord et al., citados por Infante et al., 2009).

Las especies de *Trichoderma* son consideradas competidores agresivos, debido a su capacidad de presentar rápido crecimiento y colonización del sustrato, plasticidad ecológica, y capacidad de sobrevivir en condiciones extremas de pH, temperatura y humedad. Se ha constatado que *Trichoderma* spp. presenta gran capacidad de establecimiento en la rizósfera, generando disminución del establecimiento de microorganismos patógenos debido a su alto potencial de utilización de los recursos (CO_2 y espacio) en esa zona.

Trichoderma compite fundamentalmente por carbono, nitrato y hierro (Sivan y Chet, citados por Martínez et al., 2013). La alta velocidad de crecimiento y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza son las principales cualidad que presenta *Trichoderma* como antagonista. Además presenta gran capacidad para obtener moléculas de ATP a partir de diferentes azúcares abundantes en la rizósfera, como celulosa, quitina y glucanos (Chet et al., Benítez et al., citados por Rossi, 2010), y gran eficacia en el transporte de glucosa frente a otros hongos (Delgado et al., Benítez et al., citados por Rossi, 2010).

Antibiosis

Se entiende por antibiosis a la inhibición o lisis del patógeno por productos metabólicos provenientes del antagonista, incluyendo agentes líticos, enzimas, toxinas, entre otros. Este tipo de interacción generalmente se define como el antagonismo indirecto, ya que no hay contacto hifal (Dix y Webster, citados por Infante, 2009). La producción de enzimas hidrolizadoras de compuestos de la pared celular de los hongos por parte de los agentes de biocontrol, es una de las estrategias para limitar el desarrollo de los patógenos (Rossi, 2010).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios con capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos sin la necesidad de establecer contacto físico entre con ellos, a estos se los denomina antibióticos (Dennis y Webster, Hjeljord et al., citados por Martínez, 2013). El modo de acción de estas sustancias es mediante la alteración de la membrana celular del patógeno, de modo de que se sucedan desequilibrios osmóticos internos, los cuales van a derivar en desórdenes intracelulares.

Trichoderma tiene la capacidad de secretar distintos compuestos antifúngicos simultáneamente, lo que disminuye el riesgo de aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos (Martínez et al., 2013). Sin embargo, algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico. En la práctica uno de los antecedentes ha sido el caso de la aparición de cepas de *Agrobacterium tumesfaciens* resistentes al Agrosin 84, un antibiótico producido por una cepa de *Agrobacterium radiobacter* (Infante et al., 2009).

Dennis y Webster, citados por Infante (2009), relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma* spp. con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como trichodermina y otros metabolitos peptídicos. Se ha detectado que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. producen sustancias antibióticas volátiles y no volátiles, dentro de los cuales se puede destacar gliotoxina, gliovirina, viridina, pironas, y antibióticos de naturaleza peptídica como alameticina y suzukamicina (Vey et al., citados por Vero, 2006); además puede secretar isocianatos, peptaiboles y tricholinas (Ozbay y Newman, 2004). Para algunos de estos antibióticos se ha demostrado actividad contra patógenos fúngicos y bacterianos, como es el caso de las tricokininas producidas por cepas de *Trichoderma koningii* (Xiao-Yan et al., citados por Vero, 2006), de las cuales se demostró presentan actividad in Vitro contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli, Botrytis cinerea y Rhizoctonia solani* (Vero, 2006).

Generalmente la antibiosis ocurre en sinergia con el micoparasitismo (Schirmbock et al., citados por Infante et al., 2009), donde las enzimas hidrolíticas permiten que el antibiótico penetre en las células del huésped. A su vez, los antibióticos pueden inhibir la síntesis de la pared celular y, por tanto, mejorar la acción de las enzimas hidrolíticas (Lorito et al., citados por Infante et

al., 2009). También pueden afectar el hongo objetivo a través de una serie de mecanismos tales como la inhibición del crecimiento, la producción de metabolitos primarios, la absorción de nutrientes y esporulación (Howell, Wilcox et al., citados por Infante et al., 2009). Los compuestos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitan al patógeno haciéndolo más sensible a los compuestos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático (Martínez et al., citados por Infante et al., 2009).

Al igual que micoparasitismo, la antibiosis es específica de cada especie de *Trichoderma*, y se obtienen diferentes resultados de control frente al mismo patógeno.

Microparasitismo

Se denomina microparasitismo a la capacidad de un organismo de degradar y asimilar hongos, y se puede definir generalmente como antagonismo directo. El organismo microparásito debe ser capaz de colonizar un hongo vivo, degradar sus paredes celulares, asimilar y nutrirse a partir del contenido celular del mismo.

El proceso de micoparasitismo presenta varias etapas (Chet et al. 1998, Harman 2006, Howell 2003, Harman 2006, Woo et al. 2006):

1. Crecimiento quimiotrófico: las especies de *Trichoderma* detectan a distancia al hospedante, haciendo que sus hifas crezcan quimiotrópicamente en dirección hacia éste.

2. Reconocimiento: las investigaciones realizadas sugieren que existe una alta especificidad entre las especies de *Trichoderma* y los hongos fitopatógenos, siendo la etapa fundamental para continuar con el proceso de antagonismo (Chet y Benhamou, citados por Infante et al., 2009). El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos, siendo que las primeras se encuentran involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Barondes, citado por Chet et al., 1998).

3. Adhesión y enrollamiento: si la respuesta al reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación

de estructuras similares a ganchos y apresorios, enrollándose alrededor de estas (Chet y Benhamou, citados por Infante et al., 2009). Según Chet y Elad, citados por Martínez et al. (1994), la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

4. Actividad lítica: en esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, degradadoras de las paredes celulares del hospedante, permitiendo la penetración de las hifas de *Trichoderma*. *Trichoderma harzianum* produce relativamente altas concentraciones de enzimas degradantes de la pared celular de los hongos, como α-1,3-glucanasas (Ozbay y Newman, 2004), con capacidad de inhibir la germinación de esporas o el crecimiento de patógenos en cooperación sinérgica con quitinasas y antibióticos (Tovar et al., 2008).

Inducción de resistencia y promoción del crecimiento vegetal

La inducción de mecanismos de resistencia a enfermedades se activa mediante sistemas de reconocimiento específicos por los cuales la planta reconoce el ataque de un patógeno (Hutcheson, Madriz, citados por Rossi, 2010). Se puede inducir resistencia localizada o sistémica a las enfermedades mediante la liberación de metabolitos, los cuales promueven la producción de etileno o de fitoalexinas terpenoides por la planta, ambos involucrados en la resistencia de la planta frente a patógenos (Howell et al., 2000).

Se han identificado tres tipos de compuestos producidos por cepas de *Trichoderma* spp. que son responsables de inducir resistencia en las plantas, entre ellas se encuentran: proteínas con función enzimática, homólogos de proteínas, oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular, los cuales son liberados desde el hongo o pared celular de la planta por la actividad de enzimas de *Trichoderma* spp. (Baker et al., 1997).

Cepas específicas del género *Trichoderma* penetran y colonizan los tejidos de las raíces de las plantas, e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en ella, los cuales son parte de la respuesta de defensa de la planta, lo que conduce a la resistencia inducida sistémica en toda la planta. Se ha demostrado que aplicaciones de *Trichoderma harzianum* en las hojas de

plantas que presentaban infecciones de moho gris producido por *Botrytis cinerea*, generaron una reducción de la severidad de la enfermedad foliar entre un 25 a 100% (Ozbay y Newman, 2004).

La promoción del crecimiento vegetal por especies de *Trichoderma* puede llevarse a cabo directamente mediante el estímulo de la absorción de nutrientes por la planta (Kleifeld y Chet 1992, Ousley et al. 1994) o por metabolitos secretados promotores del crecimiento vegetal, tales como hormonas (Windham et al., 1986).

Según Valencia et al., Cubillos et al., citados por Rossi (2010), las sustancias producidas por *Trichoderma harzianum* (auxinas, citoquininas, etileno y ácido acético), actúan como catalizadores de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular, haciendo que la planta se desarrolle más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con este agente. Contreras et al., citados por Rossi (2010), comprobaron el efecto beneficioso de *Trichoderma harzianum* sobre el sistema radicular, hallando que las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con este agente aumentaron su volumen de raíces laterales de 4 a 6 veces.

Inactivación de las enzimas del patógeno

La inactivación de enzimas patogénicas es otro mecanismo de biocontrol que presentan algunas especies del género *Trichoderma*, las cuales fueron capaces de suprimir la acción de enzimas como pectinasas, cutinasas, glucanasas y quitinasas, en hasta un 50% de su actividad (González et al., 2010).

2.2.2.5 Antecedentes en el uso de Trichoderma spp. como biofungicida en cultivos agrícolas

Trichoderma es uno de los hongos beneficiosos más versátiles y polifacéticos que abunda en los suelos, no se le conoce actividad patógena sobre ninguna planta (Andrade, 2012). Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat,

donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control; de igual forma pueden sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos (Reyes et al., 2002).

La capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. ha sido demostrada frente a patógenos como *Rhizoctonia solani, Sarocladium* spp*. Sclerotinia* spp. *Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea, Colletotrichum gloesporioides, Phytophthora nicotianae,* entre otros (Bettiol 2006, Tovar 2008, Santander 2012).

Trichoderma spp ha sido exitosamente utilizado como controlador biológico de patógenos en la superficie de plantas crucíferas, solanáceas y gramíneas (Rai y Singh, 1980). En ensayos de inoculación con *Trichoderma* en aguacate como antagonista de *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix*, bajo condiciones de campo realizadas por López-Herrera et al. (1999), se observó una reducción de la densidad de inóculo de los distintos aislados de *Trichoderma* entre el inicio del experimento y la cuarta semana de haber ocurrido la inoculación. Al finalizar el experimento, se encontró que la densidad de inóculo de los patógenos en los tratamientos inoculados con *Trichoderma* era sensiblemente menor respecto al testigo sin inocular con agente antagonista.

Haugaard et al. (2001), en su experimento de invernadero probaron que plantas de cebada inoculadas con extracto de micelio y filtrado de cultivos de siete diferentes hongos, existía una protección efectiva contra el patógeno *B. graminis* f.sp. *hord*ei. En comparación con el testigo sin tratar, se obtuvo una reducción de la enfermedad de entre un 70-98%. Además se constató que el efecto antagonista del extracto micelial persistió durante al menos tres días luego de la inoculación, siendo detectada su máxima expresión después de las dos horas de inoculación. Las colonias del patógeno que se desarrollan sobre hojas tratadas con micelio de *Trichoderma* presentan un crecimiento y esporulación menor que colonias creciendo en el testigo sin tratar, lo que deriva en una reducción de infecciones secundarias. Los mecanismos de control que se presume sean los responsables de estos resultados son: competencia directa con el patógeno y resistencia inducida. La protección conferida por la inoculación con el extracto micelial fue solo local, no se extendió más allá del área tratada (a lo largo de la hoja y de hoja en hoja).

Muñoz et al. (2001), comprobaron en ensayos de invernadero, que mediante la inoculación de cepas de *Trichoderma harzianum* en un suelo previamente solarizado, es posible lograr un excelente efecto antagonista sobre *R. solani*, posiblemente debido a la reducción de microorganismos nativos y a una mayor oportunidad de colonizar rápidamente el suelo, mientras que en ensayos de campo la actividad antagonista fue media a aceptable.

Perelló et al. (2003), realizaron un ensayo acerca de la eficacia de *Trichoderma* como controlador de *Pyrenophora tritici-repentis*, agente causal de mancha amarilla en trigo. Las pruebas realizadas en invernadero indicaron que siete de las 15 cepas probadas como antagonista tuvieron efecto significativo en la supresión de *P. tritici-repentis,* atribuyendo este resultado a la capacidad de *Trichoderma* de competir con el patógeno por nutrientes y espacio.

Salehpour et al. (2005), realizaron un ensayo de invernadero en el cual sembraban macetas con semillas previamente tratadas con una solución de micelio de cepas de *Trichoderma*, sobre suelo infectado con *Bipolaris sorokiniana*. Encontraron que todas las cepas de *Trichoderma* disminuyeron la severidad de la pudredumbre radicular en trigo, causada por *B. sorokiniana*, en comparación con el testigo sin inocular con el antagonista. Además el tratamiento con *Trichoderma* promovió el crecimiento de las plantas, con aumentos en altura de planta, peso fresco y seco de brotes y raíces.

Perelló et al. (2006), evaluaron la capacidad de cepas de *Trichoderma* como controladores biológicos de *Septoria tritici* en trigo en condiciones de campo. Encontraron que todas las cepas de *Trichoderma* reducían la severidad de la enfermedad en comparación con el testigo sin antagonista, al ser aplicado sobre la semilla o en suspensión foliar, obteniendo en algunos casos un porcentaje de control similar que con la aplicación de fungicidas. Estos resultados varían con el método de aplicación (sobre la semilla o foliar), cultivar y etapa fenológica del cultivo, siendo mayor el control en estadios tempranos.

Martínez et al. (2008), midieron la eficacia de *Trichoderma* como biocontrolador de *Rhizoctonia solani* en arroz. Comprobaron que tres de las siete cepas aisladas de *Trichoderma* presentaban un comportamiento antagónico estable y destacado, con eficacia mayor al 90%. Gonzáles et al. (2005), obtuvieron alta efectividad de control sobre *R. solani*, realizando tratamientos con inoculación de *Trichoderma* cada 15 días hasta el final del ciclo del cultivo.

Pereyra et al. (2005), bajo condiciones semi-controladas de campo, evaluaron el efecto de la aplicación de un preparado comercial de *Trichoderma harzianum* sobre el rastrojo de trigo, en la colonización de éste por *Gibberella zeae,* y en la producción de peritecios y ascosporas. En ninguno de los tratamientos se observó un efecto significativo en la reducción de la colonización del rastrojo por *G. zeae*. No obstante, los rastrojos inoculados con *T. harzianum*, presentaron una significativamente menor producción de peritecios por mm^2 de rastrojo, a los tres meses de haber aplicado el antagonista.

Gilbert e Inch (2007), estudiaron el efecto de cinco aislados de *Trichdoerma harzianum* en la producción de peritecios de *Gibberella zeae* en rastrojo de trigo bajo condiciones de campo. Luego de 30 a 60 días de haberse inoculados los aislados de *Trichoderma* sobre el rastrojo de trigo, el número de peritecios de *G. zeae* disminuyó significativamente. Fernández, citado por Conde (2011), encontró una reducción significativa en la producción de peritecios de *Gibberella zeae* y en la producción de ascosporas en los tratamientos se aplicó *T. harzianum* en rastrojo de trigo como biocontrolador.

Amin y Haggag (2001), mediante un ensayo de invernadero, demostraron la capacidad de algunas especies de *T. harzianum* y *T*. *hamatum* de disminuir la incidencia de podredumbre de raíz en girasol, causada por el agente *Fusarium solani*. Además se evidenció la existencia de una interacción *Trichoderma*-*Fusarium*-nematodos, indicando una mayor reducción de los porcentajes de plantas con podredumbre de raíz cuando se presentaba este complejo.

En un ensayo de invernadero, Mao et al. (1997), trataron semillas de maíz con una suspensión de *Trichoderma viride*, para probar la eficacia del mismo como antagonista de los agentes causales de podredumbre de la semilla y *damping-off* (*Pythium ultimum, P. arrhenomanes, y Fusarium graminearum*). Encontraron que las semillas sin tratar con agente biocontrolador, presentaron entre un 20% y 40% de germinación, contra un 87-90% de las semillas tratadas, como resultado de la reducción de la severidad de la podredumbre de raíz, además de incrementar el peso fresco y altura de planta. Howell (2001), en algodón encontró que la eficiencia del biocontrol de las cepas de *Trichoderma* spp. en prevenir el síndrome de *damping-off* en pre-emergencia, se debía a la metabolización de estimulantes de la germinación del patógeno que emanaban de las semillas. Cepas pertenecientes a las especies *T. virens* y *T. koningii* promovieron la producción de terpenos en las raíces de algodón, de los cuales

se conoce poseen actividad antibacteriana, antifúngica, antivírica, y antiparasitaria (Savoia et al., Trombetta et al., Chinworrungsee et al., citados por Tijerino, 2010).

Trichoderma spp. también ha sido utilizado como microorganismo promotor del crecimiento vegetal. Ferraris y Faggiolo (s.f.), inocularon semillas de trigo con una solución hifal de *Trichoderma* que luego fueron sembradas en condiciones de campo. Se determinó que la inoculación con el promotor de crecimiento incrementó el rendimiento, el número de granos y el peso unitario de éstos. Otras investigaciones indican que raíces profundas de maíz colonizadas por cepas de *Trichoderma* aumentaron su número, mejorando la resistencia del cultivo a la sequía, además de haber demostrado requerir hasta 40% menos de fertilización nitrogenada. Además, según Bellones et al., citados por Ezziyyani et al. (2004), en las plántulas crecidas a partir de semillas tratadas con *T. harzianum*, el porcentaje de germinación, el peso seco, y la longitud de las plántulas fue superior al de las no tratadas, lo que indica mayor absorción de nutrientes.

2.2.2.6 Ambientes que favorecen el desarrollo de comunidades de *Trichoderma* spp.

Las prácticas culturales pueden ser adecuadamente combinadas para beneficiar a las poblaciones naturales de microorganismos de control biológico (A*ctinomycetes, Trichoderma* spp., y *Gliocladium* spp.).

El género *Trichoderma* ha demostrado ser capaz de colonizar la rizósfera. La naturaleza saprofítica del género implica que las variaciones en la concentración de materia orgánica que se dan en el sistema a través de la rotación de cultivos y el flujo de carbono, pueden influir en el crecimiento, la diversidad, la funcionalidad o la actividad de control biológico en el campo (Hang et al., 2003).

La relación C:N tiene más influencia en el crecimiento de los hongos que la concentración de carbono en el perfil. La relación óptima de C:N varía entre especies, siendo para *T. viride* TV-1 de 10:1 a 40:1. Esta relación también afectó la esporulación de los hongos, siendo lo óptima para *T. viride* 160:1. La relación C:N tuvo efecto sobre la esporulación de cepas de *T. viride* TV-1 en la que una concentración más baja de carbono (6 gl^{-1}) fue beneficioso para su

esporulación (Gao et al., 2006). En un trabajo realizado por Pérez et al. (2009), donde se evaluó la incidencia de distintos tipos de laboreo del suelo sobre las comunidades de microorganismos en el mismo, si bien no se observaron diferencias significativas en el número de UFC/gr de suelo de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. entre los distintos sistemas de laboreo, si se registraron diferencias significativas en el total de hongos *Actinomicetes*, siendo 400% mayor bajo siembra directa que en labranza convencional.

Broker et al. (1988), demostraron que las poblaciones de hongos aisladas fueron consistentemente mayores en residuos de maíz que en los de trigo. El tamaño de las poblaciones microbianas en suelo fue similar. La mayor cantidad de *Trichoderma* spp. fue aislada durante el segundo verano de la rotación, pero estos niveles disminuyeron sustancialmente al tercero.

Durante seis ciclos agrícolas, Lipps et al. (1991), tomaron muestras de rastrojo de una rotación de soja, maní y maíz, bajo dos sistemas de laboreo (convencional y siembra directa), con el fin de cuantificar las poblaciones de microorganismos del suelo. La mayor cantidad de *Actinomicetes*, *Trichoderma* spp., y *Gliocladium* spp. se registraron cuando el maíz era el cultivo anterior. En cuanto a los sistemas de laboreo, las poblaciones de los tres grupos de microorganismos fueron mayores en maní bajo siembra directa, que bajo laboreo. En estas condiciones, se registró una menor incidencia de *Sclerotinia minor* y *Fusarium solani*, evidenciando un posible control biológico de estos patógenos. Fue cuantificada una mayor cantidad de cepas de *Trichoderma* spp. de plantas pertenecientes a la rotación maíz-soja que bajo cultivo continuo de maíz. El porcentaje de plantas conteniendo las cepas *T. koningii* y *T. harzianum* es inferior al 14%. (Lipps et al., 1991). El laboreo afectó el porcentaje de plantas que contenían cepas de *Trichoderma* en los tejidos de tallo y corona, en comparación con el tratamiento de siembra directa, el cual presentó mayor porcentaje de plantas con *Trichoderma* spp. Según Whitney y Mortimer, citados por Lipps et al. (1991), las poblaciones de *Trichoderma* aumentan en sistemas de siembra directa y en laboreo en aquellas áreas donde se acumulan residuos de maíz. Estos autores además indican la existencia de algún tipo de relación parasitaria entre *Trichoderma* y el maíz.

Vargas et al. (2005) evaluaron el efecto de la labranza y las rotaciones sobre las poblaciones de agentes de biocontrol en el suelo, como *Actinomycetes*, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. En general, encontraron

mayor número de poblaciones de biocontroladores en cultivos sembrados sobre rastrojo de maíz que sobre rastrojo de soja u otra leguminosa, debido principalmente al mayor aporte de materia orgánica al suelo por parte del rastrojo de la gramínea. El efecto es mayor en sistemas de cero laboreo en comparación a laboreo convencional.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El estudio fue realizado en el laboratorio de la unidad de Fitopatología de la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), en el departamento de Paysandú, durante el período marzo a diciembre de 2011.

3.2 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE *Trichoderma* Y PATÓGENOS

Para el estudio se utilizaron 26 cepas nativas de *Trichoderma* pertenecientes a la colección de Fitopatología, EEMAC. En el set de cepas seleccionadas para este estudio se encuentran representadas 7 especies aisladas de suelo y rastrojo de un experimento de rotaciones situado en el potrero 36 de la EEMAC. La identidad de estas cepas fue confirmada por técnicas moleculares (Villar et al., 2011). Se seleccionaron al azar cepas de las especies encontradas para proceder a la caracterización de la capacidad antagónica ante *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*, totalizando 26 cepas en estudio.

Cuadro No. 2 Lista de cepas de cada una de las especies de *Trichoderma* utilizadas en las pruebas de antagonismo. Se indica además el sustrato del cual fueron aisladas.

H. lixii	***T. gamsii***	***T. koningiopsis***		***T. spirale***	***T. atroviride***		***T. tomentosum***	***T. hamatum***
S75	S10	S249	S143	R212	R408	R487	R511	S77
R185	R122	R355	S279S449	R403	R454	R492	R546	S85
R200	R524	R435			R474	R495	R555-5	S354

R: obtenidas de rastrojo S: obtenidas de suelo

La capacidad antagónica de estas cepas fue evaluada contra los patógenos *Pyrenophora tritici-repentis* (agente causal de la mancha amarilla del trigo) cepa DTR 60, y *Bipolaris sorokiniana* (agente causal de la mancha

borrosa en cebada), cepa B5.01.008, ambas provenientes de la colección de INIA La Estanzuela, y cedidas por la Dra. Silvia Pereyra.

3.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO IN VITRO

Para evaluar la capacidad antagónica de las 26 cepas de *Trichoderma* frente a los distintos patógenos (*Pyrenophora tritici-repentis* y *Bipolaris sorokiniana*), fueron realizadas tres pruebas *in vitro.*

3.3.1 Cultivos duales de patógeno-antagonista

Se sembraron en una misma placa de Petri con medio PDA (Potato Dextrose Agar), un disco de agar conteniendo micelio del patógeno, y otro con micelio de *Trichoderma*, ambos discos medían 5 mm de diámetro y estaban separados entre sí por 4,5 cm, y a 2 cm del borde de la placa (Morton y Stroube, 1955). El testigo correspondió a la siembra de un solo disco de agar por placa conteniendo micelio del patógeno de manera de observar el normal desarrollo del mismo. Estas placas fueron incubadas en cámara de crecimiento a 25 ºC, en oscuridad, durante 15 días.

La prueba se realizó enfrentando las 26 cepas de *Trichoderma* contra cada uno de los patógenos.

3.3.1.1 Interacción miceliar

Siguiendo la metodología de Reyes et al. (2008), fueron tomadas muestras de la zona de interacción patógeno-antagonista de las placas pertenecientes a la prueba de cultivos duales, y colocadas en portaobjeto para ser observadas en microscopio óptico, de modo de poder evaluar la existencia de algún tipo de micoparasitismo (penetración, lisis, enrollamiento). El procedimiento se repitió por triplicado para cada cepa de *Trichoderma* spp.

3.3.2 Producción de compuestos volátiles antifúngicos

La metodología utilizada para esta prueba fue la descripta por Cabrera (2009). Se sembró en el centro de una placa de Petri con medio PDA un disco de 5 mm de diámetro de micelio del patógeno, y en otra placa contiendo el

mismo medio, un disco también de 5 mm de diámetro de micelio de la cepa de *Trichoderma* en cuestión, ambos micelios provenían de cultivos con 48 h de crecimiento. Las placas sin sus respectivas tapas, se colocaron una sobre la otra (el patógeno fue situado arriba de modo de evitar que la esporas de *Trichoderma,* de fácil dispersión, cayeran sobre la placa del patógeno), y fueron selladas con parafilm, para luego ser incubadas en cámara de crecimiento a 25 ºC en oscuridad, durante 5 días. Como Testigo, para determinar el crecimiento del patógeno en ausencia de *Trichoderma*, en ambas placas se sembraron discos de agar con micelio del patógeno. Este procedimiento se realizó con las 26 cepas de *Trichoderma*.

3.3.3 Producción de compuestos solubles antifúngicos en medio líquido

Para realizar esta prueba se tomó en cuenta la metodología utilizada por Cabrea (2009). La misma consistió en inocular en matraces de 50 ml conteniendo medio YES (extracto de levadura 2 %, sacarosa 15 %) con las distintas cepas de *Trichoderma*, los cuales provenían de un cultivo de siete días a 25 ºC, sin agitación. Al final de este lapso el sobrenadante del cultivo fue filtrado con filtros con poros de 0,45 µm para obtener un filtrado libre de células. El mismo fue incorporado a igual volumen de PDA con doble concentración de agar y vertido en placas de Petri. Como Testigo, se prepararon las placas agregando igual volumen de medio YES pero sin inocular. Sobre estas placas se sembró luego un disco de micelio de 5 mm de diámetro del patógeno y se incubó a 25 ºC, en oscuridad.

3.4 DETERMINACIONES

3.4.1 Cultivos duales de patógeno-antagonista

Para estimar la capacidad antagónica de las cepas a los 3, 5, 10 y 15 días de haber sembrado las placas con los discos de micelio se determinó:

- radio de avance del patógeno en dirección al antagonista (mm),

- diámetro mayor de la colonia del patógeno (mm) (para estos dos casos se cuantificó la capacidad antagónica como porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia del patógeno en relación al Testigo),

- tipo de reacción en la interacción:

    0. no hay contacto de la colonia de *Trichoderma* con la colonia del patógeno
    1. hay contacto entre la colonia de *Trichoderma* y la colonia del patógeno, pero no hay crecimiento de una sobre la otra
    2. sobrecimiento de la colonia de *Trichoderma* sobre la del patógeno

-coloración de la colonia del patógeno:

0. no hay cambios de color de la colonia del patógeno respecto al Testigo

1. el color del borde de la colonia del patógeno difiere de la del Testigo

2. el color de toda la colonia del patógeno difiere de la del Testigo

-Tasa de crecimiento del patógeno (TC):

rf-ri/tf-ti, donde:

rf: radio de avance al final del experimento,

ri: radio de avance en la primera medición del experimento.

Tf-ti: tiempo durante el cual transcurrió el experimento.

3.4.2 Producción de compuestos volátiles antifúngicos

Para cuantificar el antagonismo se tomaron medidas del diámetro mayor de la colonia del patógeno y de la colonia de la cepa de *Trichoderma* al día 2, 3 y 5 luego de haberse sembrado las placas, expresando la capacidad antagónica de la cepa de *Trichoderma* como el porcentaje de reducción de crecimiento de la colonia del patógeno respecto al Testigo.

3.4.3 Producción de compuestos solubles antifúngicos en medio líquido

Se evaluó el diámetro mayor de las colonias de los patógenos al día 2, 3 y 4 luego de haber sido sembradas en las placas.

La capacidad antagónica de *Trichoderma* se expresó como el porcentaje de reducción del crecimiento de las colonias en las placas con filtrados, con respecto al Testigo sin filtrado de *Trichoderma*.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado en las tres pruebas *in vitro* fue de parcelas completamente aleatorizadas (DCA), donde la unidad experimental fue la placa de Petri. Los tratamientos están dados por las distintas cepas de *Trichoderma* más el Testigo, el cual consiste en el patógeno creciendo sin la presencia del antagonista, totalizando 27 tratamientos. El número de repeticiones dependió de la prueba, siendo 5 para cultivos duales, 3 para producción de compuestos volátiles y 3 para compuestos antifúngicos solubles. Todas las repeticiones de cada experimento fueron realizadas al mismo tiempo.

3.5.1 Modelo estadístico

Yij= u + Ti+ P j + (TP)ij + e ij

i=1,2 (patógenos)
j=1…27 (tratamientos)
Yij= variable (diámetro mayor colonia patógeno, radio colonia patógeno)
Ti= efecto relativo del patógeno
Pj= efecto relativo del antagonista
(TP)ij= interacción cepa del antagonista-patógeno

Eij= Efecto del error

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias a través del test de Tukey con probabilidad de 5%, utilizando el paquete estadístico Infostat. Además se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson a partir de los promedios generales de las variables estudiadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL PATÓGENO EN CULTIVOS DUALES

Todas las cepas de *Trichoderma* spp. lograron inhibir el crecimiento de ambos patógenos en porcentajes que van del 73% al 84% para el caso de *Pyrenophora tritici-repentis* y del 60% y 70% para *Bipolaris sorokiniana*, en relación al crecimiento de los mismos sin el antagonista, a los diez días de crecimiento (Figuras No. 6 y 7).

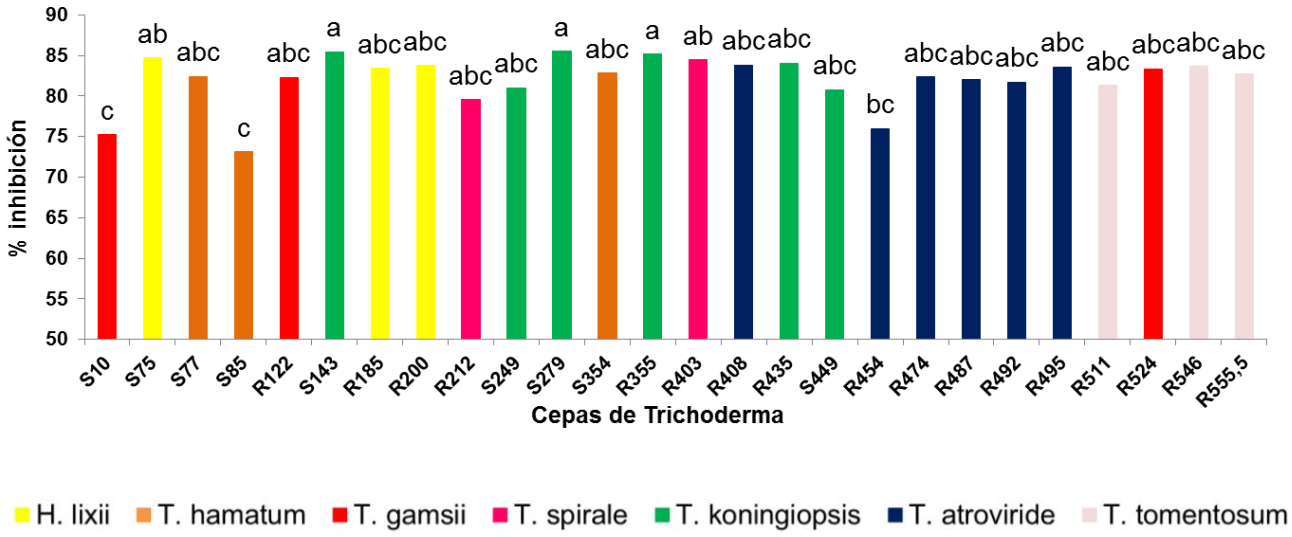

Figura No. 6. Inhibición del crecimiento de *Pyrenophora tritici repentis* frente a las distintas cepas de *Trichoderma* en cultivos duales de patógeno-antagonista promedio de 5 repeticiones, expresado en relación al crecimiento del patógeno en medio de cultivo sin el antagonista, y medido a los 10 días de crecimiento. Medias con distinta letra difieren significativamente (Tukey; p=0.05).

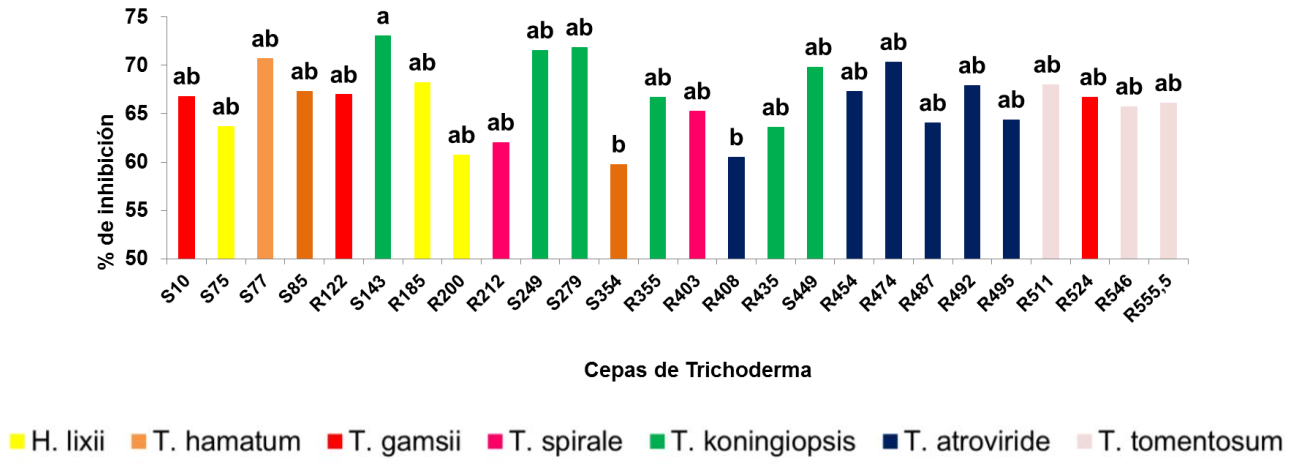

Figura No. 7. Inhibición del crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* frente a las distintas cepas de *Trichoderma* en cultivos duales de patógeno-antagonista promedio de 5 repeticiones, expresado en relación al crecimiento del patógeno en medio de cultivo sin el antagonista, a los 10 días de crecimiento. Medias con distinta letra difieren significativamente (Tukey; p=0.05).

Se observó una significativa variabilidad inter- e intra-específica de la capacidad antagónica de *Trichoderma*, siendo a su vez diferente el efecto de cada cepa sobre cada patógeno. Frente a *P. tritici-repentis*, la capacidad antagónica de las distintas cepas de *Trichoderma* spp. difirió significativamente según la cepa. La inhibición observada con las cepas S143, S279, y R355 fue significativamente mayor que la obtenida con las cepas S10 y S85. Sin embargo, la diferencia absoluta entre los extremos es reducida (Figura No. 6).

Si bien la variabilidad en el comportamiento de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *B. sorokiniana* mostró diferencias estadísticamente significativas entre las cepas S143 con la R408 y S354, la capacidad de inhibición del crecimiento del patógeno fue muy similar para todas las cepas (Figuras No. 6, 7).

En las confrontaciones patógeno-antagonista se pudo observar una zona de inhibición progresiva del crecimiento del patógeno explicada por la mayor

velocidad de crecimiento de *Trichoderma*, y un sobrecrecimiento del patógeno por parte del antagonista. Estas reacciones coinciden con Casimiro (2001), Ezziyyani et al. (2004). Este contacto entre ambos microorganismos permite la acción parasítica de *Trichoderma*, que se manifiesta por la inhibición del crecimiento micelial no sólo por compartir el mismo sustrato sino también por la liberación de antibióticos y enzimas tales como β-1,3- glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa. Estos compuestos actúan como degradadores de la pared celular, jugando un importante papel en el micoparasitismo (Lorito et al., Papavizas y Lumsden, Herrera et al., Sid Ahmed et al., citados por Ezziyyani et al., 2004). Posteriormente se observó que *Trichoderma* invadió completamente las placas, presentando abundante esporulación no solo en la zona de intersección con el patógeno sino incluso sobre éste (Figuras No. 8, 9, 10 y 11). Esto ocurrió frente a ambos patógenos, donde el grado de esporulación dependió de la cepa de *Trichoderm*a y de la interacción cepa antagonista-patógeno.

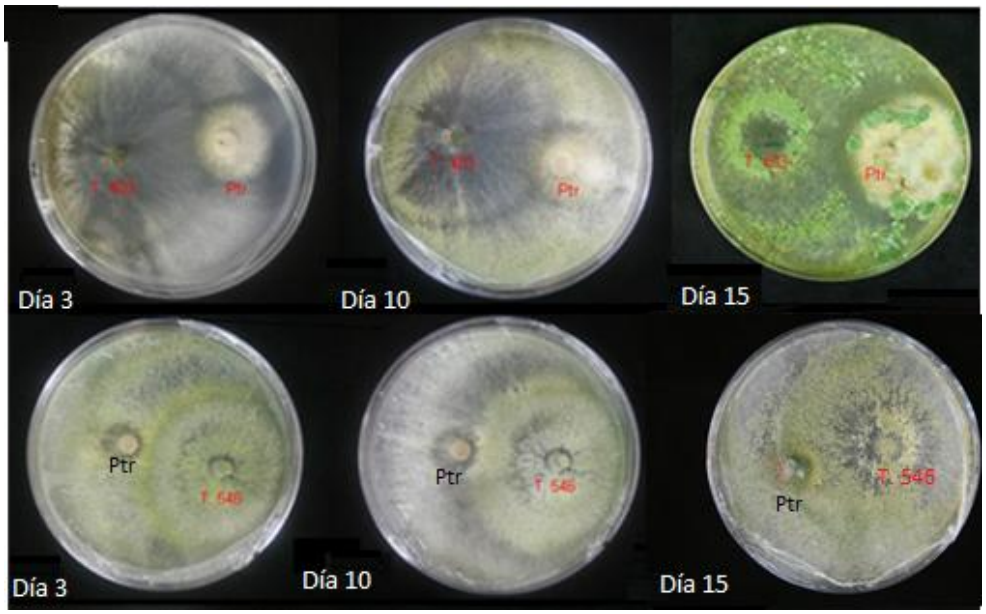

Figura No. 8. Crecimiento de la cepa de *Pyrenophora tritici-repentis* enfrentada con las cepas R403 y R546 de *Trichoderma* en prueba de cultivos duales a los 5, 10 y 15 días de crecimiento.

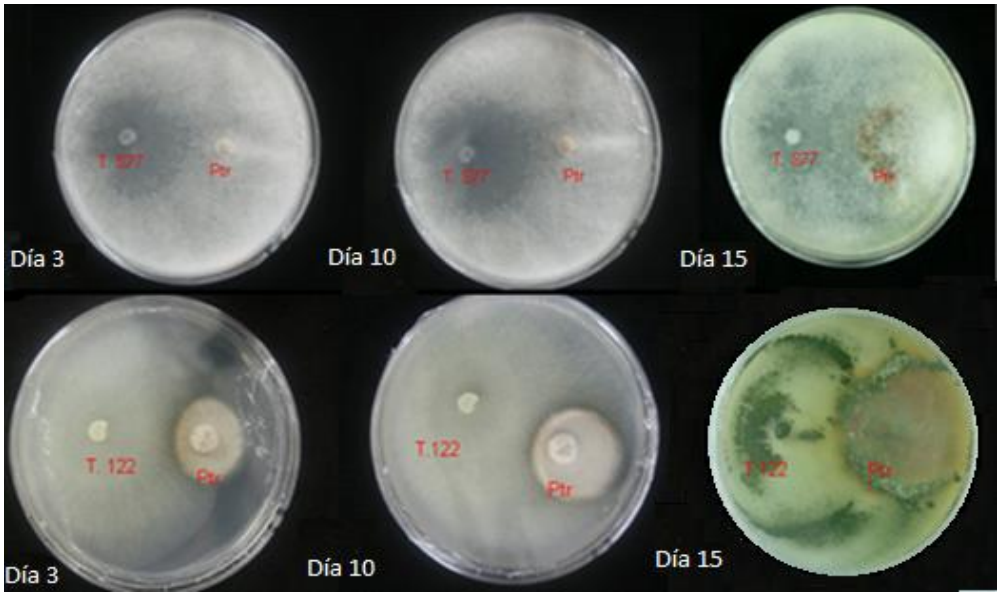

Figura No. 9. Crecimiento de la cepa de *Pyrenophora tritici-repentis* en presencia de las cepas S77 y R122 de *Trichoderma* en prueba de cultivos duales a los 5, 10 y 15días de crecimiento.

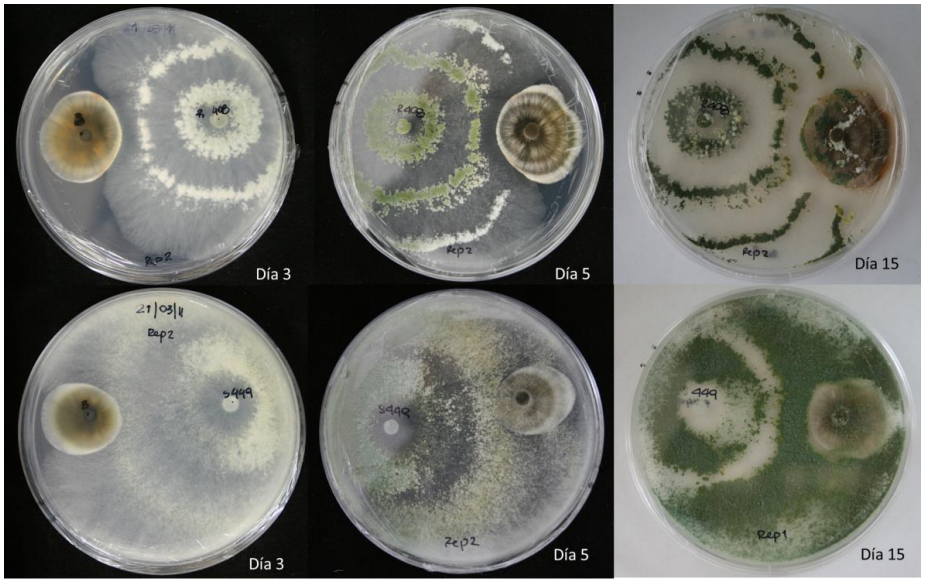

Figura No. 105. Crecimiento de la cepa de *Bipolaris sorokiniana* en presencia de las cepas de *Trichoderma* R408 y S449 en prueba de cultivos duales a los 5, 10 y 15 días de crecimiento.

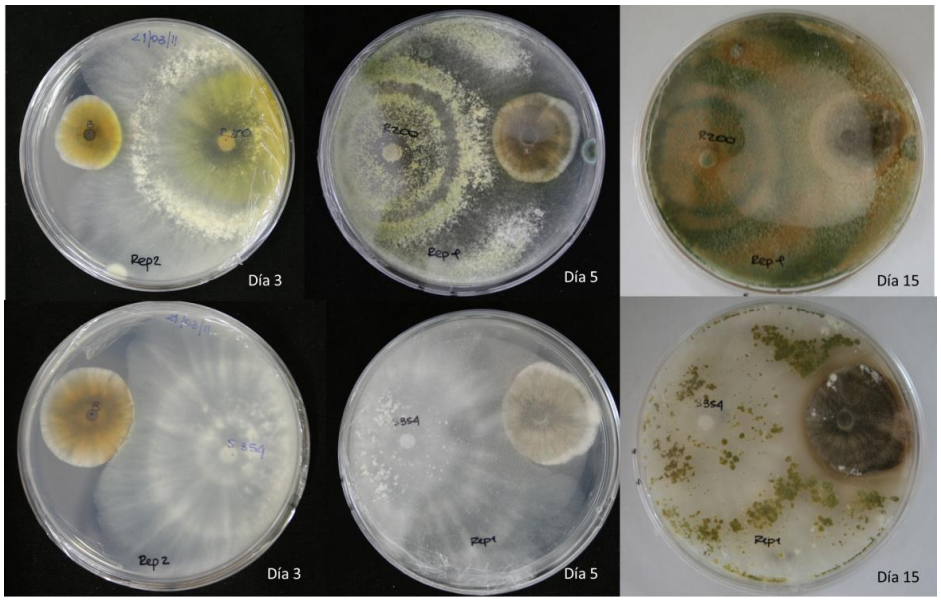

Figura No.11. Crecimiento de la cepa de *Bipolaris sorokiniana* en presencia de las cepas de *Trichoderma* R200 y S354 en prueba de cultivos duales a los 5, 10 y 15 días de crecimiento.

El crecimiento de ambos patógenos medido como radio de avance de las colonias a los 10 días se clasificó en tres categorías contemplando el rango del crecimiento de las mismas de forma arbitraria. Para el caso de *P. tritici -repentis* en presencia de *Trichoderma* alcanzaron radios considerablemente inferiores al testigo (*P. tritici-repentis* creciendo sin presencia de *Trichoderma)*, donde solo una colonia logró un radio superior a 1,5 cm (Cuadro No. 3).

Contrariamente, se observó que para el caso de las colonias de *B. sorokiniana*, solo la cepa S143 limitó al patógeno a un crecimiento inferior a 2,5 cm de diámetro, mientras que ante la mayoría de las cepas se observó un crecimiento en un rango de 2,5 y 3,0 cm, y varias cepas permitieron un crecimiento del patógeno que superó los 3,0 cm de diámetro (Cuadro No. 4). De todos modos, como se mencionó al analizar el porcentaje de inhibición, todas las cepas redujeron sensiblemente el crecimiento de *B. sorokiniana* respecto al testigo sin presencia de *Trichoderma* spp.

Cuadro No. 3. Radio de avance de las colonias de *Pyrenophora tritici-repentis* en cultivos duales frente a las distintas cepas de *Trichoderma*, medido a los 10 días de crecimiento.

Cepas de *Trichoderma*	**Radio de Avance**
R185, R200, R355, R403, R408,R435, R495,R524, R546, S143, S279, S75	**r<1,0**
R122,R212,R454,R474,R487,R492,R511.R555-5,S10,S354,S449,S77	**1,0<r>1,5**
S85	**r>1,5**
r Testigo*	**5,84**

**Pyrenophora tritici- repentis* sin la presencia de antagonista en la placa.

Cuadro No. 4. Radio de avance de las colonias de *Bipolaris sorokiniana* en cultivos duales frente a las distintas cepas de *Trichoderma*, medido a los 10 días de crecimiento.

Cepas de *Trichoderma*	**Radio de Avance**
S143	**r< 0,5**
S77, S249, S279, R524, R492, S85, R185, R474, S10, R546, S449, R454, R122, R555.5, R435, R487, R511, S75	**0,5<r>1,0**
R403, R355, R495, R212, S354, R200, R408	**r>1,0**
r Testigo*	**3,56**

**Bipolaris sorokiniana* sin la presencia de antagonista en la placa.

4.1.1 Tasa de crecimiento del patógeno

Para confirmar la modificación en el crecimiento de los patógenos por acción del antagonista se midió su tasa de crecimiento (TC).

El crecimiento de ambos patógenos se redujo frente a todas las cepas de *Trichoderma*, con valores superiores al 90% (en referencia al testigo, patógeno creciendo sin presencia de antagonista) para la mayoría de los casos, mientras que en otros consiguió la detención total del crecimiento (Cuadro No. 5). Esta reducción en la TC de dichos patógenos enfrentados a *Trichoderma* coincide con Guigón et al. (2010), quienes observaron una reducción en el crecimiento de los patógenos frente a cepas de *Trichoderma* en todos los ensayos, deteniéndose cuando el micelio del mismo entra en contacto con el antagonista. El grado de inhibición de las cepas de *Trichoderma* osciló entre 44% y 64%.

Cuadro No. 5. Tasa de crecimiento (TC) promedio por día para *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici repentis* frente a *Trichoderma* spp, a los 10 días de crecimiento, expresada como porcentaje del crecimiento del patógeno en las placas testigo.

Especie de *Trichoderma*	**Cepa *Trichoderma***	**TC Promedio de *B. sorokiniana*(%)**	**TC Promedio de *P. tritici-repentis* (%)**
H. lixii	S75	5,0	1,9
	R185	4,2	3,1
	R200	1,7	0,6
T. atroviride	R408	0,8	0,0
	R454	0,009	1,9
	R474	2,5	2,5
	R487	0,006	0,0
	R492	1,7	0,0
	R495	1,7	0,0
T. gamsii	S10	78,3	0,6
	R122	1,7	3,8
	R524	2,5	0,6
T. hamatum	S77	0,8	1,9
	S85	1,6	23,1
	S354	0,8	0,6
T. koningiopsis	S249	10,8	0,0
	R355	0,0	0,0
	R435	1,7	0,0
	S143	0,014	0,0
	S279	2,5	0,0
	S449	0,8	0,6
T. spirale	R212	5,8	6,2
	R403	0,8	1,3
T. tomentosum	R511	0,8	0,6
	R546	5,8	0,0
	R555-5	5,8	3,1
Patógeno sin antagonista (mm)	**Testigo**	**0,64**	**0,8533**

4.1.2 Tipo de reacción en la interacción

Para varias cepas se observó enlentecimiento del crecimiento del patógeno en comparación al testigo, cuando aún no había contacto entre las colonias, evidenciando la existencia de algún mecanismo de antagonismo que

no necesariamente requiere del contacto entre las hifas de ambos hongos. Esta inhibición pre-contacto podría explicarse por la producción de sustancias con efecto antibiótico, como son los compuestos líticos, enzimas y toxinas (Frioni 1999, Infante et al. 2009, Kurioka et al. 2013).

Si bien al final de este período, la mayoría de las cepas de *Trichoderma* habían crecido por encima del patógeno cubriendo la totalidad de la placa, se observaron distintos patrones de crecimiento de las colonias de patógeno y del antagonista. Similares resultados fueron mencionados por Perelló et al. (2003), quienes observaron dos patrones de inhibición de la colonia de *P. tritici-repentis*. En primer lugar la colonia del patógeno presenta un borde definido de crecimiento, rodeado por *Trichoderm*a, y posteriormente las colonias del patógeno fueron cubiertas por las cepas del antagonista.

Cuadro No. 6. Patrones de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* frente a *Bipolaris sorokiniana*, evaluados a los 10 días de crecimiento.

Patrón de crecimiento	Especie de *Trichoderma*	Cepa de *Trichoderma*
Sobrecrecimiento de *Trichoderma*	***T. gamsii***	R122, R524
	H. lixii	R185, R200
	T. koningiopsis	S249, R355, R435, S143, S279, S449
	T. spirale	R212, R403
	T. atroviride	R474, R408, R487, R492, R495, S354, S77
Contacto en los bordes de las colonias	***T. atroviride***	R454
	H. lixxi	S75
	T. gamssi	S10
Sin contacto de las colonias	***T. tomentosum***	R511, R555-5

Pese a las diferencias en las características de crecimiento de las colonias de *Trichoderma* spp., todas lograron inhibir el crecimiento de *B. sorokiniana*. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp. lograron crecer por encima de la colonia de *B. sorokiniana* tan pronto como al tercer día luego de la siembra en placa, y detener el crecimiento del patógeno al quinto día, evidenciando su alta capacidad para el crecimiento y colonización bajo

condiciones de humedad y temperatura constantes. En el caso de la interacción de *Trichoderma* spp. con *P. tritici-repentis* no fue posible diferenciar estos patrones de crecimiento, ya que todos los aislados sobrecrecieron al patógeno, posiblemente debido a su rápido desarrollo, por lo que las determinaciones debieron haberse realizado probablemente antes que para *B. sorokiniana*. Estos patrones de inhibición fueron similares a los encontrados por Perelló et al. (2003), Mónaco et al. (2004), quienes infieren que esto estaría relacionado a distintas estrategias de antagonismo por parte de los patógenos.

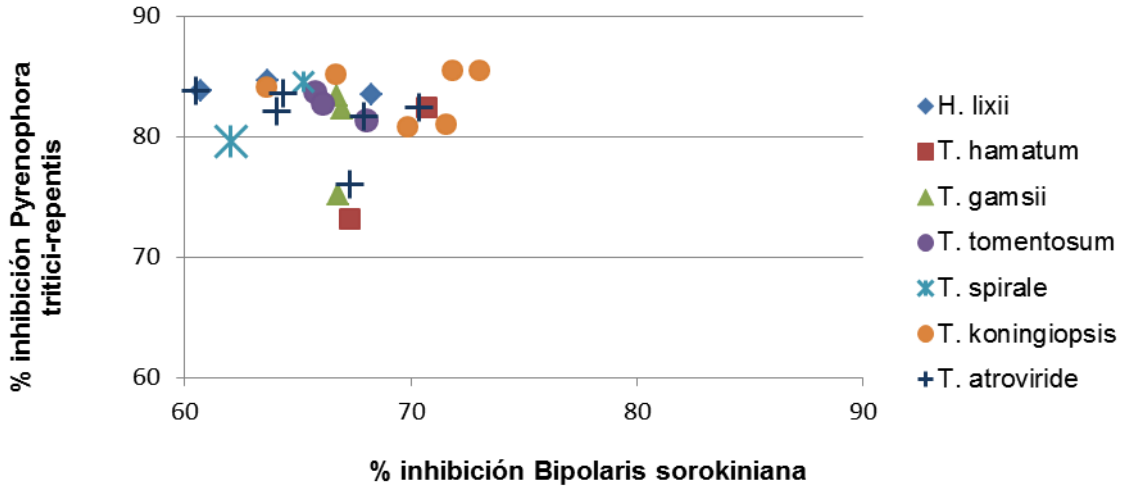

Figura No.12. Relación existente entre el porcentaje de inhibición de *Bipolaris sorokiniana* y el porcentaje de inhibición *Pyrenophora tritici repentis* de las cepas de *Trichoderma* en la prueba de cultivos duales, evaluado a los 10 días post-inoculación

Las cepas de *Trichoderma* evaluadas en general presentaron altos valores de inhibición del crecimiento de ambos patógenos en la prueba de cultivos duales, sin presentar una relación de algún tipo (r^2=0.0025, Figura No. 12). Como se observa, hay un comportamiento similar entre especies pero no dentro de estas, existiendo poca variabilidad.

4.1.2.1 Interacción miceliar

Se pudo comprobar la ocurrencia de parasitismo de las distintas cepas, donde se observaron hifas del patógeno parasitadas, conteniendo crecimiento de hifas de *Trichoderma* dentro del talo del patógeno (Figura No. 13d). Esto coincide con lo observado por Perelló et al. (2003), Mónaco et al. (2004), San Martín et al. (2012), quienes encontraron diferencias morfológicas en las hifas del patógeno como ser plasmólisis y vacuolización de las hifas, y micelio con aspecto toruloso y procesos de enrrollamiento circular, en la zona próxima al contacto con el antagonista en relación al control (patógeno sin presencia de antagonista). En la Figura No. 13b se observa como una hifa de *Trichoderma* enrolla a una de *B. sorokiniana*, mientras que en las Figuras No. 13a, 13c y 13d se observan hifas de *Trichoderma* parasitando a hifas del patógeno.

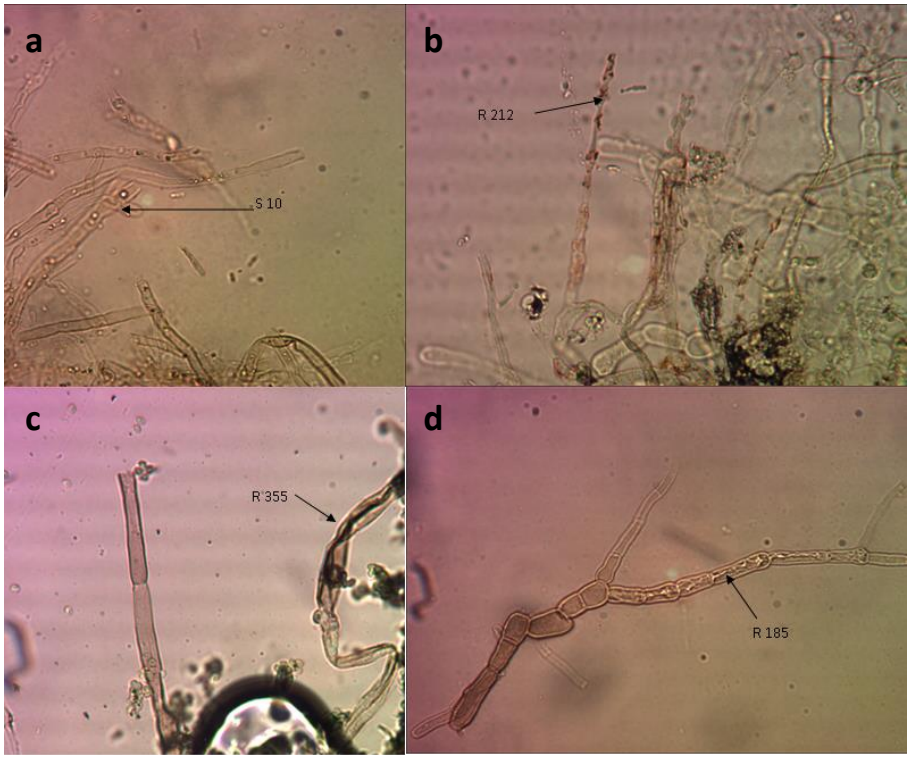

Figura No.13. Interacción entre *Bipolaris sorokiniana* y distintas cepas del antagonista *Trichoderma* en cultivos duales observados en microscopio óptico. Las flechas en cada imagen indican la presencia de *Trichoderma* creciendo sobre las hifas del patógeno (b) o dentro de las hifas del patógeno (a, c, d).

4.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL PATÓGENO DEBIDO A COMPUESTOS VOLÁTILES ANTIFÚNGICOS

Los resultados indican que los compuestos volátiles producidos por las cepas evaluadas producen una mayor inhibición en el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* que de *Pyrenophora tritici-repentis* (Figura No.14). Frente a *B. sorokiniana* los valores máximos alcanzaron hasta el 40% de inhibición del crecimiento, existiendo diferencias significativas entre la cepa S75 y el testigo; mientras que frente a *P. tritici repentis* fueron menores al 25% (Figura No.15). A su vez, hubo cepas que no lograron inhibir el crecimiento del patógeno (S85, S279, R454, R511).

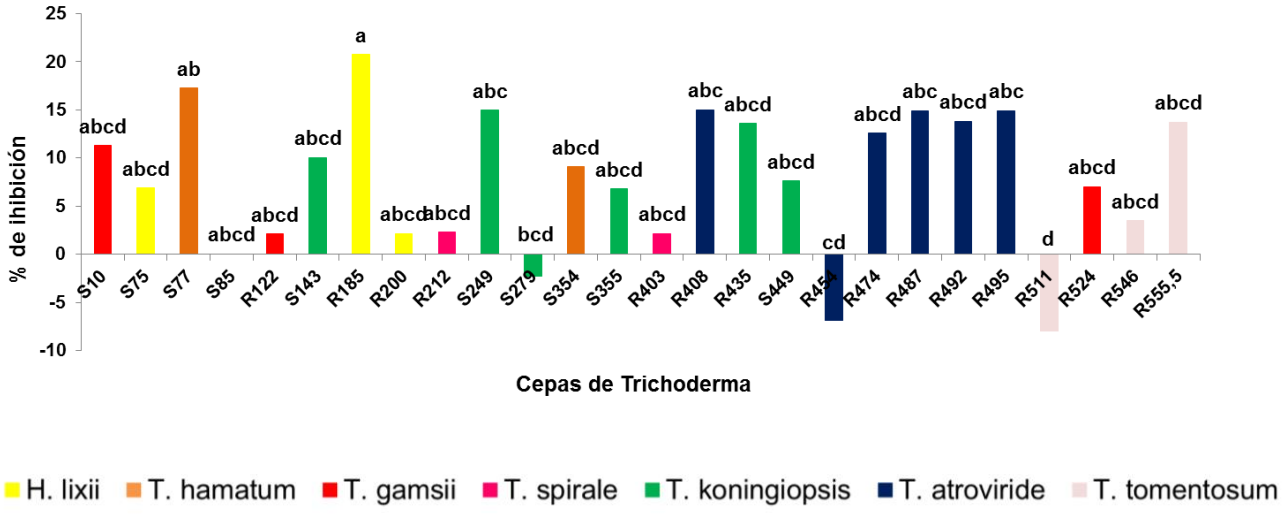

Figura No. 14. Efecto de las distintas cepas de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento de *Pyrenophora tritici-repentis* en la prueba de compuestos volátiles. Medias con distinta letra difieren significativamente (Tukey, p=0.05).

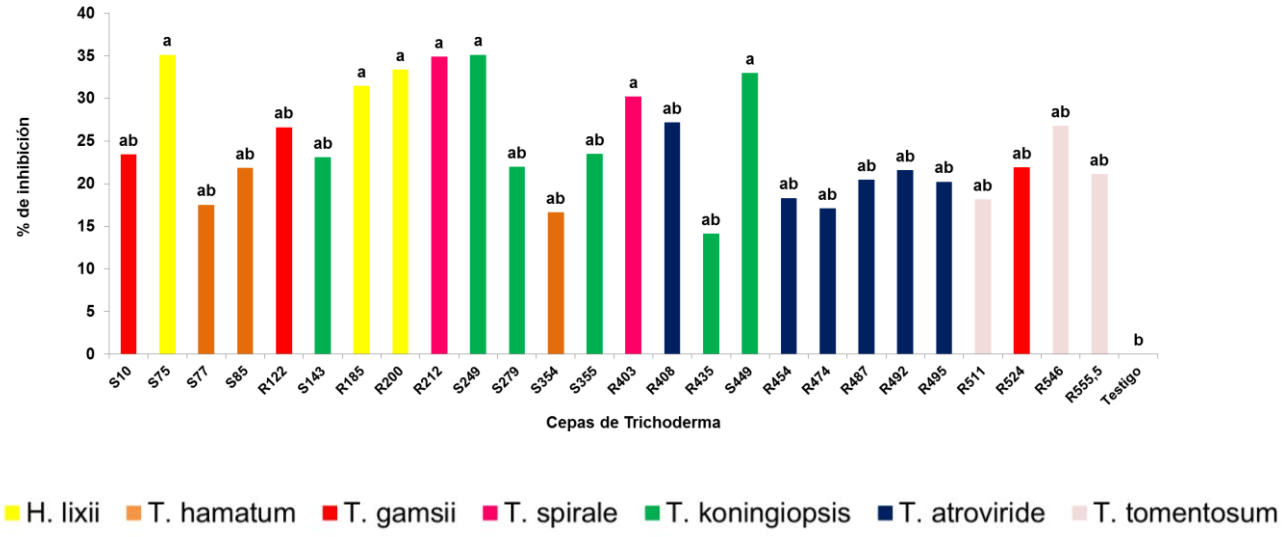

Figura No. 15. Efecto de las distintas cepas de *Trichoderma* inhibiendo el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* en la prueba de compuestos volátiles. Medias con distinta letra difieren significativamente (Tukey, p=0.05).

Por otra parte, mediante este ensayo puede comprobarse que *Trichoderma* spp. no solo actúa teniendo contacto directo con el patógeno, sino que lo hace a distancia mediante la producción de compuestos inhibitorios como metabolitos volátiles. La producción de metabolitos secundarios por *Trichoderma* depende de la cepa, e incluye metabolitos volátiles y no volátiles (Vinale et al., citados por Corallo, 2012). Los metabolitos volátiles tienen un efecto fungistático, y debilitan al patógeno haciéndolo más sensible a los antibióticos no volátiles (Kubicek et al. 1998, Druzhinina y Kubicek 2005, Martínez et al. 2013).

Los resultados obtenidos en los ensayos indicarían una menor sensibilidad de *P. tritici-repentis* a los metabolitos volátiles producidos por *Trichoderma* spp. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Dal Bello et al. (1997), quienes observaron una fuerte inhibición del crecimiento de *B. sorokiniana* y *P. tritici-repentis,* cuando fueron expuestos a una misma cepa de *Trichoderma*, siendo mayor el efecto antagónico sobre *B. sorokiniana*.

Los compuestos volátiles producidos por algunas cepas de *Trichoderma*, favorecieron el crecimiento de *P. tritici-repentis* en vez de inhibirlo (S279, R511 y R454) (Figura No. 14). Esto posiblemente es debido a los cambios en las

atmósferas internas de las placas de Petri en cuanto a la concentración de los gases como dióxido de carbono, el cual en altas concentraciones puede estimular el crecimiento y esporulación de determinadas especies de hongos fitopatógenos, en este sentido Dal Bello et al. (1997) encontraron resultados similares en ensayos de antagonismo con *Rhizoctonia solani* y *Alternaria citri* frente a *Trichoderma.*

Según Bell y Wheeler (1986), Decal y Melgarejo (1994), los metabolitos volátiles afectan el proceso de melanización de las colonias de los hongos fitopatógenos, impidiendo el oscurecimiento de las hifas y/o la formación de esclerocios, disminuyendo así el poder infectivo de los patógenos.

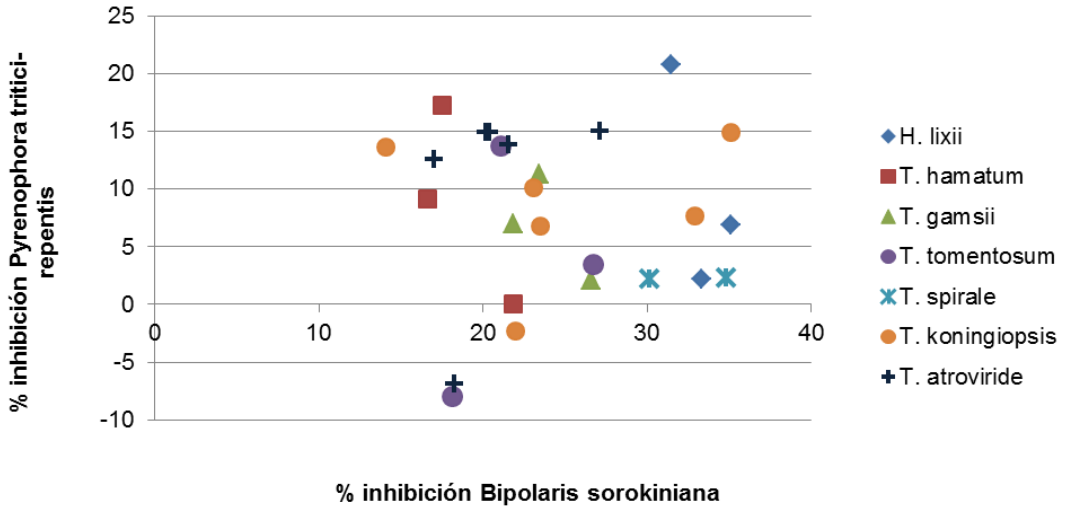

Figura No.16. Relación existente entre el % de inhibición de *Bipolaris sorokiniana* y el % inhibición de *Pyrenophora tritici- repentis* causado por distintas cepas de *Trichoderma* en prueba de compuestos volátiles.

No hubo una relación definida entre la inhibición del crecimiento de ambos patógenos en este ensayo (r^2=-0,00033), siendo en general muy limitado el efecto sobre ambos patógenos, principalmente *P. tritici-repentis* (Figura No. 16).

Se observaron modificaciones en las características morfológicas de las colonias de los patógenos, como por ejemplo decoloración. Dal Bello et al. (1997), encontraron cambios en la coloración de las colonias, y disminución en la formación de estructuras reproductivas, esclerocios y conidios, reduciendo así su eficiencia patogénica. En el mismo sentido, Reyes et al. (2008), sugieren que el antagonista excreta antibióticos volátiles con un efecto fungistático, que debilita al patógeno y lo hace más sensible a los metabolitos solubles, por lo que podría inferirse que el efecto combinado de ambos mecanismos lograría una sinergia tal que maximizaría el efecto inhibitorio del antagonista.

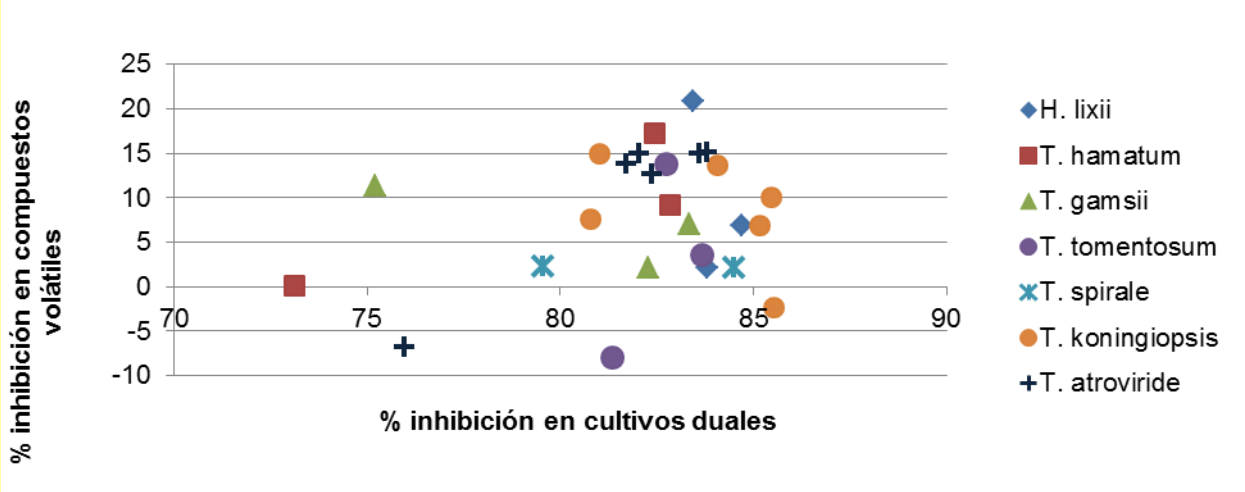

Figura No. 176. Relación existente entre la inhibición del crecimiento causada por distintas cepas de *Trichoderma* en las pruebas de cultivos duales y compuestos volátiles para *Pyrenophora tritici-repentis*. R^2=0,066.

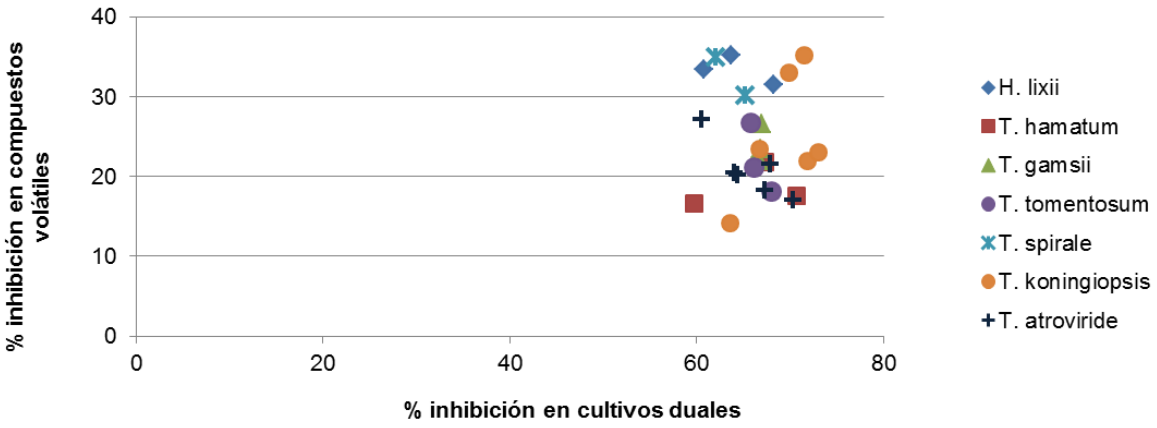

Figura No. 18. Relación existente entre la inhibición del crecimiento causada por distintas cepas de *Trichoderma* en las pruebas de cultivos duales y compuestos volátiles para *Bipolaris sorokiniana* r^2=0,10.

Trichoderma fue altamente eficiente como antagonista sobre ambos patógenos, existiendo poca variabilidad en los resultados para ambas pruebas, aunque la inhibición observada fue sensiblemente mayor en los cultivos duales en relación a compuestos volátiles. A su vez, no se encontró una relación entre la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. mediante la producción de compuestos volátiles y cultivos duales (Figuras No. 17 y 18), esto indicaría que los mecanismos de antagonismo son independientes.

4.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL PATÓGENO DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS SOLUBLES EN MEDIO LÍQUIDO

La capacidad antagónica de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos previo al contacto entre hifas se explica por la liberación al medio de metabolitos con poder fungistático, los cuales pueden inhibir el crecimiento de los patógenos sin necesidad de hacer contacto físico con ellos. Se presume que estas sustancias solubles son de carácter similar a antibióticos (Martínez y Solano, citados por Martínez et al., 2013). Estos antibióticos crearían zonas de inhibición donde el patógeno no lograría desarrollarse, pudiendo ser además consecuencia de la falta de nutrientes o de la presencia de ácidos producidos por los antagonistas (Sleesman y Leben, citados por Linhares, 1995).

La capacidad de inhibición de las cepas de *Trichoderma* para ambos patógenos fue bastante similar cuando se analizó el promedio de todas las cepas (30 y 33% para *P. tritici-repentis* y *B. sorokiniana*, respectivamente, Figuras No. 19 y 20). Sin embargo, se observó una gran variabilidad entre cepas, donde hay cepas que logran inhibir el 100% del crecimiento del patógeno (R474), mientras que en otros casos el antagonista no tiene ningún efecto sobre el crecimiento del patógeno (S75 para *B. sorokiniana* y R185 para *P. tritici-repentis*). Observándose incluso diferencias intraespecíficas, donde cepas pertenecientes a la misma especie tienen efectos contrastantes sobre el patógeno, como es el caso de *T. hamatum* (cepas S85 y S354) y *H. lixii* (cepas R524 y R185). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Sanmartín et al. (2012) en un ensayo donde utilizaron *Trichoderma asperellum* como antagonista de *Fusarium* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, quienes observaron diferencias inter e intra específicas en la capacidad antagónica de *T. asperellum*, donde los valores de inhibición de crecimiento para *Fusarium* sp. oscilaban entre 18, 2% y 4,6%; mientras que para *C. gloeosporioides*, los valores iban de 74% a 16, 1% para las mismas cepas estudiadas.

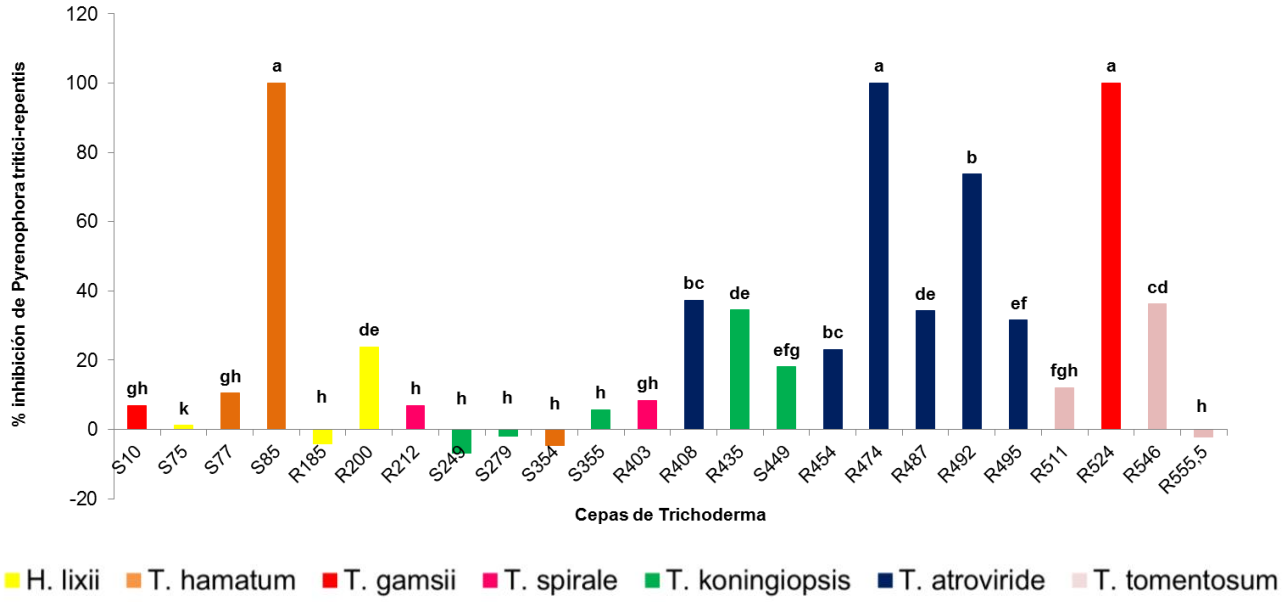

Figura No. 19. Capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma spp*. sobre *Pyrenophora tritici repentis* estimada mediante la producción de compuestos solubles. Medias con distinta letra difieren significativamente (Tukey p=0.05).

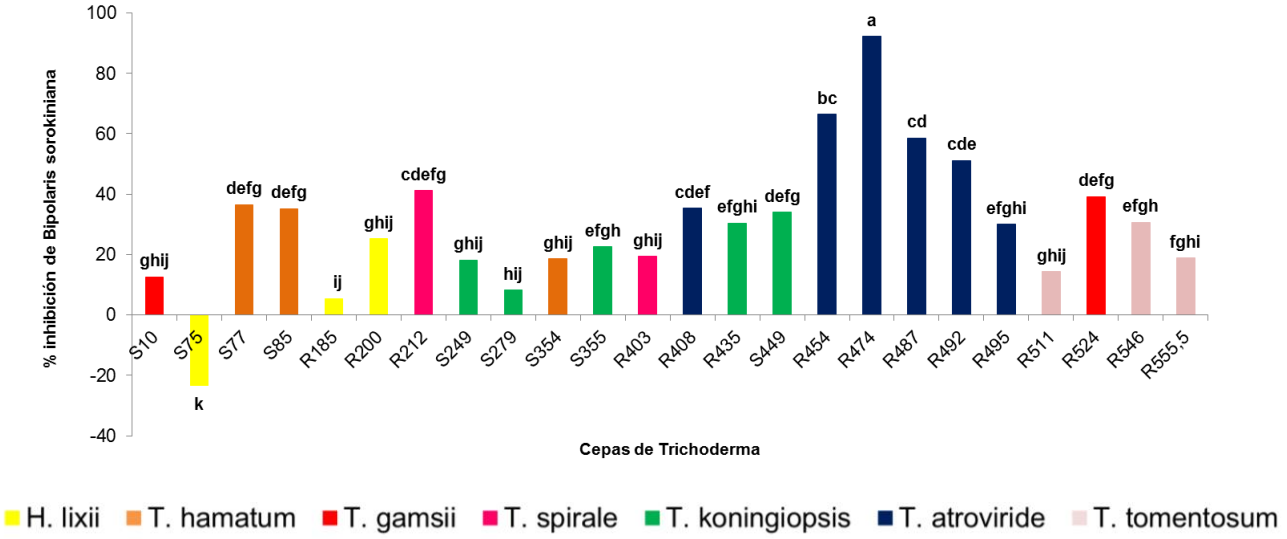

Figura No. 20. Capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris sorokiniana* mediante la formación de compuestos solubles. Medias con distinta letra difieren significativamente (Tukey p=0.05).

En el caso de *B. sorokiniana* la mayoría de las cepas de *Trichoderma* lograron reducir el crecimiento del patógeno, existiendo diferencias significativas entre las cepas. Frente a *B. sorokiniana* las cepas con mayor eficiencia de inhibición fueron R524 y R474, ambas también mostraron ser las más eficientes frente a *P. tritici-.repentis*. Aquí también se pueden observar diferencias intraespecíficas, como la observada para *T. gamsii* (S10 vs R524).

Trichoderma atroviride presentó una eficiencia variable entre las cepas frente a *P. tritici-repentis*. Una cepa de *T. atroviride* (R474) mostró alta capacidad antagónica frente a ambos patógenos, mientras que hay cepas que presentan los valores más bajos de inhibición en ambas situaciones (R495).

Linhares et al. (1995) clasificaron a las cepas de *Trichoderma* según el nivel de eficiencia por su capacidad para inhibir el crecimiento radial del patógeno en tres niveles:

-Eficientes (E): cepas que inhiben el crecimiento del patógeno entre un 80% y 100%.

-Moderadamente eficientes (M): Cepas que inhiben el crecimiento del patógeno entre un 51% a 79%.

-Ineficientes (I): aquellas cepas que no logran superar el 50% de inhibición del crecimiento del patógeno.

Cuadro No. 7. Nivel de eficiencia de las cepas de *Trichoderma* en la prueba de cultivos difusibles frente a *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*. E: eficiente, ME: medianamente eficiente, I: ineficiente.

Bipolaris sorokiniana				***Pyrenophora tritici-repentis***			
E	**ME**	**I**		**E**	**ME**	**I**	
R474	R492	S75	R200	R474	R492	S249	S77
	R487	R185	R495	R524		S354	R511
	R454	S279	R435	S85		R185	S449
		S10	R546			R555-5	R454
		R511	S449			S279	R200
		S249	S85			S75	R495
		S354	R408			R355	R487
		R555-5	S77			S10	R435
		R403	R524			R212	R546
		R355	R212			R403	R408

Para ambos patógenos, son pocas las cepas que logran un nivel de eficiencia aceptable, siendo sólo la cepa R474, la que mostró alta eficiencia ante ambos patógenos.

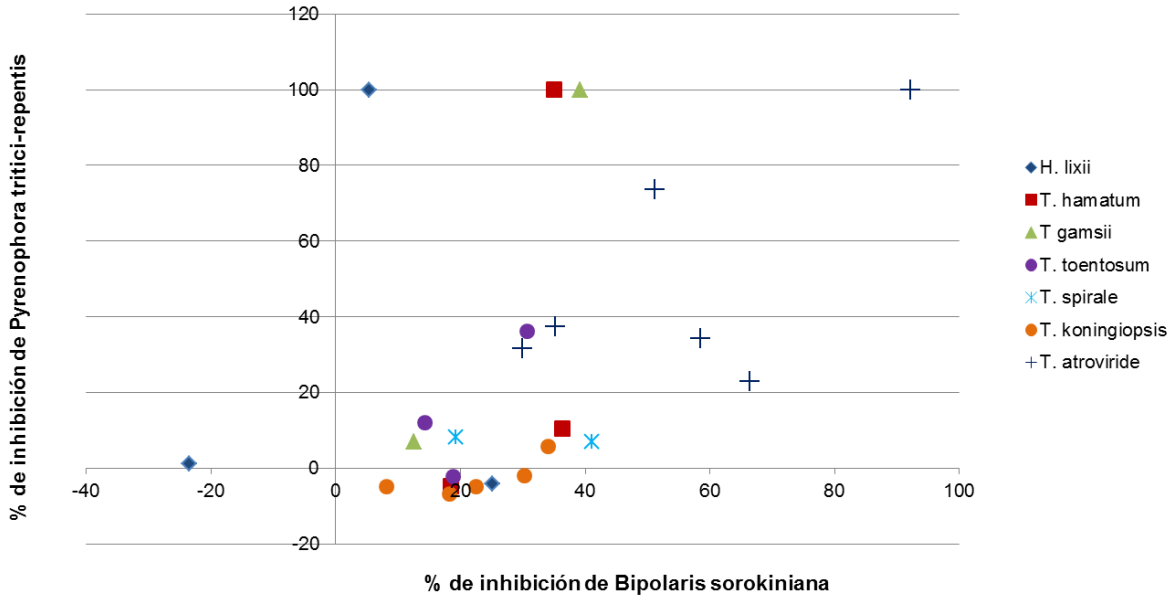

Figura No. 21. Relación entre el % de inhibición del crecimiento de *Pyrenophora tritici repentis* y *Bipolaris sorokiniana* determinada mediante la exposición de ambos patógenos a compuestos solubles producidos por distintas cepas de *Trichoderma.*

Para el caso de la prueba de compuestos solubles no hay relación clara entre la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a ambos patógenos (r^2=0,40), indicando un comportamiento diferencial de la acción antagónica de la cepa frente a los distintos patógenos (Figura No. 21). De todas maneras, hay cepas que presentan comportamiento similar frente a cada patógeno.

Hubo cepas de *Trichoderma* con alta eficiencia observada en cultivos duales y compuestos volátiles que no mostraron similar eficiencia mediante compuestos solubles, como por ejemplo la cepa S75 (Figuras No. 19 y 20). Al igual que en compuestos volátiles, no existe contacto directo entre las hifas de los hongos (Correa et al., 2007), siendo la inhibición por antibióticos el mecanismo de antagonismo actuante, difiriendo el origen de los mismos.

Reyes et al. (2008), sugieren que el antagonista libera antibióticos volátiles con un efecto fungistático, que debilita al patógeno y lo hace más sensible a los metabolitos solubles, por lo que podría inferirse que el efecto combinado de ambos mecanismos (producción de compuestos volátiles y de compuestos difusibles) lograría una sinergia tal que maximizaría el efecto inhibitorio del antagonista.

Los resultados obtenidos en las distintas pruebas indican una gran variabilidad en la eficiencia antagónica de las cepas según el mecanismo de acción que se trate y según la cepa a la que se enfrentan. Hay cepas que presentaron buena eficiencia frente a ambos patógenos, como es el caso de la S143 para cultivos duales, mostrando inespecificidad en su eficiencia. Por otro lado, hay cepas que presentan una eficiencia antagónica similar frente a un mismo patógeno independientemente del mecanismo de antagonismo que se evalúe, como es el caso de R555-5.

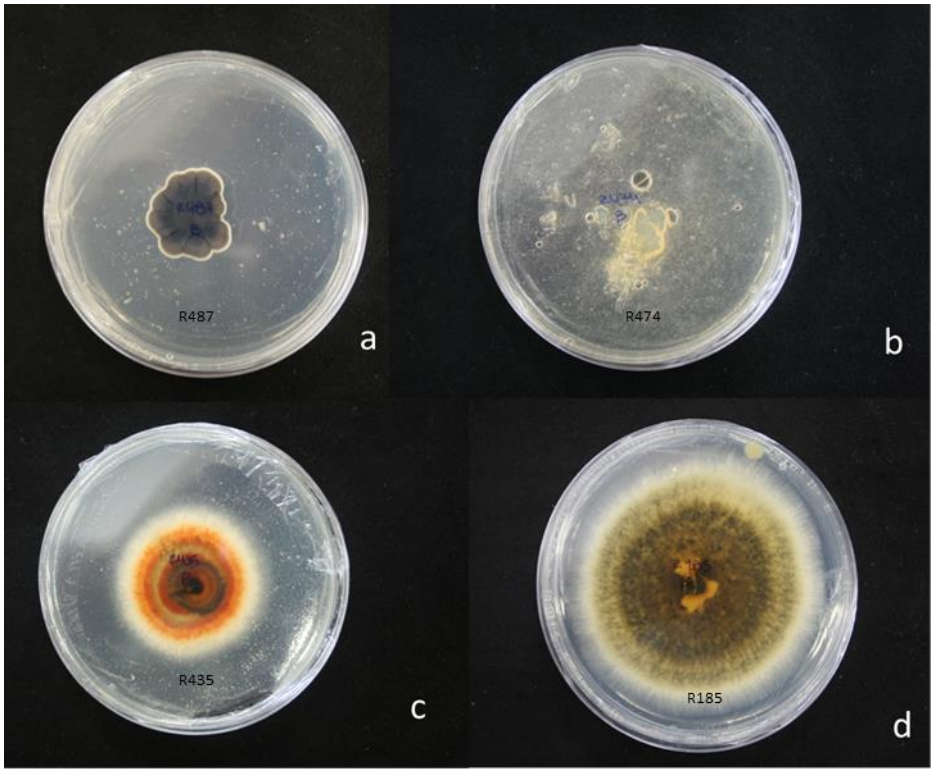

Figura No.22. Colonias de *Bipolaris sorokiniana* (a y b) y *Pyrenophora tritici-repentis* (c y d) creciendo en prueba de cultivos difusibles a los 7 días post-inoculación.

A modo de resumen se realizó un cuadro comparativo de los resultados obtenidos en las tres pruebas de antagonismo para ambos patógenos. Se ordenaron las cepas según su capacidad antagónica sobre ambos patógenos. Los resultados indican que la capacidad antagónica de las cepas fue muy variable dependiendo del patógeno objetivo y del mecanismo de acción evaluado. Esto evidencia, por un lado, la gran especificidad que hay entre la cepa del antagonista y el patógeno, y por el otro la eficiencia del mecanismo antagónico de cada cepa. Existen cepas que muestran niveles de antagonismo similares en las tres pruebas, como es el caso de R212 y R408 para *P. tritici-repentis*, y S143 y R555-5 para *B. sorokiniana*. También se encontraron cepas que siempre se mantienen en torno a un grado de eficiencia como antagonista determinado, tal es el caso de R435 y R474 para *P. tritici-repentis*, y R122 y R487 para *B. sorokiniana*. Por otro lado, se observan cepas como la S10 que para ambos patógenos y frente a todas las pruebas se mantiene siempre en los valores más bajos de efectividad.

Cuadro No. 8. Caracterización de la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* estudiadas frente a *Pyrenophora tritici-repentis*, según las distintas pruebas realizadas (cultivos duales, compuestos volátiles, compuestos solubles). Las letras indican eficiencia antagónica: A: alta, I: intermedia, B: baja, sd: sin datos.

Pyrenophora tritici-repentis	**Cultivos duales**	**Compuestos Volátiles**	**Compuestos solubles**
S10	B	I	B
S75	A	I	B
S77	I	A	I
S85	B	B	A
R122	I	B	sd
S143	A	I	sd
R185	I	A	A
R200	A	B	I
R212	B	B	B
S249	B	A	B
S279	A	B	B
S354	I	I	B
S355	A	I	B
R403	A	B	I
R408	A	A	A
R435	A	A	I
S449	B	I	I
R454	B	B	I
R474	I	I	A
R487	I	A	I
R492	B	A	A
R495	I	A	sd
R511	B	B	I
R524	I	I	A
R546	A	I	A
R555-5	I	A	B

Cuadro No. 9. Caracterización de la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* estudiadas frente a *Bipolaris sorokiniana*, según las distintas pruebas realizadas (cultivos duales, compuestos volátiles, compuestos solubles). Las letras indican eficiencia antagónica: A: alta, I: intermedia, B: baja, sd: sin datos.

Bipolaris sorokiniana	**Cultivos duales**	**Compuestos Volátiles**	**Compuestos solubles**
S10	I	B	B
S75	B	A	B
S77	A	I	I
S85	I	B	I
R122	A	I	sd
S143	A	A	sd
R185	A	I	B
R200	B	A	I
R212	B	B	A
S249	A	B	B
S279	A	A	B
S354	B	I	B
S355	I	A	I
R403	I	A	B
R408	B	A	A
R435	B	A	I
S449	A	B	I
R454	I	B	A
R474	A	I	A
R487	B	I	A
R492	I	B	A
R495	B	I	sd
R511	A	B	B
R524	I	I	A
R546	I	A	I
R555-5	I	I	I

5. CONCLUSIONES

Las cepas de *Trichoderma* estudiadas lograron inhibir el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana* y *Pyrenophora tritici-repentis*. La prueba de cultivos duales fue la que mostró los mejores resultados (mayor inhibición) para ambos patógenos, especialmente para *P. tritici-repentis*. De todas maneras existe una clara interacción entre patógeno-antagonista que define la eficacia de *Trichoderma* como agente de biocontrol mediante distintos mecanismos (competencia por el sustrato, antibiosis, microparasitismo). La evaluación mediante cultivos duales permitió una evaluación más integral de los distintos mecanismos de antagonismo de cada cepa.

Se observó una clara diferencia en la capacidad inhibitoria del crecimiento de los patógenos por parte de las distintas especies de *Trichoderma* evaluadas, destacándose la capacidad antagónica de *T. atroviride*. Además, se comprobó que distintas cepas de la misma especie lograron resultados muy variables en su acción antagónica, como se observó por ejemplo para *T. hamatum* (cepas S85 y S354).

A su vez, las distintas cepas presentaron distinta capacidad antagónica según el método utilizado. Estos resultados remarcan la importancia de realizar una caracterización mediante distintos métodos de forma de tener una estimación más completa de la misma.

Los buenos resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, presentan como promisorias a varias de las cepas de *Trichoderma* estudiadas, para una eventual evaluación de desempeño en condiciones de campo, mediante la formulación de un biofungicida que aporte al manejo integrado de las enfermedades.

La variabilidad inter e intra específica de las cepas de *Trichoderma*, sus mecanismos de acción, la relación patógeno-antagonista, sugieren que para la formulación de fungicidas biológicos se debería tener en cuenta más de una cepa de *Trichoderma*, de modo de complementar mecanismos de acción frente a los patógenos, así como adaptación y desarrollo en el ambiente, lo que determinará su eficacia.

6. RESUMEN

La mancha amarilla y la mancha borrosa son dos de las enfermedades más importantes en cereales de invierno causando pérdidas en rendimiento y disminución en la calidad de los granos. La siembra directa y el largo insuficiente de rotación de cultivos, han llevado a un aumento en los niveles de enfermedades en los cultivos de invierno (trigo y cebada), con un sustancial incremento del uso de fungicidas con el objetivo de disminuir la interferencia de las enfermedades sobre la producción. Urge la necesidad de buscar alternativas que reduzcan la presión de inóculo de los patógenos, que permitan un uso más eficiente de los recursos productivos. Es en este marco donde el uso de biocontroladores como *Trichoderma* podría aportar a reducir el inóculo de patógenos necrótrofos sobreviviendo en los rastrojos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de distintas cepas de *Trichoderma* frente a los patógenos *Pyrenophora tritici repentis* y *Bipolaris sorokiniana*. El potencial antagónico de las distintas especies de *Trichoderma* contra ambos patógenos fue determinado en pruebas de cultivos duales, producción de compuestos volátiles, y producción de compuestos solubles, en condiciones controladas de laboratorio. Todas las cepas de *Trichoderma* estudiadas en condiciones *in vitro* presentaron capacidad antagónica de forma significativa, difiriendo la eficacia según el método de evaluación *in vitro* realizado. No se observó una relación clara entre la capacidad antagónica entre las distintas pruebas, evidenciando el involucramiento de distintos mecanismos o compuestos según el método utilizado. Los resultados sugieren que *Trichoderma* spp. tiene un alto potencial para ser utilizado como agente de biocontrol, por lo cual deberá estudiarse si estos mecanismos son efectivos en condiciones de campo, lo cual podría resultar como una nueva alternativa de manejo a integrar al resto de las medidas utilizadas.

Palabras clave: Control biológico; Enfermedades foliares; Trigo.

7. SUMMARY

Tan spot and spot blotch are two of the most important diseases on winter cereals, causing loss of yield and decreased grains quality. Production systems under no-till and inappropriate crop rotation have led to a substantial increase of leaf diseases of winter crops (wheat and barley), increasing therefore the use fungicides to control these diseases. Thus, the screening for alternative methods of disease control is highly needed. Biological control agents like *Trichoderma* could colonize plant residues and antagonize plant pathogens surviving on that substrate, reducing the inoculum pressure. The aim of this study was to evaluate *in vitro* antagonistic ability of several strains of *Trichoderma* against *Pyrenophora tritici repentis* and *Bipolaris sorokiniana*. The antagonistic capacity of *Trichoderma* strains against the pathogens was tested on different *in vitro* technics, such as dual culture, volatile compounds production, and soluble comppound production. All *Trichoderma* strains analyzed *in vitro* conditions showed significant antagonistic ability, differing according to the test. There were no correlation among antagonistic capacity determined among different tests, most probable explained by the involvement of different mechanisms of action measured in each test. Results suggest that *Trichoderma* spp. has a high potential to be used as a biocontrol agent, however further investigation is needed to evaluate its effectiveness under field conditions, and its potential as an emerging alternative to incorporate to the rest strategies in the integrated diseases management.

Keywords: Biological control; Leaf diseases; Wheat.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. 2006. Fitopatología. México, Limusa. 838 p.

2. Altieri, M.; Nicholls, C. I. 2000. Agroecología. Teoría y práctica para una agricultura sustentable. (en línea). México, D. F., PNUMA. 257 p. (Serie de textos básicos para la formación ambiental). Consultado dic. 2011. Disponible en http://www.ambiente.gov.ar/infotecaea/descargas/altieri01.pdf

3. Amboya, M. T. 2012. Evalución de tres frecuencias de aplicación de *Trichoderma harzianum* como estimulador decrecimiento en el cultivo de rosa (*Rosa* spp var. *limbo*). (en línea). Tesis Ing. Agr. Riobamba, Ecuador. Facultad de Ingenería Agronómica. Escuela Politécnica Superior de Chimborazo. 74 p. Consultado dic. 2012. Disponible en http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2196/1/13T0741%20AMBOYA%20MESIAS.pdf.

4. Amin, A. W.; Haggag, W. M. 2001. Efficiency of *Trichoderma* species on control of Fusarium-rot, Root know and *Reniforum* nematodos disease complex on sunflower. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4(3): 314-318.

5. Andrade, C. 2012. Evaluación del efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* para el control de la marchitez de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en las localidades de Cevallos y Pillaró, provincia de Tungurahua. (en línea). Tesis Ing. Agrónomo. Riobamba, Ecuador. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Agronómica. 103 p. Consultado ene. 2013. Disponible en http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Q9VIj-7zWf0J:dspace.espoch.edu.ec/bitstream/handle/123456789/2207/13T0752%2520ANDRADE%2520CLAUDIA.pdf%3Fsequence%3D1+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=uy

6. Arbeletche, P.; Ernst, O.; Hoffman, E. 2010a. La agricultura en Uruguay y su evolución. (en línea). In: Intensificción agrícola, oportunidades y amenazas para un país productivo y natural. Tradinco, Montevideo. pp. 13-28. Consultado jun. 2011. Disponible en https://www.google.com.uy/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBwQFjAAahUKEwjwgLqvsqLIAhXF2R4KHSZUCzo&url=http%3A%2F%2Fwww.csic.edu.uy%2FrenderResource%2Findex%2FresourceId%2F23116%2FsiteId%2F3

&usg=AFQjCNEObe2E_zLNUIrJIRjR0o6k7KZpuw&sig2=YkoUCl-Gtdx4qT5oTtQbIQ

7. _____.; Gutiérrez, G. 2010b. Crecimiento de la agricultura en Uruguay: exclusión social o integración económica en redes. (en línea). Pampa. 6: 113-138. Consultado mar. 2011. Disponible en https://www.google.com.uy/search?q=Crecimiento+de+la+agricultura+en+Uruguay%3A+exclusi%C3%B3n+social+o+integraci%C3%B3n+econ%C3%B3mica+en+redes&oq=Crecimiento+de+la+agricultura+en+Uruguay%3A+exclusi%C3%B3n+social+o+integraci%C3%B3n+econ%C3%B3mica+en+redes&aqs=chrome..69i57.667j0j9&sourceid=chrome&es_sm=93&ie=UTF-8#

8. Baker, K.; Cook, R. 1974. Biological control of plants pathogens. San Francisco, USA, Freeman. 433 p.

9. _____.; _____. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, MN, USA, The American Phytopathological Society. 539 p.

10. Benítez, T.; Rincón, A.; Limón, M.; Condón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. (en línea). International Microbiology. 7 (4): 249-260. Consultado jun. 2012. Disponible en http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sciarttext

11. Bettiol, W. 2006. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos. (en línea). Fitosanidad. 10 (2):85-98. Consultado ene. 2012. Disponible en http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116102001.pdf

12. Bora, M. 2013. How much we know about *Trichoderma*. (en línea). Seminare of postgraduate student Msc. (Agri.). Jorhat, India. Assam Agricultural University. 28 p. Consultado jul. 2013. Disponible en http://es.scribd.com/doc/153390114/How-much-we-know-about-*Trichoderma*#scribd

13. Bourguignon, E. 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. Tesis PhD. Canterbury, New Zealand. Lincoln University. National Centre for Advanced Bio-Protection Technologies. 252 p.

14. Cabrera, M. 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo. Tesis de maestría en Bioteconología. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 90 p.

15. Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas, micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp.; una revisión. (en línea). Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica. 14 (2): 15-31. Consultado mar. 2012. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262011000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=es.

16. Cevallos, S. E.; Vivas, L. 2010. Estudios de eficacia de *Trichoderma* cepa G008 sobre el complejo "marchitez del tomate" (lycopersicon esculentum mill). (en línea). Proyecto de tesis. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias. 66 p. Consultado ene. 2012. Disponible en http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/965

17. Chet, I.; Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology. 48: 37-43.

18. _____.; Benhamou, N.; Haran, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. . In: Harman, G. E.; Kubicek, C. P. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, Taylor and Francis. v.2, pp. 153–172.

19. Corallo, B. 2012. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. antagonistas del patógeno de sorgo *Fusarium nygamai*. (en línea). Tesis Licenciatura en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 40 p. Consultado mar. 2013. Disponible en https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1392/1/uy24-16049.pdf

20. Correa, S.; Mello, M.; Ávila, Z. R.; Minaré, L.; Pádua, R. R.; Gomes, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de sclerotium rolfsii sacc. (en línea). Revista Fitosanidad. 11 (1): 3-9. Consultado dic. 2012. Disponible en http://www.inisav.cu/fitosanidad/2007/Revista%201-07.pdf#page=3.

21. Cruz, L. C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. (en línea). Tesis Microbiología industrial. Bogotá, Colombia. Universidad Javerina. Facultad de Ciencias. 148 p. Consultado jun. 2011. Disponible en http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8237/1/tesis23.pdf

22. Dal Bello, G. M.; Mónaco, C. I.; Cháves, A. R. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. (en línea). Revista Iberoamericana de Micología. 14: 131-134. Consultado dic. 2013. Disponible en http://bddoc.csic.es:8080/detalles.html?tabla=docu&bd=ICYT&id=118809.

23. Dewan, A.; Sivasithamparam, K. 1988. Identity and frequency of occurence of *Trichoderma* spp. in roots of wheat and rye-grass in Western Australia and their effect on root rot caused by *Gaeumannomyces graminis var. tritici.* Plant and Soil. 109: 93-101.

24. Díaz, R. 2009. Luego de cuatro siglos…somos un país agrícola. Revista INIA. no. 20: 31-34.

25. Díaz de Ackermann, M. 1995. Mancha foliar de trigo causada por *Mycospharella graminícola* (Fuckel) Schroeter estado perfecto de *Septoria tritici* Rob. Ex DEsm. In: Curso de Actualización de Enfermedades de Cereales de Invierno y Pasturas (1995, La Estanzuela, Colonia). Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. Montevideo, INIA. pp. 43-62.

26. _____2011a. Mancha parda o amarilla del trigo. (en línea). In: Díaz de Ackermann, M.; Cabrera, K.; Germán, S.; Pereyra, S. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. (en línea). Montevideo, INIA. pp. 95-110 (Serie Técnica no. 189). Consultado dic. 2013. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429160911193955.pdf

27. _____.; Cabrera, K.; Germán, S.; Pereyra, S. eds. 2011b. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. (en línea). Montevideo, INIA. 208 p. (Serie Técnica no. 189). Consultado jun. 2011. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429160911193955.pdf

28. Druzhinina, I. S.; Kubicek, C. P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea;* from aggregate species to species clusters? (en línea). Journal of Zhejiang University Science B. 6 (2): 100-112. Consultado nov. 2011. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389624/

29. Ernst, O.; Siri-Prieto, G. 2011. La agricultura en Uruguay; su trayectoria y consecuencias. In: Simposio Nacional de Agricultura (2º., 2011, Paysandú, 2011). No se llega si no se sabe a dónde ir Montevideo, Hemisferio Sur. pp.149-163.

30. _____. 2013. Zonas agrícolas en expansión; desarrollo de herramientas para un manejo sustentable de los sistemas de producción. (en línea). Montevideo, INIA. 32 p. (Serie FPTA no. 50). Consultado jun. 2013. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/fpta%2050_2013.pdf

31. Ezziyani, M.; Requena, M. E.; Pérez-Sánchez, C.; Egea-Gilabert, C.; Candela, M. E. 2003. Mecanismos de biocontrol de la "tristeza" del pimiento (*Capsicum annuum L*.) por microorganismos antagonistas. In: Reunión de la Sociedad Española (15°), Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal (8°, 2003, Badajoz). Actas. s.n.t. p. 243.

32. _____.; Requena, M. E.; Pérez-Sánchez, C.; Ahmed, A. S.; Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 26: 35-45.

33. Fajardo, P.; Guzmán, A. M. 2012. Cultivo *In Vitro* de *Trichoderma* spp. y su antagonismo frente a hongos fitopatógenos. (en línea). Quito, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. 19 p. Consultado dic. 2012. Disponible en http://www.engormix.com/MA-agricultura/cultivos-tropicales/articulos/hongo-trichoderma-spp-t3600/078-p0.htm

34. FAO. 2000. Manual de prácticas integradas de manejo y conservación de suelos. (en línea). Roma. 220 p. (FAO. Boletín de Tierras y Aguas no. 8). Consultado jun. 2011. Disponible en ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/lw8s.pdf

35. Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. (en línea). Manejo Integrado de Plagas. no. 62: 96 – 100. Consultado jun. 2012. Disponible en http://www.sidalc.net/repdoc/A2120E/A2120E.

36. Ferraris, G. N.; Faggioli, V. s.f. Inoculación con microorganismos con efecto promotor de crecimiento; conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina. (en

línea). Marcos Juárez, INTA. 19 p. Consultado ene. 2012. Disponible en http://inta.gob.ar/documentos/inoculacion-con-microorganismos-con-efecto-promotor-de-crecimiento.-conocimientos-actuales-y-experiencias-realizadas-en-la-region-pampeana-argentina/at_multi_download/file/inta_microorganismos_13.pdf

37. Gamba, F. 2011. La variabilidad de los patógenos causantes de manchas foliares en cebada y su implicancia en el manejo. (en línea). In: Díaz de Ackermann, M.; Cabrera, K.; Germán, S.; Pereyra, S. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. (en línea). Montevideo, INIA. pp. 129-138 (Serie Técnica no. 189). Consultado dic. 2013. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429160911193955.pdf

38. Gao, L.; Sun, M. H.; Liu, X. Z.; Che, Y. S. 2006. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. (en línea). Mycological Research. 111: 87- 92. Consultado ago. 2012. Consultado ago. 2012. Disponible en http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756206002607

39. García-Préchac, F.; Ernst, O.; Arbeletche, P.; Pérez-Bidegain, M.;Pritshch, C.; Ferenczi, A.; Rivas, M. 2010. Intensificación agrícola; oportunidades y amenazas para un país productivo y natural. (en línea). Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. CSIC. 126 p. Consultado abr. 2012. Disponible en http://portal.fagro.edu.uy/index.php/documentos/category/8-documentos.html

40. Germán, S.; Pereyra, S.; Díaz, M. 2009. Consideraciones sobre enfermedades de cultivos de secano en la coyuntura agropecuaria actual. Revista INIA. no. 17: 63-67.

41. Gilbert, J.; Inch, S. 2007. Effect of *Trichoderma harzianum* on perithecial production of *Gibberella zeae* on wheat straw. Biocontrol Science and Technology. 17(5/6): 635-646.

42. González, G. R. 2001. Evaluación in vitro del efecto inhibitorio de *Trichoderma longibrachiatum* sobre *Phytopthora capsici* agente causal de la marchitez del pimiento (*Capsicum annum*). (en línea). Tesis de grado. Talca, Chile. Univerisad de Talca. Facultad de

Ciencias Agrarias. 76 p. Disponible en http://dspace.utalca.cl:8888/ciencias_agrarias/gonzalez_silva.pdf

43. González, I.; Infante, D.; Pereira, B.; Martínez, B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, I. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. Expresión de actividad quitinasa. (en línea). Revista Protección Vegetal. 25 (1): 23-53. Consultado jun. 2011. Disponible en http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n1/rpv11110.pdf

44. Guédeza, C.; Cañizaleza, L.; Castilloa, 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 ene. 2013. Disponible en http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v32n1/art09.pdf

45. Guigón, C.; Guerrero, V.; Vargas, F.; Carvajal, E.; Ávila, G. D.; Bravo, L.; Ruocco, M.; Lanzuise, S.; Woo, S.; Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología. 28(2): 87-96. Consultado dic. 2011. Disponible en http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a2.pdf

46. Harman, G. E.; Kubicek, C. P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, Taylor and Francis. v.1, 278 p.

47. _____.; Petzoldt, R.; Comis, A.; Chen, J. 2004a. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology. 94: 147-153.

48. _____.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, A.; Lorito, M. 2004b.*Trichoderma* species---opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review of Microbiology. 2: 43-56.

49. _____. 2006. Overview of mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96:190-194.

50. Haugaard, H.; Lyngs Jorgensen, H. J.; Lyngjjaer, M. F.; Smedegaard-Petersen, V.; Collinge, D. B. 2001. Control of *Blumeria graminis*

f.sp. *hordei* by treatment with mycelial extracts from cultured fungi. Plant Pathology. 50: 552-560.

51. Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 90:248-252.

52. _____. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Biological Control. 92:177-180.

53. _____. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases; the history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87 (1): 4-10.

54. Hoyos-Carvaja, L.; Chaparro, P.; Bramsky, 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 jun. 2012. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99652008000300010&script=sci_arttext

55. Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. (en línea). Revista de Protección Vegetal. 24 (1): 14-21. Consultado jun. 2012. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext

56. Kleifeld, O.; Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response (en línea). Plant and Soil. 144 (2) 267-272. Consultado ene. 2012. Disponible en http://link.springer.com/article/10.1007/BF00012884

57. Kubicek, C. P.; Penttilä, M. E. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Harman, G. E.; Kubicek, C. P. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, Taylor and Francis. v.2, pp. 49–71**.**

58. _____.; Komon-Zelazowska, M.; Druzhinina, I. S. 2008. Fungal genus *Hypocreal Trichoderma;* from barcodes to diversity. (en línea). Journal of Zhejiang University Science B. 9 (10): 753-763. Consultado ago. 2013. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2565738/

59. Lavelle, P.; España, A. V. 2001. Soil ecology. Dordretch, DE, Kluwer. 678 p.

60. Li, G. Q.; Huang, H. C.; Acharya, S. N.; Erickson, R. S. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. Plant Disease. 88:1246-1251.

61. Lipps, E. P.; Deep, I. W. 1991. Influence of tillage and crop rotation on yield, satlk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. Plant Disease. 75:828-833.

62. López, C. J.; Pérez, R. M.; Llobel, A.; Monte, E.; Zea, T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. Revista Chapingo Serie Horticultura. 5: 261-265.

63. Lorito, M.; Woo, S. L.; Harman, G. E.; Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*; from 'omics to the field. Annual Review of Phytopathology. 48:19.1–9.23.

64. Mao, W.; Lewis, J. A.; Hebber, P. K.; Lumsden, R. D. 1997. Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium.* Plant Disease. 81:450-454.

65. Martín, V., 2001. Selección de levaduras nativas de uva con capacidad antagónica frente a *Botrytis cinerea.* Tesis Licenciado en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química. 49 p.

66. Martínez, B.; Fernández, L.; Solano, T. 1994. Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azúcar, tomate y tabaco. Cultivos Tropicales. 15 (3): 54

67. _____.; 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). Protección vegetal. 23 (2): 118-125. Consultado ago. 2013. Disponible en http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v23n2/rpv09208.pdf

68. _____.; _____.; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. (en línea). Protección Vegetal. 28 (1): 1-11. Consultado ene. 2014. Disponible en http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf

69. Martino, D. L. 1999. Propiedades físicas del suelo que afectan el desarrollo vegetal. (en línea). In: Morón, A.; Martino, D.; Sawchik, J. eds. Manejo y fertilidad de los suelos. Montevideo, INIA. pp. 101-105 (Serie Técnica no. 76). Consultado dic. 2011. Disponible en https://www.google.com.uy/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBsQFjAAahUKEwjcvLDJtKLIAhUBGh4KHSeNC70&url=http%3A%2F%2Fwww.ainfo.inia.uy%2Fdigital%2Fbitstream%2Fitem%2F2981%2F1%2F111219240807135249.pdf&usg=AFQjCNFcjNUUbTVgJRBVis4NiUnQw7Py_A&sig2=E6Ng6rm4vLubBl1ZWim3ZA&bvm=bv.104226188,d.dmo

70. Mata, G.; Savoie, J. M. 2003. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. (en línea). Mycologia. 95 (2): 191-199. Consultado oct. 2011. Disponible en http://www.mycologia.org/content/95/2/191.full.pdf+html

71. Michel, A. C.; Rebolledo, O.; Lezama, R.; Ochoa, M. E.; Mesina, J. C.; Samuels, G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por "Escoba de bruja" y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología 19(2): 154–160. Consultado ene. 2011. Disponible en http://www.researchgate.net/profile/Roberto_Lezama-Gutierrez/publication/237037404_Especies_de_*Trichoderma*_en_Suelos_Cultivados_con_Mango_Afectados_por_Escoba_de_Bruja_y_su_Potencial_Inhibitorio_sobre_Fusarium_oxysporum_y_F._subglutinans/links/0046352cac31b36fd7000000.pdf

72. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2009. Anuario estadístico agropecuario 2009. (en línea). Montevideo. 246 p. Consultado dic. 2011. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/Diea/Anuario2009/pages/DIEA-Anuario-2009-cd_081.html

73. Mónaco, C.; Sisterna, M.; Perelló, A.; Dal Bello, G. 2004. Preliminary studies on biological control of the blckpoint complex of wheat in Argentina. (en línea). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 285-290. Consultado mar. 2013. Disponible en http://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3AWIBI.0000023835.05701.10#page-1

74. Mondino, P. s.f. Control biológico de enfermedades de plantas. (en línea). In: Bases conceptuales para el manejo ecológico de plagas y enfermedades. s.n.t. pp. 198-205. Consultado jun. 2011.Disponible en http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/publica/Control%20Biologico%20enfermedades%20de%20plantas%20libro%20.pdf

75. _____.; Vero, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. Unidad de Educación Permanente. 158 p.

76. Moratto, C.; Martínez, L. J.; Valencia, H.; Sánchez, J. 2005. Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). (en línea). Agronomía Colombiana. 23 (2): 299-309. Consultado jun. 2012. Disponible en http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99652005000200015&script=sci_arttext&tlng=pt

77. Muñoz, C.; Virgen, G.; Herrera, A.; Olalde, V. 2001. Introducción de agentes de control biológico de *Rhizoctonia solani* en suelos solarizados o encalados en condiciones de invernadero. Manejo Integrado de Plagas. 50: 10-14.

78. Ochoa, M. E. 2002. Antibiosis y microparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (*Hypomycetes:Hyphales*), sobre Mycospharella fijensis (*Loculoascomycetes:Dothideales*). Tesis de Maestría. Colima, México. Universidad de Colima. 102 p.

79. Ousley, M. A.; Lynch, J. M.; Whipps, J. M. 1994. Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. (en línea). Biology and Fertility of Soils. 17: 85–90. Consultado ene. 2012. Disponible en http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00337738

80. Ozbay, N.; Newman, S. E. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. (en línea). Pakistan Journal of Biological Sciences. 7 (4): 478-484. Consultado dic. 2011. Disponible en http://ghex.colostate.edu/pdf_files/b_htnhnq2s.pdf

81. Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium;* biology, ecology, and otential for biocontrol. (en línea). Annual Review of Phytopathology. 23: 23-54. Consultado dic. 2011. Disponible en

http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.py.23.090185.000323

82. Perelló, A. E.; Mónaco, C.; Simóm, M. R.; Sisterna, M.; Dal Bello, G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichdoerma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. Crop Protection. 22: 1099-1106.

83. _____.; _____.; Moreno, M. V.; Cordo, C. A.; Simón, M. R. 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycospharella graminicola*) of wheat Ander field conditions in Argentina. Biocontrol Science and Technology. 16 (8): 803-813.

84. Pereyra, S. 1996. Estrategias para el control químico de enfermedades en cebada. Montevideo, INIA. 20 p. (Boletín de Divulgación no. 57).

85. _____.; Garmendia, G.; Cabrera, M.; Vero, S.; Pianzzola, M.; Dill-Macky, R. 2005. Control bilógico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. (en línea). Agrociencia (Montevideo). 9 (1-2): 337 – 343. Consultado may. 2012. Disponible en http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/viewFile/313/241

86. _____.; Díaz, M. 2011. Herramientas para el manejo de enfermedades en trigo. (en línea). In: Jornada de Divulgación (2011, Durazno, UY). Aportes a la zafra de cultivos de invierno. Montevideo, INIA. pp. 23-31 (Actividades de Difusión no. 646). Consultado ago. 2013. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/112761070611133707.pdf.

87. _____.; Germán, S. 2012. Manejo de enfermedades de trigo y cebada en un contexto de márgenes reducidos. (en línea). Montevideo, INIA. pp. 15-25 (Actividades de Difusión no. 677). Consultado ago. 2013. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/112761020512125213.pdf.

88. Pérez, C. 1998. Importancia del rastrojo en la sanidad de los cultivos de invierno. Cangüé. no. 13: 30-36.

89. _____. 2004. Manejo sanitario de cereales de invierno; algunas consideraciones epidemiológicas. Cangüé. no. 23: 34-38.

90. _____.; Villar, A. 2011. Control biológico en cultivos extensivos; cuando el enfoque condiciona al éxito. (en línea). In: Díaz de Ackermann, M.; Cabrera, K.; Germán, S.; Pereyra, S. eds. Manejo de enfermedades en trigo y cebada. (en línea). Montevideo, INIA. pp. 63-74 (Serie Técnica no. 189). Consultado dic. 2013. Disponible en : http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429160911193955.pdf

91. Rai, B.; V. N. Singh. 1980. *Trichoderma viride* as a mycroparasite of *Aspergillus* spp. (en línea). Plant and Soil. 57 (1): 131-135. Consultado dic. 2011. Disponible en http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02139649#page-1

92. Reyes, R. A.; Barranco, B.; Gracia, G.; Jiménez, G. 2002. Actividad in vivo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. (en línea). Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 66: 45-48. Consultado ene. 2012. Disponible en http://www.sidalc.net/REPDOC/A2014E/A2014E.PDF

93. Romero, O.; Huerta, M.; Damián, M. A.; Domínguez, F.; Arellano, D. A. 2012. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología. 11 (2): 143-151. Consultado mar. 2011. Disponible en http://www.redalyc.org/pdf/776/77613172015.pdf

94. Rossi, C. 2010. Evaluación de *Trichoderma harzianum* como agente biopromotor y de biocontrol en plantines de *Eucalyptus dunnii* Maiden. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 120 p.

95. Saavedra, C. 2011. Un siglo de agricultura. (en línea). Revista del Plan Agropecuario. no. 137:46-49. Consultado ene. 2012. Disponible en http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R137/R_137_46.pdf

96. Sanmartín, P.; López, X.; Pemberthy, M. P.; Granada-Sinar, D.; Rueda-Lorza, E. A. 2012. Análisis del modelo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. (en línea). Revista Tumbaga. 2 (7): 29-49. Consultado oct. 2015. Disponible en http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/36/353

97. Santander, A. J. 2012. Uso de *Trichoderma harzianun* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de (*Colletotrichum gloeosporioides Pens*.) causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica L*.). (en línea). Tesis de maestría en Agronomía. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 100 p. Consultado jun. 2012. Disponible en http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/3595/1/T026800003843-0-TrabajoFINALAprobado-000.pdf.

98. Silva, M. P. 2011.Variabilidad patogénica, diversidad genética y estructura poblacional de *Cochliobolus sativus*, agente causal de la mancha borrosa de la cebada. (en línea). Tesina para optar por el grado en Lic. en Ciencias Biológicas. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 103 p. Consultado oct. 2012. Disponible en https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1357/1/uy24-15407.pdf.

99. Souto, G. 2009. Trigo y derivados; situación y perspectivas. Cereales de invierno; mercados externos y situación nacional. (en línea). Anuario 2009 OPYPA 119-130. Consultado ago. 2012. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/opypapublicaciones/ANUARIOS/Anuario2009/material/pdf/10.pdf.

100. _____. 2011. Impactos del cultivo de soja en el Uruguay. Cambios en el manejo de la tierra y el uso de agroquímicos. (en línea). s.l., REDES (Red de Ecología Social). 14 p. Consultado jul. 2012. Publicación en línea. Disponible en http://www.redes.org.uy/2011/12/19/impactos-del-cultivo-de-soja-en-uruguay/

101. Stewart, S.; Pereyra, S.; Díaz De Ackerman, M. 2001. Manchas foliares de trigo y cebada en siembra directa; conceptos y estrategias de control. (en línea). Montevideo, INIA. 30 p. (Documento online no. 36). Consultado jun. 2012. Disponible en http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219230807115634.pdf.

102. _____.; _____.; _____. 2004. El efecto de la intensificación agrícola en las enfermedades de los cultivos. In: «Sustentabilidad de la intensificación agrícola en el Uruguay» (2004, Mercedes). Resúmenes del simposio. Actividades de Difusión 365. Montevideo, INIA. pp. 19 - 24.

103. Tijerino, A. 2010. Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum.* Tesis PhD. Salamanca, España. Universidad de Salamanca. 211 p.

104. Tovar, J. C. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista *in vivo* de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizotocnia solana*. Tesis de Ing. Agr. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias. 81 p.

105. Uruguay XXI. Departamento de Inteligencia Competitiva. s.f. Oleaginosos. (en línea). Montevideo. 22 p. Consultado dic. 2013. Disponible en http://issuu.com/uyxxi/docs/oleaginosos_junio-2013-uruguayxxi.

106. Vargas, S.; March, G.; Benítez, G.; Meriles, J.; Cassini, C.; Haro, R. 2005. Efecto de las rotaciones en el manejo de enfermedades causadas por hongos de suelo en maní. (en línea). In: Congreso Latinoamericano de Fitopatología (18°, 2005, s.l.). Resúmenes s.n.t. s.p. Consultado ene. 2013. Disponible en http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2019/6-%20VARGAS%20GIL.pdf

107. Vargas, H. A.; Rueda-Lorza, E. A.; Gilchrist, E. 2012. Actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* (fungi: ascomycota) a diferentes temperaturas. (en línea). Actualidad Biología. 34 (96): 103-112. Consultado jul. 2012. Disponible en http://www.scielo.org.co/pdf/acbi/v34n96/v34n96a08.pdf

108. Villar, H. A.; Cadenazzi, M.; Ernst, O.; Vero, S.; Pereyra, S.; Altier, N.; Pérez, C. A. 2011. Efecto de la secuencia de cultivos sobre las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. en sistemas de agricultura sin laboreo. In: Congreso Argentino de Fitopatología (2°, 2011. Mar del Plata). Libro de resúmenes. Córdoba, AAF. p. 348.

109. Vero, S. 2006. Mecanismos de biocontrol. In: Mondino, P.; Vero, S. eds. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 49-79.

110. Windham, M. T.; Elad, Y.; Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. (en línea). Phytopathology. 76: 518-521. Consultado ene. 2012. Disponible en

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n05_518.PDF.

111. Woo, S. L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. The nature and application of biocontrol microbes II; *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96:181-185.