



## **TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN MODALIDAD TESINA**

**“Bioensayos para evaluar el antagonismo de aislados de  
*Trichoderma* sp.**

**Alumna:** Laura A. Areco Bellier.

**Asesora:** Ing. Agr. (Dra.) Susana A. Gutiérrez.

Corrientes-Argentina  
Año 2023

## ÍNDICE

Índice de figuras.	3
Índice cuadros y tablas.	4
<b>Agradecimiento y dedicatoria</b>	6
<b>Resumen</b>	7
<b>Introducción</b>	7
<b>Materiales y métodos</b>	9
Obtención de aislado del patógeno <i>Rhizoctonia oryzae</i> .	9
Purificación de aislados de <i>Trichoderma</i> spp., a partir de la colección de hongos.	10
<b>Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp.</b>	11
Cultivos duales	11
Micoparasitismo	12
Antibiosis (Metabolitos volátiles y No volátiles).	12
Diseño experimental y análisis estadístico.	13
<b>Resultados</b>	13
<i>Rhizoctonia oryzae</i> .	13
<i>Trichoderma</i> spp.	14
<b>Discusión</b>	24
<b>Conclusiones</b>	25
<b>Bibliografía</b>	25
<b>Anexo</b>	28

## INDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
Figura 1.	Síntomas de mancha de la vaina causado por <i>Rhizoctonia oryzae</i> .	10
Figura 2.	Trocitos de vainas foliares de arroz con síntomas (izq.) preparadas para la siembra. Pequeños fragmentos de tejidos en cajas de Petri en medio de cultivo APG.	10
Figura 3.	Detalle de tubos con APG en pico de flauta, de los aislados de <i>Trichoderma</i> en orden de izquierda a derecha aislados A1, A2 y A3 (A) vista de anverso, (B) vista de reverso, (C) patógeno <i>R. oryzae</i> .	10
Figura 4.	Detalle de flechas indicando los discos sembrados en APG del antagonista y del patógeno, enfrentados y equidistantes. En la parte superior se encuentran los testigos de <i>R. oryzae</i> y <i>Trichoderma</i> .	11
Figura 5.	Colonia de <i>R. oryzae</i> , con presencia de masa de esclerocios de color salmón, (A) Vista de anverso, (B) Vista de reverso.	13
Figura 6.	Vista microscópica de hifas de <i>R. oryzae</i> con ramificación en ángulo de 45º (izq. y centro); células monilioides formadas.	13
Figura 7.	Esclerocios de <i>R. oryzae</i> vistos en microscopio estereoscópico (90x).	14
Figura 8.	Conidióforos, fiálides y conidios de <i>Trichoderma</i> aislado A3; vistos con microscopio óptico 400x.	14
Figura 9.	Cajas de Petri con colonias de <i>Trichoderma</i> (cepa A2) a las 72 hs, 96 hs y 120 hs desde la siembra.	15
Figura 10.	Características culturales y reproductivas de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. (A, B y C). Vista del crecimiento de las colonias (D, E y F). Detalles de conidióforos, fiálides (G, H e I). Detalles de conidios formados, vistos con microscopio óptico (400x) (J, K y L). Clamidosporas formadas en posiciones intermedias y terminales.	16
Figura 11.	Crecimiento de colonias de los tres aislados de <i>Trichoderma</i> spp., en orden de izquierda a derecha; aislados A1, A2 y A3 (A) a las 48 hs, (B) 72 hs, (C) colonias vistas de anverso a las 120 hs, (D) Detalle del reverso de las colonias a las 120 hs.	17
Figura 12.	(A) Cultivos duales, de izquierda a derecha, aislados A1, A2 y A3 a las 24 hs desde la siembra, (B) Detalle de cultivo dual a las 48 hs, (B') Cultivo dual a las 48 hs fondo oscuro que muestra detalle de la zona de contacto entre el antagonista y el patógeno, (C) Cultivo dual a las 72 hs desde la siembra.	19
Figura 13.	Cultivos duales indicando competencia a las 96 hs desde la siembra: (A) A1 + <i>R. oryzae</i> , (B) A2+ <i>R. oryzae</i> , (C) A3+ <i>R. oryzae</i> . Los testigos de <i>Trichoderma</i> spp., se observan en la parte inferior de cada tratamiento.	20
Figura 14.	Flechas indican apresorios formados por <i>Trichoderma</i> sobre la hifa del patógeno.	21
Figura 15.	Flechas indican granulación en <i>R. oryzae</i> , flecha azul indica apresorio.	21
Figura 16.	Adhesión de <i>Trichoderma</i> sobre hifas de <i>R. oryzae</i> (izquierda), la flecha a indica vacuolización de <i>R. oryzae</i>	21

Figura 17.	Detalle que muestra cómo las hifas de <i>Trichoderma</i> spp., atraviesan y rompen las hifas del patógeno.	21
Figura 18.	Detalle que muestra adhesión, principio de enrollamiento y como la hifa de <i>Trichoderma</i> atraviesa a la hifa de <i>R. oryzae</i> .	22
Figura 19.	Vacuólisis en hifas de <i>R. oryzae</i> y adhesión de <i>Trichoderma</i> .	22
Figura 20.	Detalle de flechas azules señalando las hifas del antagonista y patógeno (arriba); las flechas indican vacuólisis y adhesión de hifas de <i>Trichoderma</i> sobre <i>R. oryzae</i> .	22
Figura 21.	(A) Discos de <i>Trichoderma</i> spp., sembrados sobre papel celofán estéril; (B) Detalle de discos de <i>R. oryzae</i> transcurridos 24 hs desde que fueron sembrados, posterior al retiro del papel celofán con discos de <i>Trichoderma</i> ; (C) después de transcurrido 48 hs desde la siembra se observó contaminación de la caja por <i>Trichoderma</i> aislado A3; (D) 72 hs después de la siembra.	23
Figura 22.	Discos enfrentados del patógeno <i>R. oryzae</i> sembrado en la parte superior y <i>Trichoderma</i> .	23
Figura 23.	(A) Cajas de Petri enfrentadas, selladas con papel film; se observa en la imagen crecimiento de <i>R. oryzae</i> luego de 24 hs desde la siembra, en cuya base inferior se observa crecimiento de la colonia de <i>Trichoderma</i> ; (B) crecimiento de <i>R. oryzae</i> a las 48 hs después de la siembra; (C) se observa invasión del micelio de <i>Trichoderma</i> rodeando a <i>R. oryzae</i> a las 96 hs (detalle de un halo de pigmentación sobre el patógeno).	24

#### INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala de clases propuesta por Bell et al., (1982) para evaluar cualitativamente los enfrentamientos.	12
Tabla 2. Promedios de crecimiento radial (cm) de <i>R. oryzae</i> en cultivo puro y en cultivo dual frente a <i>Trichoderma</i> spp., en la prueba de cultivos duales.	18
Tabla 3. Categorías de competencias de los aislados de <i>Trichoderma</i> (escala de Bell et al., 1982).	19

#### INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción morfológica de las estructuras fúngicas que caracterizan al género <i>Trichoderma</i> .	8
Cuadro 2. Descripción de mecanismos de acción utilizados por <i>Trichoderma</i> spp.	9
Cuadro 3. Tratamientos utilizados para realizar los bioensayos <i>in vitro</i> .	11
Cuadro 4. Resumen de las características culturales que se observaron de los tres aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	15
Cuadro 5. Resumen de las características microscópicas que se observaron de los tres aislados de <i>Trichoderma</i> spp.	15
Cuadro 6. Capacidad de inhibición del crecimiento por competencia de los tratamientos a las 24, 48 y 72 hs.	28

*A LA SANTISIMA TRINIDAD...*

**AGRADECIMIENTOS:**

A la virgen Maria, fuente de todas las gracias.

A mi papá de corazón Claudio.

A Fabri mi ángel.

A esta alta casa de estudios por brindarme las herramientas, el espacio por darme la oportunidad, especialmente a la catedra de fitopatología.

A mi directora Ing. Agr. (Dra.) Susana Alejandra Gutiérrez por su tiempo, dedicación, paciencia por todo lo que me enseño y por estar siempre firme para ayudarme.

A la Ing.Agr.(Dra.) Dirchwolf Pamela por sus consejos y apoyo.

A la Ing. Agr. Solís Valentina por su gran colaboración y ayuda.

A mis compañeros de laboratorio gracias por escucharme y compartir tan lindos momentos

A la Sra. Marisel por estar siempre...

A Mirian mi amiga del alma que hoy puedo decir lo logramos y gracias por compartir todos estos años...

A Luis Franco mi gran amigo y compañero de estudios...

A mi familia...

...

## **RESUMEN**

Los hongos antagonistas resultan importantes para el control biológico de los fitopatógenos, siendo las especies del género *Trichoderma* spp., una de las más utilizadas. El objetivo de este trabajo fue realizar bioensayos para evaluar *in vitro* el antagonismo de tres aislados de *Trichoderma* (A1, A2 y A3) frente al patógeno *Rhizoctonia oryzae*, causante de la mancha de la vaina del arroz. A tal fin se utilizaron las técnicas de cultivos duales, micoparasitismo y antibiosis. Los aislados de *Trichoderma* que se evaluaron frente a *R. oryzae* mostraron un mayor crecimiento radial, inhibiendo al patógeno. Al comparar cultivos duales en competencia por sustrato y por espacio, de los diferentes tratamientos de *Trichoderma* spp., se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), siendo el tratamiento T4 que corresponde al aislado A3 la que sobresalió a las 24 y 72 hs. Para evaluar cualitativamente la competencia por espacio se utilizó la escala de Bell et al. (1982), ubicando a los aislados A1 en clase 2; los aislados A 2 y A3 correspondieron a la clase 1-2 de la misma. En relación al micoparasitismo del antagonista se observó adhesión, vacuolización, granulación y enrollamiento sobre el patógeno; los resultados que se obtuvieron de antibiosis no alcanzaron estadísticamente el nivel de significancia propuesto. Los tres aislados evaluados presentaron capacidad inhibitoria sobre el patógeno.

## **INTRODUCCIÓN**

El arroz (*Oryza sativa*) es una monocotiledónea perteneciente a la familia Poaceae (gramínea); es el cuarto cultivo más producido en el mundo (750 millones de toneladas en 2021) con un 7% del comercio mundial de granos, luego de la soja (31%), del trigo (18%) y del maíz (12%), según datos de FAO. Los principales países productores son China, con 206 millones de toneladas (30% del total mundial), seguida por India con 153 millones de toneladas (20% del total mundial) y Brasil que aporta el 1,5% a la producción mundial de arroz. Respecto a Argentina, produce 1,6 millones de toneladas anuales, siendo las provincias productoras Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa y Santa Fe. En los últimos 10 años la producción se incrementó un 121%, acompañada por un alza del 16% en los rendimientos (SISA, 2021).

En Argentina, el cultivo de arroz es afectado por diversas enfermedades, siendo una de ellas el manchado de vainas foliares, causada por un complejo de hongos de suelo pertenecientes al género *Rhizoctonia* sp., siendo *R. oryzae*, la especie predominante en cultivos de arroz de la provincia de Corrientes (Gutiérrez y Cúndom, 2020).

Con respecto a ésta enfermedad, la bibliografía menciona que puede causar pérdidas, que pueden llegar hasta un 40 % de reducción en la producción. Esta situación fue observada en países como Estados Unidos, Tailandia, Australia, Colombia y Venezuela, donde ha sido considerada de alto riesgo (Hossain et al., 2017; Lanoiselet et al., 2005, 2007; Ou, 1985).

En Argentina aún no se han estudiado los daños en relación a las pérdidas de rendimiento, pero la enfermedad sigue en aumento cada año por lo cual puede llegar a ser un grave problema sanitario en futuras campañas (Pedraza, 2005; Gutiérrez et al., 2017; Gutiérrez y Cúndom, 2020).

Los síntomas de la enfermedad se presentan como lesiones circulares a ovales, de color verde pálido al inicio, posteriormente castaño claro, con bordes oscuros, a la altura de la línea de agua. Las lesiones pueden unirse y desarrollarse hasta la base de la panoja, causando amarillez y muerte de vainas y láminas foliares, con vuelco de plantas en ataques severos (Lanoiselet et al., 2005, 2007; Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992). Las condiciones ambientales de altas temperaturas que van desde los 28 - 32°C y con más de 90 % de humedad son propicias para su diseminación y supervivencia del patógeno. La principal fuente de inóculo son los esclerocios producidos por el patógeno sobre las lesiones en vainas foliares y tallos, los que sobreviven en el suelo y residuos de cosecha de una campaña a otra, diseminándose durante la preparación de suelo y más tarde, con el agua de riego. Flotan en el agua e inician la enfermedad al entrar en contacto con las vainas de las plantas, comenzando un nuevo ciclo de infección (Lanoiselet et al., 2007; Linde et al., 2005; Ou, 1985).

En agricultura, los fungicidas son considerados como una de las principales herramientas utilizadas para el control de hongos fitopatógenos; tales sustancias químicas producen efectos indeseados sobre el ecosistema, induciendo la generación de microorganismos resistentes, presencia de residuos

tóxicos, contaminación de suelos, recursos hídricos, etc. (Sibila y Álvarez, 2003; Danay Infante et al., 2009; Mondino y Vero, 2006). Una de las alternativas para esta situación, lo constituye la utilización del control biológico que significa la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, ya sea en su estado activo o latente, mediante uno o más organismos, lograda en forma natural o a través del manejo de las condiciones ambientales, del hospedante o de los antagonistas autóctonos, o por la introducción de uno o más microorganismos antagónicos (Cook y Baker, 1983; Zin y Badaludinn, 2020 ).

Entre los agentes biocontroladores se mencionan a hongos, bacterias y virus los cuales pueden ser seleccionados y aplicados en concentraciones mayores y en momentos oportunos para que ejerzan su acción antagonista, siendo las especies del género *Trichoderma* las más estudiadas, en condiciones de invernáculo y a campo (Danay Infante et al., 2009; Mondino y Vero, 2006).

Respecto al biocontrol de *Trichoderma* spp. sobre especies de *Rhizoctonia* patógenas de arroz, se mencionan numerosos trabajos en los cuales se observó acción inhibitoria en el crecimiento micelial del hongo, y/o formación de esclerocios in vitro, mediante diferentes mecanismos, entre los cuales juegan un rol importante el parasitismo, la competencia, la antibiosis y los compuestos volátiles (Coca Martínez et al., 2017; França et al., 2015; Garrido y Vilela 2019; Martínez et al., 2008; Naeimi et al., 2010; Reyes et al., 2008; Vongphachanh et al., 2016).

En relación al género *Trichoderma* (Ascomycota) comprende especies que se caracterizan por colonizar sustratos rápidamente (suelo, restos de materia orgánica); se consideran hongos cosmopolitas del suelo, generalmente aeróbicos y en determinadas condiciones, pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite una mayor plasticidad ecológica; comprende especies endófitas y antagonistas, que compiten con microorganismos por espacio y nutrientes al reducir o detener completamente el desarrollo de los mismo (Barata da Silva, et al., 2022; Harman, 2006; Rahman et al., 2011). También promueven el crecimiento de las plantas e inducen resistencia sistémica, micoparasitismo y antibiosis mediante la acción restrictiva directa a los hongos fitopatógenos, con la producción de enzimas extracelulares (Osorio et al., 2016).

Debido a su gran capacidad reproductiva, y su rápido crecimiento se ve favorecido por la presencia de materia orgánica y humedad; se comportan como tolerantes a temperaturas extremas, pH y salinidad (Argumedo et al., 2009).

Teniendo en cuenta las características anteriores, los convierten en excelentes agentes de control biológico de enfermedades que afectan a las plantas (Barata da Silva, et al., 2022; Druzhinina et al., 2011).

A continuación, se describen algunas características microscópicas de *Trichoderma* spp. (Abreu y Pfennig, 2022; Savin-Molina et al., 2021) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción morfológica de las estructuras fúngicas que caracterizan al género *Trichoderma*.

Estructura fúngica	Características morfológicas
<b>Conidióforos</b>	Son hialinos, erectos, no verticilados, generalmente ramificados, pueden ser solitarios o agrupados.
<b>Conidios</b>	Hialinos a ligeramente con coloración verdosa o amarillenta, unicelulares que miden aproximadamente de 2,0-5,0µm. Presentan esporulación densa que asegura la supervivencia, dispersión y reproducción del hongo.
<b>Fiálides</b>	En esta estructura se forman los conidios (esporas asexuales). Presentan forma de botella, aislada o agrupada, son ensanchadas en la región media central, pero delgadas.
<b>Clamidosporas</b>	De forma globosa o elipse, de 6- 15 µm, color amarillento o verdoso, terminales o intercalares. Constituyen estructuras de resistencia o supervivencia.

Durante su actividad antagónica, *Trichoderma* actúa mediante diversos mecanismos, siendo los principales, la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo y la secreción de diversos antibióticos (Danay Infante et al., 2009; Mondino y Vero, 2006) (Cuadro 2). Cada uno de estos mecanismos pueden ser evaluados mediante bioensayos *in vitro* necesarios para determinar su potencial antagónico.

Cuadro 2. Descripción de mecanismos de acción utilizados por *Trichoderma* spp.

MECANISMOS	DESCRIPCIÓN
<b>COMPETENCIA</b>	Consiste en el esfuerzo de dos o más organismos, para ganar la cantidad de sustrato que cada uno necesita, en las condiciones específicas en que se presenta y cuando la cantidad del mismo, no es suficiente para ambos.
<b>MICOPARASITISMO en cuatro etapas</b>	a) Crecimiento quimiotrófico donde <i>Trichoderma</i> crece en respuesta a algún estímulo de la hifa del hospedante o hacia un gradiente de químicos producidos por el mismo. b) Etapa de reconocimiento, donde las hifas de <i>Trichoderma</i> detectan la presencia de un posible huésped en el medio, mediante lectinas específicas. c) Etapa de adhesión y enrollamiento d) Actividad lítica cuando el hongo crece rodeando al patógeno, posteriormente generando la formación de ovillos y apresorios, cuya función es la de atravesar la pared celular del hongo para favorecer la penetración de sus hifas las cuales utilizarán el contenido intracelular del hospedante; esta etapa se encuentra acompañada de la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasa, glucanasas y proteasas las cuales favorecen la ruptura de la pared celular.
<b>ANTIBIOSIS</b>	Es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a éstos; se produce durante las interacciones mediadas por compuestos volátiles o no, producidos por el agente biocontrolador, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos.

#### -Objetivo

Evaluar la capacidad antagónica de tres aislados de *Trichoderma* spp., mediante bioensayos *in vitro*, utilizando la técnica de cultivos duales, micoparasitismo y antibiosis.

#### Materiales y Métodos

Los bioensayos fueron realizados en la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

Se utilizaron tres cepas de *Trichoderma* spp. (A1-Doña Marina 580; A2 -San Joaquín identificado como *Trichoderma virens* y A3-Saladas IRGA 424, todas procedentes de la colección de hongos de la cátedra de Fitopatología.

#### Obtención de aislado del patógeno *Rhizoctonia oryzae*:

El hongo fue aislado de plantas de arroz de un material identificado como HIB 1363, con síntomas de mancha de la vaina, procedentes de la localidad de Mercedes (Corrientes) (Fig. 1). El aislamiento se realizó por medio de siembras *in vitro* en medio de cultivo Agar Papa Glucosa (APG) 1,5%, previa desinfección de pequeños fragmentos de tejido sintomático con hipoclorito de sodio 1% en agitación durante 1 minuto; luego se dejó secar en papel absorbente estéril (Fig. 2). Las cajas sembradas se incubaron en condiciones de laboratorio (25°C +/- 2°C) durante 7 días. Las colonias desarrolladas fueron purificadas en tubos de ensayo con APG en pico de flauta (Fig.3) (Couto Alfenas y Gonçalvés, 2007).



Figura 1. Síntomas de mancha de la vaina causado por *Rhizoctonia oryzae*.



Figura 2. Trocitos de vainas foliares de arroz con síntomas (izq.) preparadas para la siembra. Pequeños fragmentos de tejidos en cajas de Petri en medio de cultivo APG (der.)

#### Purificación de aislados de *Trichoderma* spp., a partir de la colección de hongos:

Cada aislado de *Trichoderma* spp. fue purificada a partir de los tubos en conservación, a cajas de Petri con APG, según se describe a continuación: se extrajo una porción de micelio que fue depositada sobre la superficie del medio de cultivo, con aguja histológica previamente esterilizada por flameado, a fin de obtener las colonias respectivas. Posteriormente, fueron incubadas en condiciones de 12 h luz/12 h oscuridad durante 7 días, hasta la observación de crecimiento micelial con abundante esporulación del hongo. Dichas colonias fueron utilizadas luego como inóculo para la realización de los diferentes bioensayos.

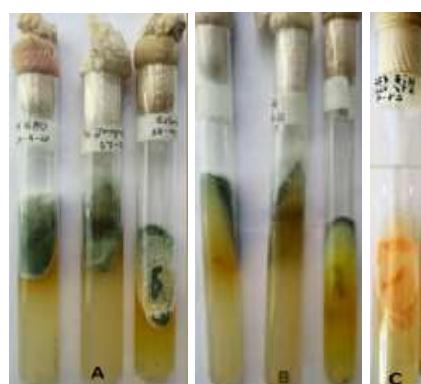


Figura 3. Detalle de tubos con APG en pico de flauta, de los aislados de *Trichoderma* en orden de izquierda a derecha aislados A1, A2 y A3 (A) vista de anverso, (B) vista de reverso, (C) patógeno *R. oryzae*.

Para los distintos bioensayos, se utilizaron tres aislados de *Trichoderma* spp., enfrentados al aislado de *R. oryzae*. En el Cuadro 3, se describen los tratamientos con sus respectivas denominaciones.

#### Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp:

**Cultivos duales:** Esta técnica se utilizó para evaluar cuantitativa y cualitativamente competencia por espacio y micoparasitismo.

Consistió en la siembra equidistante y simultánea de discos de inóculo de 5 mm de diámetro, del patógeno y antagonista, extraídos con sacabocados esterilizados por flameado, a partir de colonias de 8-10 días de edad de ambos hongos (antagonista y patógeno) en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo APG. Las cajas se incubaron a 25°C +/- 2°C en oscuridad; se realizaron tres repeticiones por cada cepa de *Trichoderma*. Para este ensayo *in vitro*, se utilizaron cinco cajas de Petri por tratamiento: cuatro con el antagonista enfrentados al patógeno y una caja testigo por cada cepa de *Trichoderma* (Fig.4).

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para realizar los bioensayos *in vitro*.

Número de tratamiento	Tratamientos	Denominación y procedencia
1	P + APG	<i>Rhizoctonia oryzae</i>
2	P+ A1	<i>R. oryzae</i> + <i>Trichoderma</i> spp. Doña Marina 580 (Itá Ibaté-Corrientes)
3	P + A2	<i>R. oryzae</i> + <i>Trichoderma virens</i> San Joaquín (San Javier-Santa Fe)
4	P + A3	<i>R. oryzae</i> + <i>Trichoderma</i> spp. IRGA 424 (Saladas-Corrientes)

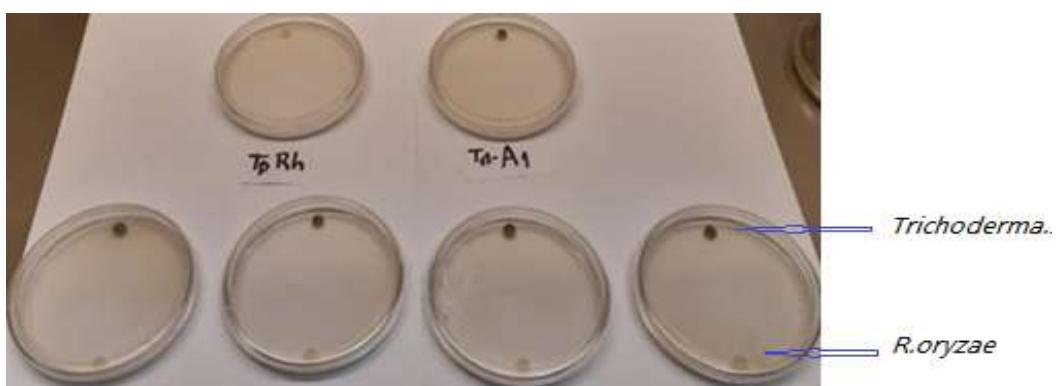


Figura 4. Detalle de flechas indicando los discos sembrados en APG del antagonista y del patógeno, enfrentados y equidistantes. En la parte superior se encuentran los testigos de *R. oryzae* y *Trichoderma*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno se evaluó considerando como 100% cuando la colonia testigo de *R. oryzae* completó el diámetro de la caja de Petri.

Para evaluar cuantitativamente este mecanismo de acción, se realizaron mediciones con regla graduada en cm, del crecimiento radial de las colonias del patógeno en interacción con el antagonista, y del testigo a partir de las 24 hs, hasta que uno de los microorganismos en el enfrentamiento cubrió la caja de Petri. Finalmente, se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) mediante la fórmula de Skidmore y Dickinson (1976):

$$\text{PIC} = [c_1 - c_2 / c_1] \times 100$$

Siendo c1= crecimiento radial del testigo y c2= crecimiento radial con tratamiento (Mondino y Vero, 2006; Martínez et al., 2008).

Para la evaluación cualitativa del mismo mecanismo de acción, se registraron los cambios de aspecto en las colonias de ambos hongos y a partir del análisis de esos datos, se ubicó a los aislados estudiados dentro de la escala propuesta por Bell et al., (1982), la cual consta de las siguientes clases según se detalla:

Tabla 1. Escala de clases propuesta por Bell et al., (1982) para evaluar cualitativamente los enfrentamientos.

Clase	Descripción
1	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno
2	Sobrecrecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio.
3	<i>Trichoderma</i> spp. y patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menos que 2/3), uno no se sobrepuso al otro
4	Hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión por <i>Trichoderma</i> spp.
5	Sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio.

**Micoparasitismo:** Para esta actividad se tomaron muestras de micelio de la zona de contacto hifal de las colonias del patógeno y antagonista (Danay Infante et al., 2009). Se realizaron preparados microscópicos con ayuda de una cinta adhesiva transparente y en algunos casos con aguja histológica, depositando el material sobre portaobjetos con una gota de agua como líquido de montaje o bien cubriendo con cubreobjeto. Posteriormente se observó al microscopio óptico (marca Leica, modelo DM 500), con un aumento de 400x. Las observaciones microscópicas fueron documentadas gráficamente por medio de la cámara de teléfono celular (Motorola one fusión).

**Antibiosis:** Para evaluar la inhibición de crecimiento de *R. oryzae* por la producción de metabolitos volátiles y no volátiles producidos por *Trichoderma*, se realizaron enfrentamientos entre el patógeno y los tres aislados del antagonista, en cajas de Petri con medio de cultivo APG (Mondino y Vero, 2006). Las distintas mediciones del crecimiento radial del patógeno en cm se llevaron a cabo (con regla graduada) cada 24 hs desde que se inició el bioensayo y hasta que la colonia del patógeno testigo alcanzó el diámetro total de la caja. Los tratamientos correspondientes se realizaron por triplicado. Se detallan a continuación cada método utilizado:

-Metabolitos volátiles: A fin de estimar la capacidad fungistática y de actuar a distancia que posee el antagonista, se realizó un co-cultivo del patógeno y del antagonista. La metodología consistió en enfrentar dos fondos de cajas de Petri con APG, en el centro de la inferior se sembró un disco de 5 mm de la colonia de la cepa de *Trichoderma* spp. y en el centro superior, un disco de inóculo del patógeno; ambas bases se enfrentaron y se sellaron con papel film; luego se incubaron a 25 °C +/- 2°C durante 48 hs. Para esta actividad el testigo consistió, en enfrentar un disco del patógeno contra una caja de Petri solo con APG.

-Metabolitos no volátiles: Para estimar la capacidad de actuar *in situ* del antagonista, se utilizó una caja de Petri con medio de cultivo APG; la base de la misma fue cubierta con papel celofán esterilizado, sobre el cual se sembró un disco de 5 mm de inóculo de *Trichoderma*, incubando a 25 °C +/- 2°C durante 48 hs (Mondino y Vero, 2006).

Posteriormente, se procedió a retirar el papel celofán que contenía al antagonista y se sembró sobre el medio de cultivo de dicha caja, un disco de inóculo del patógeno.

**Diseño experimental y análisis estadístico:** Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones por tratamiento; la unidad experimental consistió en una caja de Petri (8,5 cm de diámetro), y como tratamientos, se consideraron al aislado de *R. oryzae* enfrentado a los tres aislados de *Trichoderma* y los testigos correspondientes.

Las observaciones se realizaron a los 24, 48, y 72 horas, mediante mediciones del crecimiento radial de las colonias del patógeno.

Los datos obtenidos de crecimiento radial (CR) de las colonias en cada tratamiento para el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC %) y antibiosis, se ordenaron en hojas de cálculo de Microsoft Excel; luego se efectuó el análisis de la varianza ANOVA y prueba de Tukey para test de comparaciones múltiples entre medias con ( $P \leq 0.05$ ); se utilizó el software estadístico Infostat (2018).

## RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los bioensayos *in vitro* con el fin de evaluar su antagonismo por los métodos de cultivos duales, micoparasitismo y antibiosis.

Los aislados fúngicos (patógeno y tres antagonistas), presentaron las siguientes características culturales y morfométricas:

### ***Rhizoctonia oryzae*:**

En condiciones *in vitro*, el patógeno desarrolló colonias con micelio aéreo y en parte sumergido, al inicio de color blanquecino, adquiriendo posteriormente una tonalidad salmón (Fig. 5). En observaciones microscópicas, presentó hifas hialinas, tabicadas, con bifurcación en ángulo agudo, con una constrictión leve en este sitio, y formación de septos próximos al punto de constrictión (Fig.6). Desarrolló esclerocios (estructuras de resistencia) sumergidos, amorfos de tamaño y forma indefinida de 0,5 a 1 mm de diámetro, de color salmón, formados a partir de hifas que se engrosaron y acortaron llamadas células monilioides (Fig. 6,7).

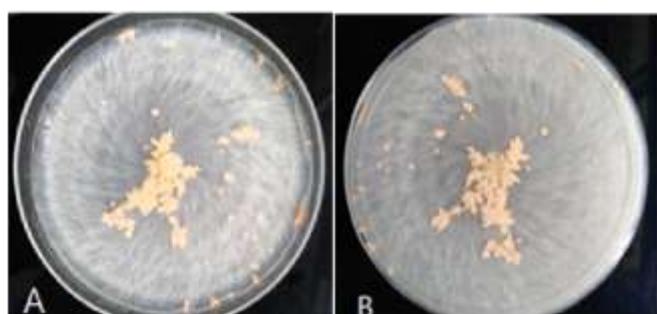


Figura 5. Colonia de *R. oryzae*, con presencia de masa de esclerocios de color salmón, (A) Vista de anverso, (B) Vista de reverso.



Figura 6. Vista microscópica de hifas de *R. oryzae* con ramificación en ángulo de 45º (izq. y centro); células monilioides formadas (der).



Figura 7. Esclerocios de *R. oryzae* vistos en microscopio estereoscópico (90x).

***Trichoderma spp.*, aislado A1 (Doña Marina 580):**

Las colonias desarrollaron escaso micelio aéreo algodonoso de color blanco; a las 72 hs se observó esporulación de color verde claro, con formación de anillos concéntricos, dispersos, con difusión de pigmentos de tonalidad amarilla que tiñen el medio de cultivo y la zona de contacto con el patógeno. Los conidióforos son dicotómicos, con fiálides de forma típica de botellita (más ensanchadas en el centro y con cuello alargado); conidios subglobosos hialinos a verde claro unicelulares. Presentó clamidosporas terminales e intercalares.

***Trichoderma virens*, aislado A2 (San Joaquín):**

Las colonias presentaron micelio aéreo compacto, denso algodonoso de coloración blanquecina, tornándose de color verde oscuro por la abundante esporulación. Al reverso de las colonias se observó visiblemente una coloración castaño-amarillenta que tiñe el medio.

El micelio logró cubrir la superficie del medio de cultivo APG, entre las 72 y las 96 hs (Fig. 9).

Los conidióforos formaron ramas laterales pareadas, con fiálides de forma típica de botellita; los conidios de forma ovoide y a veces globosa, de color verde claro. También desarrollaron clamidosporas terminales e intercalares.

***Trichoderma spp.*, aislado A3 Irga 424 (Saladas):**

Se observaron colonias con escaso micelio aéreo de crecimiento rápido, en su inicio de color blanco, cuyo reverso presentó una coloración amarilla clara; la esporulación de color verde oscuro, con dos a tres anillos de crecimiento.

Los fiálides son delgadas, se presentan de tres a cinco con ramificación dicotómica; los conidios son ligeramente alargados de color verde; las clamidosporas son terminales (Fig. 8).



Figura 8. Conidióforos, fiálides y conidios de *Trichoderma* aislado A3; vistos con microscopio óptico 400x.

En el Cuadro 4 y 5, se resumen las características culturales y morfológicas de los tres aislados de *Trichoderma*.

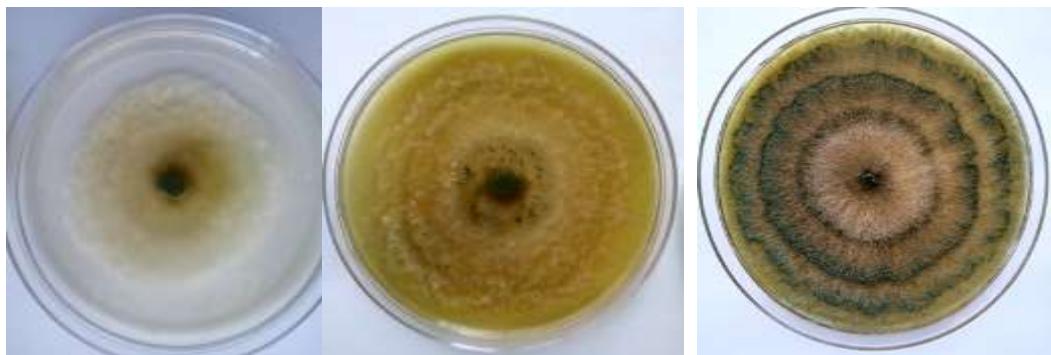


Figura 9. Cajas de Petri con colonias de *Trichoderma* (cepa A2) a las 72 hs, 96 hs y 120 hs desde la siembra.

Cuadro 4: Resumen de las características culturales que se observaron de los tres aislados de *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i>	Coloración		Aspecto de la colonia	Presencia de Anillos de crecimiento	Liberación de pigmentos
	Anverso	Reverso			
A1(DM 580)	Verde claro	Amarillo	Micelio blanco algodonoso	si	si
A2 (S. Joaquín)	Verde	Amarillo oscuro	Abundante micelio aéreo	si	si
A3(Irga 424)	Verde	Amarillo claro	Escaso micelio aéreo	si	si

Cuadro 5: Resumen de las características microscópicas que se observaron de los tres aislados de *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i>	Ramificación conidióforo	Forma de fiálide	Nº de fiálide	Forma y color de conidios	Clamidosporas
A1(DM 580)	Dicotómico	Ampuliforme	3-5	Subglobosos verdes forma masas	si
A2 (S. Joaquín)	Dicotómico	Ampuliforme-alargada	3-6	Subglobosos verdes claros	si
A3(Irga 424)	Dicotómico	Alargada	3-5	Globosos-alargados verdes	si

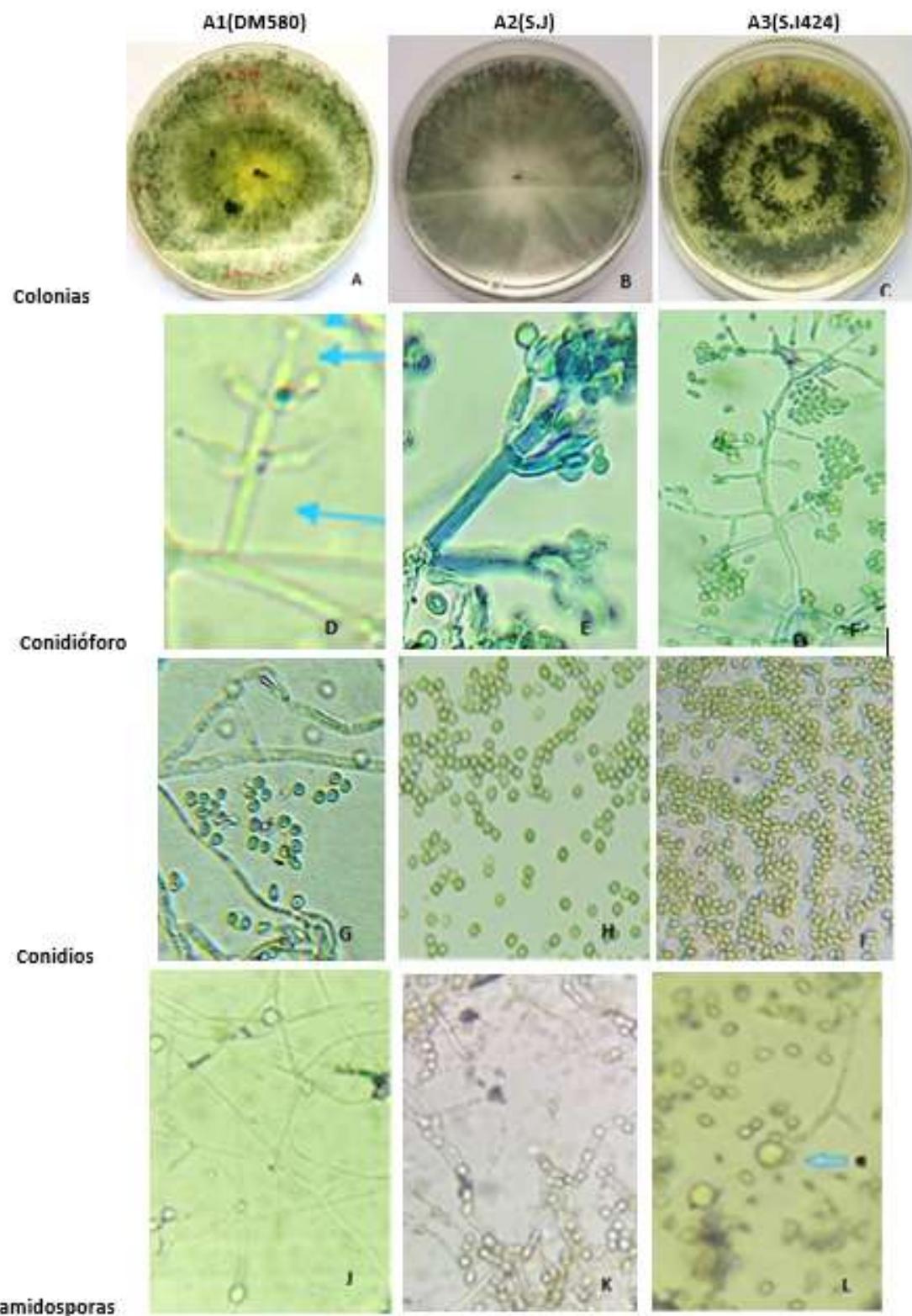


Figura 10. Características culturales y reproductivas de las cepas de *Trichoderma* spp. (A, B y C). Vista del crecimiento de las colonias (D, E y F). Detalles de conidióforos, fiáldides (G, H e I). Detalles de conidios formados, vistos con microscopio óptico (400x) (J, K y L). Clamidosporas formadas en posiciones intermedias y terminales.

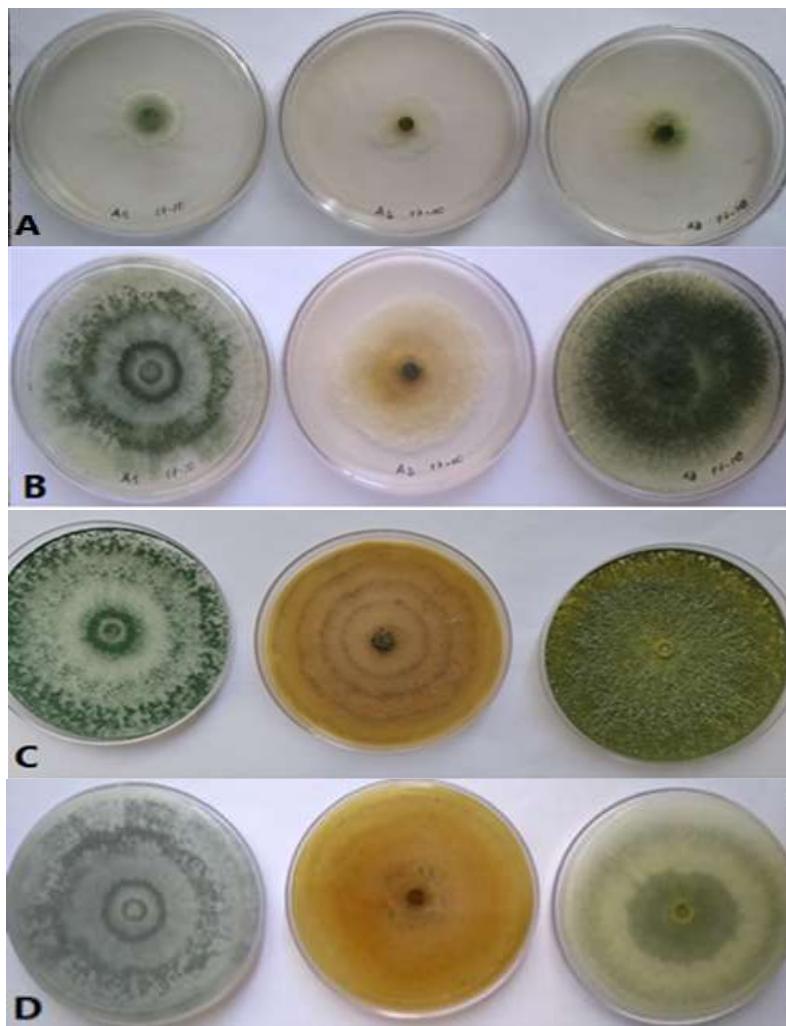


Figura 11. Crecimiento de colonias de los tres aislados de *Trichoderma* spp., en orden de izquierda a derecha; aislados A1, A2 y A3 (A) a las 48 hs, (B) 72 hs, (C) colonias vistas de anverso a las 120 hs, (D) Detalle del reverso de las colonias a las 120 hs.

En la técnica de cultivos duales, se destacaron los tres aislados de *Trichoderma* spp. debido a que disminuyeron el crecimiento radial del patógeno, diferenciándose estadísticamente del testigo. Los aislados A1 y A2 produjeron sobrecrecimiento y coloración de la zona donde se encuentra el patógeno y esporulación sobre el mismo; el aislado A3 se diferenció rodeando al patógeno y se observó pigmentación alrededor del mismo, pero no sobrecrecimiento (Fig.13).

Al evaluar los resultados de análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento radial del micelio de *R. oryzae* por efecto del enfrentamiento con aislados de *Trichoderma* spp., y testigos, se encontró la existencia de diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ), con un coeficiente de variabilidad entre 9.18 y 18.12%. No sólo se observó disminución del crecimiento, sino que además no se formaron esclerocios en la colonia de *R. oryzae*.

Según la Tabla 2, a las 24 hs y 72 hs se destacó el aislado A3 que corresponde al tratamiento 4; a las 48 hs no se evidenciaron diferencias entre los tratamientos; esto indicaría la producción de metabolitos secundarios y antibióticos por parte del antagonista, que limitan el desarrollo normal de *R. oryzae*.

Con respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento, los tratamientos 2 y 3 presentaron 8,85 y 8,41% de PICR respectivamente a las 24 hs, a diferencia del tratamiento 4 (aislado A3), que alcanzó un valor de 23,19% de inhibición de crecimiento. De tal manera, éste tratamiento demostró un mejor comportamiento siendo que obtuvo un valor 39,77% a las 72% (Gráfico 1).

Tabla 2. Promedios de crecimiento radial (cm) de *R. oryzae* en cultivo puro y en cultivo dual frente a *Trichoderma* spp., en la prueba de cultivos duales.

Detalle de Tratamientos	Tratamiento	CR 24 hs	CR 48 hs	CR 72 hs
P + APG	1	2.2	4.8	6.9
P + APG	1	2.1	4.5	6.7
P + APG	1	2	5.1	6.6
P+ A1	2	1.92	4.14	5.56
P+ A1	2	1.7	2.96	2.96
P+ A1	2	2.1	3.59	4.81
P + A2	3	2	4.26	5.49
P + A2	3	1.95	3.05	4.31
P + A2	3	1.82	3.31	3.79
P + A3	4	1.84	4.025	4.71
P + A3	4	1.35	3.16	3.29
P + A3	4	1.65	3.49	3.56

P: patógeno *R. oryzae*; CR: crecimiento radial.

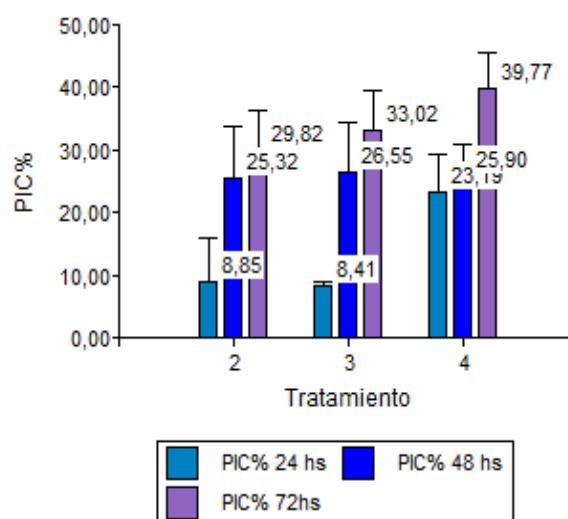


Gráfico 1. Porcentaje de inhibición el crecimiento radial del patógeno (PICR), a las 24, 48 y 72 hs.

En cuanto al análisis cualitativo de la competencia por espacio y nutrientes, considerando la escala de Bell et al., (1982), los tres aislados de *Trichoderma* spp. presentaron actividad antagónica sobre el patógeno *R. oryzae* (Tabla 3); A1 correspondió a la clase 2, lo cual se observó que en todas las repeticiones *Trichoderma* colonizaba al menos 2/3 de la superficie del patógeno, mientras que el A2 y A3 calificaron para la clase 1 y 2 en las sucesivas repeticiones. Se observó detención del crecimiento del patógeno y no se produjo formación de esclerocios, con ninguno de los tres antagonistas.

Tabla 3. Categorías de competencias de los aislados de *Trichoderma* (escala de Bell et al., 1982).

Aislado	Clase
A1	2
A2	1-2
A3	1-2

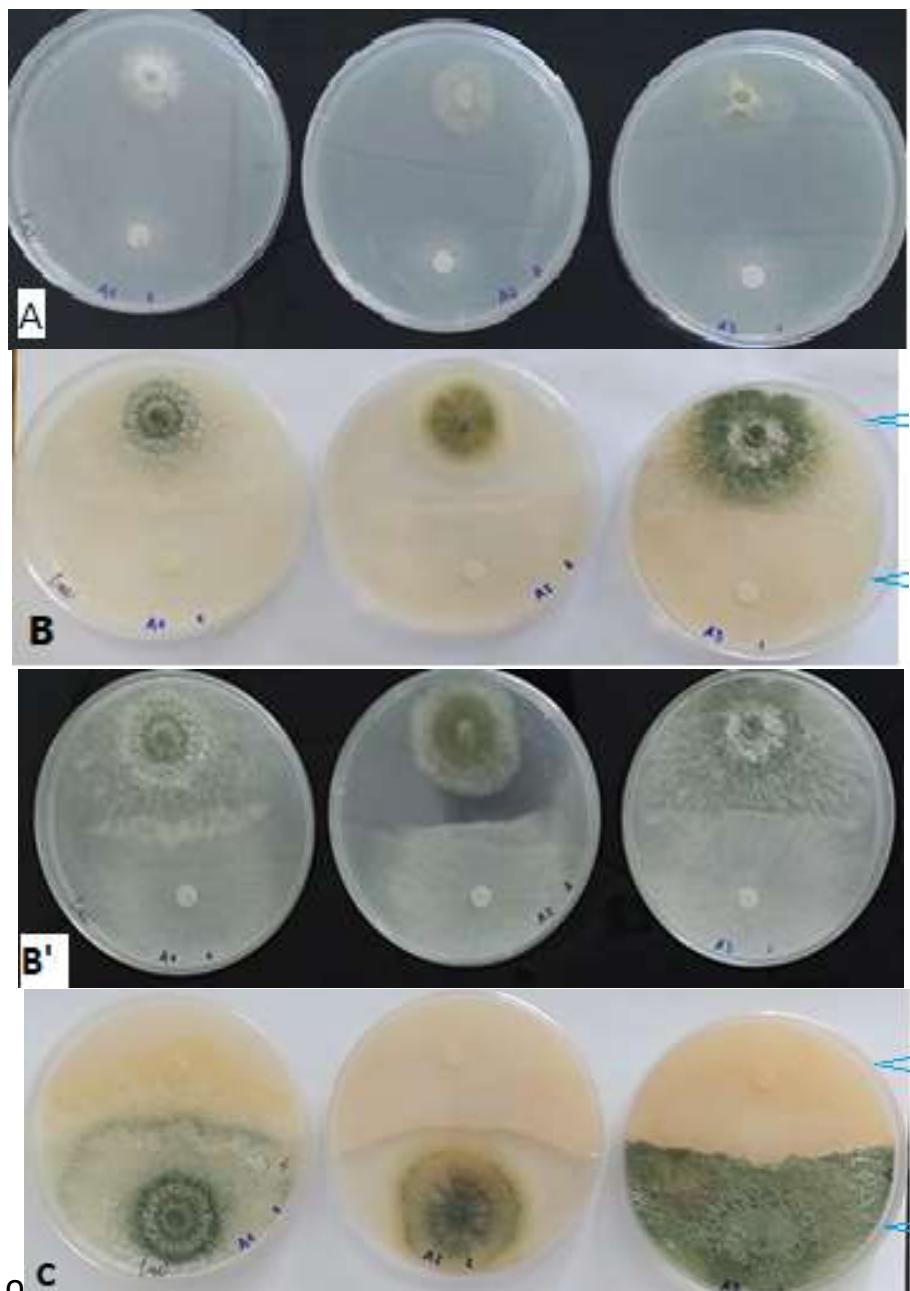


Figura 12. (A) Cultivos duales, de izquierda a derecha, aislados A1, A2 y A3 a las 24 hs desde la siembra, (B) Detalle de cultivo dual a las 48 hs, (B') Cultivo dual a las 48 hs fondo oscuro que muestra detalle de la zona de contacto entre el antagonista y el patógeno, (C) Cultivo dual a las 72 hs desde la siembra.

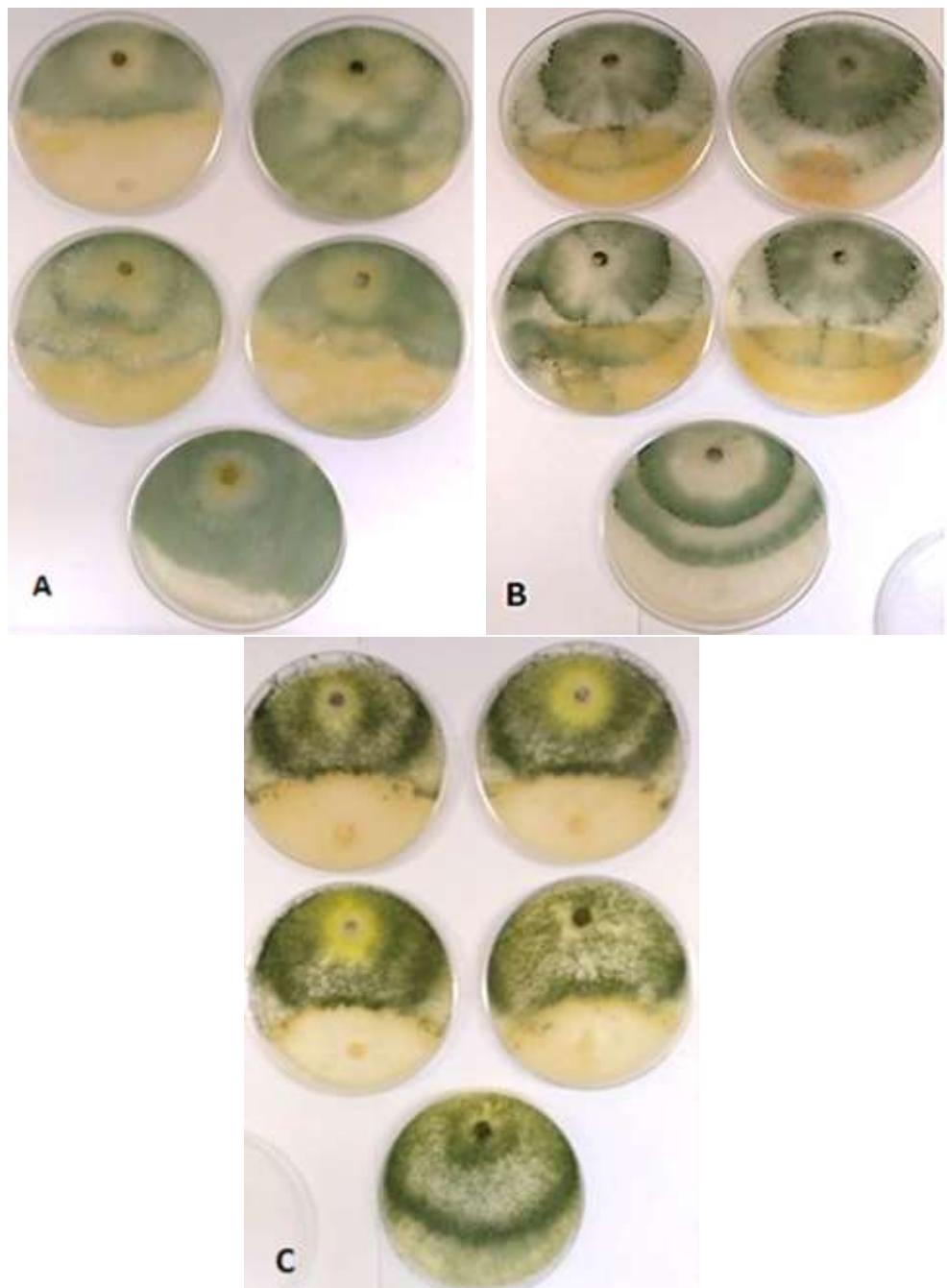


Figura 13. Cultivos duales indicando competencia a las 96 hs desde la siembra: (A) A1 + *R. oryzae*, (B) A2+*R.oryzae*, (C) A3+*R. oryzae*. Los testigos de *Trichoderma* spp., se observan en la parte inferior de cada tratamiento.

Respecto al micoparasitismo, los tres aislados de *Trichoderma* desarrollaron al menos un tipo de interacción hifal cuando se enfrentaron al patógeno. Se observó la penetración de las hifas de *Trichoderma* en las hifas del patógeno produciendo formación de apresorios (Fig.14), degradación parcial (lisis), enrollamiento o estrangulamiento, granulación (Fig. 15) y vacuolización del contenido citoplasmático (Fig. 16), también ruptura de hifas (Fig. 17).

A continuación, se pueden ver algunas imágenes microscópicas observadas con microscopio óptico 400X capturadas con cámara de teléfono celular (Motorola One Fusión).

En relación a los bioensayos de metabolitos volátiles y no volátiles, que muestran el efecto antibiótico a distancia e *in-situ* respectivamente, en el análisis estadístico no alcanzaron el nivel de significancia propuesto. Pero se pudo observar que el patógeno no desarrolló esclerocios en ninguno de los casos.

**Aislado A1+*R. oryzae*:**

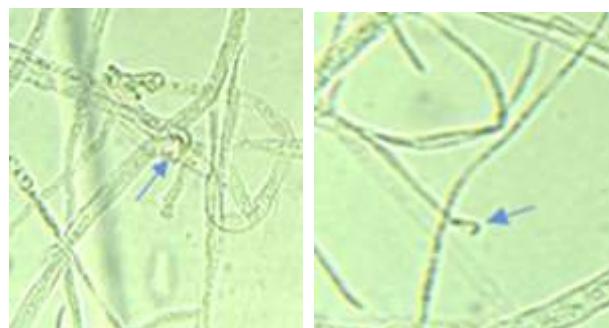


Figura 14. Flechas indican apresorios formados por *Trichoderma* sobre la hifa del patógeno.

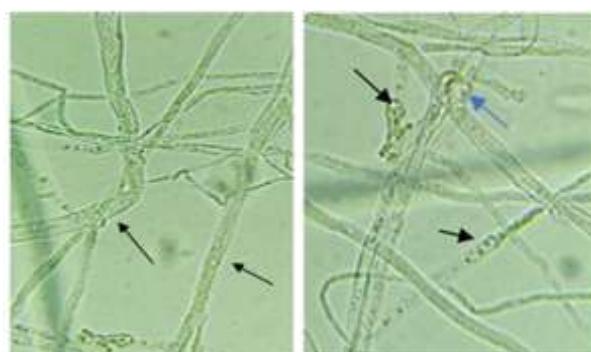


Figura 15. Flechas indican granulación en *R. oryzae*, flecha azul indica apresorio.

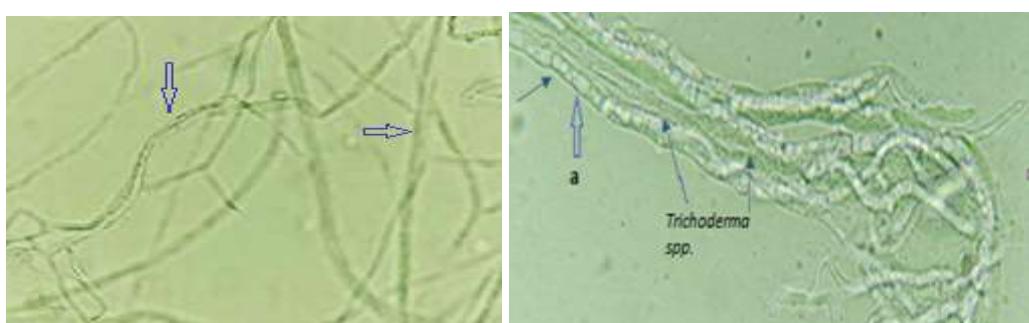


Figura 16. Adhesión de *Trichoderma* sobre hifas de *R. oryzae* (izquierda), la flecha a indica vacuolización de *R. oryzae* (derecha).



Figura 17. Detalle que muestra cómo las hifas de *Trichoderma* spp., atraviesan y rompen las hifas del patógeno.

***Trichoderma virens* aislado A2 (San Joaquín) + *R. oryzae*:**



Figura 18. Detalle que muestra adhesión, principio de enrollamiento y como la hifa de *Trichoderma* atraviesa a la hifa de *R. oryzae*.

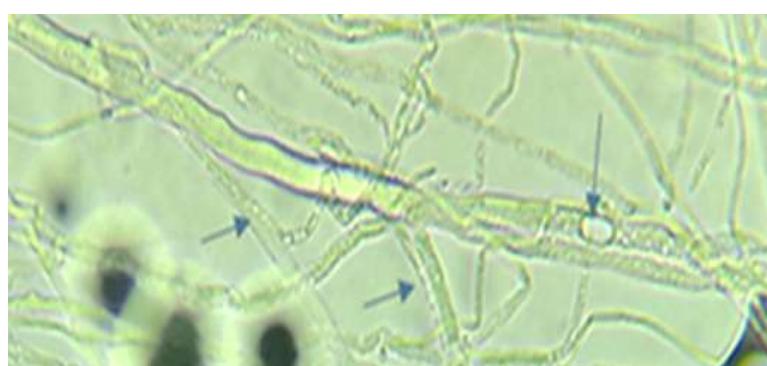


Figura 19. Vacuólisis en hifas de *R. oryzae* y adhesión de *Trichoderma*.

**Aislado A3 (Saladas) IRGA 424:**



Figura 20. Detalle de flechas azules señalando las hifas del antagonista y patógeno (arriba); las flechas indican vacuólisis y adhesión de hifas de *Trichoderma* sobre *R. oryzae* (fig. abajo).



**Metabolitos no volátiles:**

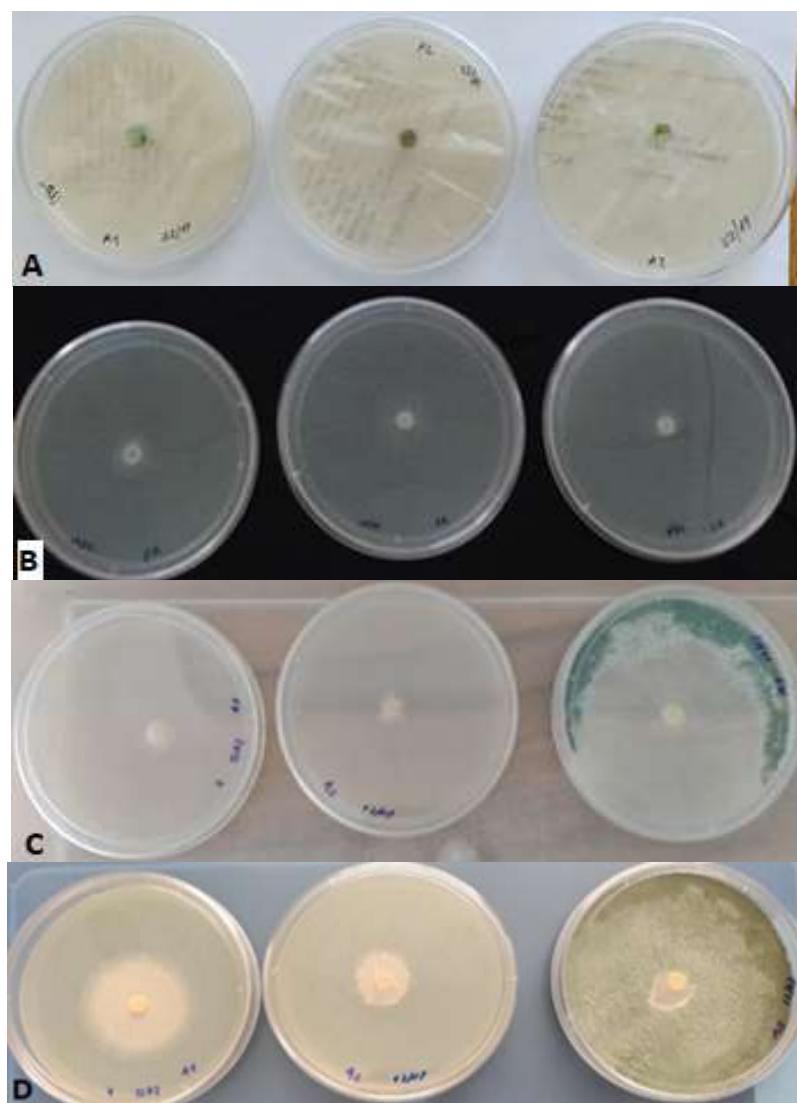


Figura 21. (A) Discos de *Trichoderma* spp., sembrados sobre papel celofán estéril; (B) Detalle de discos de *R. oryzae* transcurridos 24 hs desde que fueron sembrados, posterior al retiro del papel celofán con discos de *Trichoderma*; (C) después de transcurrido 48 hs desde la siembra se observó contaminación de la caja por *Trichoderma* aislado A3; (D) 72 hs después de la siembra.

**Metabolitos Volátiles:**

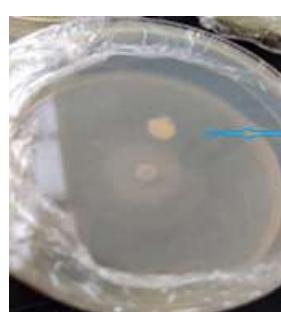


Figura 22. Discos enfrentados del patógeno *R. oryzae* sembrado en la parte superior y *Trichoderma*.

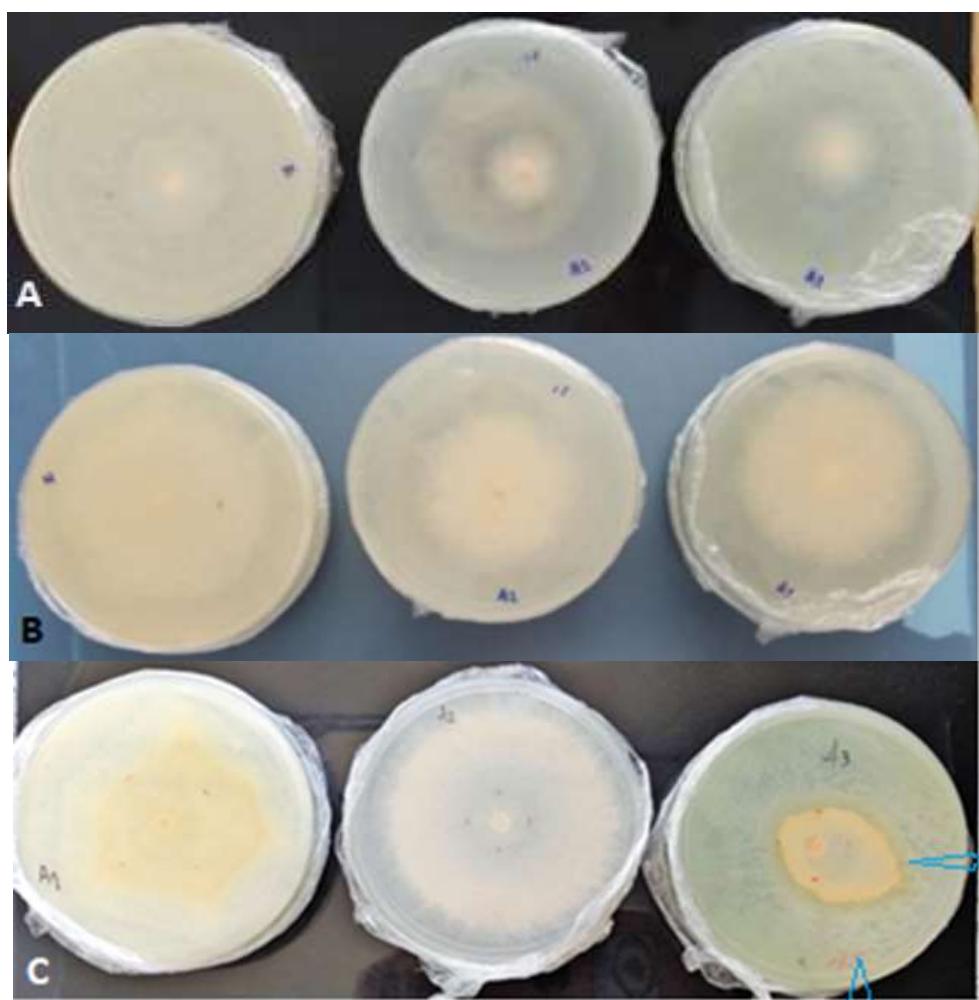


Figura 23. (A) Cajas de Petri enfrentadas, selladas con papel film; se observa en la imagen crecimiento de *R. oryzae* luego de 24 hs desde la siembra, en cuya base inferior se observa crecimiento de la colonia de *Trichoderma*; (B) crecimiento de *R. oryzae* a las 48 hs después de la siembra; (C) se observa invasión del micelio de *Trichoderma* rodeando a *R. oryzae* a las 96 hs (detalle de un halo de pigmentación sobre el patógeno).

### DISCUSIÓN

Analizando los resultados obtenidos en los bioensayos *in vitro* se determinó que los aislados de *Trichoderma* evaluados, lograron reducir y/o detener el crecimiento del patógeno, con un PICR de los aislados A2 y A3, a las 72 hs, demostraron un PICR de 29, 33 y 39% para los aislados A1, A2 y A3 respectivamente. El rápido crecimiento del antagonista tomando contacto con el patógeno, es una característica de agresividad y competitividad que poseen estos antagonistas para el control de hongos. De igual manera, la velocidad de crecimiento es una ventaja en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes, de manera de ejercer biocontrol (Cook y Baker, 1983; Dennis y Webster, 1971; Mondino y Vero, 2006).

La capacidad competitiva de especies de *Trichoderma* frente a *Rhizoctonia* sp. patógena de arroz, fue corroborada por diversos autores (Coca et al., 2017; Garrido y Vilela, 2019; Martínez et al., 2008; Reyes et al., 2008).

Según Martínez et al., (2008), la competencia por el sustrato como modo de acción antagónico en *Trichoderma* es un elemento a considerar, ya que al colonizar con mayor rapidez la zona de la rizosfera y los espacios de suelo, en general, limita la proliferación del hongo patógeno. Asimismo, el antagonista actúa mayormente sobre el patógeno por efecto de antibiosis y micoparasitismo, pero

resultan favorecidos aquellos aislamientos que presentan mayor capacidad para competir por el sustrato.

En cuanto a la evaluación cualitativa del mecanismo de acción, como ya se expuso anteriormente, el aislado A1 se ubicó en la clase 2, en la cual el antagonista coloniza toda la superficie del medio de cultivo, frenando la colonia del patógeno. El aislado A2 demostró un comportamiento frente al patógeno, entre la clase 1 y 2, en coincidencia el aislado A3, que también se ubicó en la clase 1 y 2 de la escala de Bell et al., (1982).

En relación al micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *R. oryzae*, los tres aislados demostraron varios tipos de interacciones hifales como ser adhesión, apresorios, ruptura de hifas, vacuólisis, granulación, degradación parcial o total (lisis), enrollamiento o estrangulamiento. Es importante tener en cuenta que la capacidad de un antagonista de poseer varios tipos de interacción hifal, es considerado una aptitud para su uso como biocontrol de hongos del suelo, logrando un control eficiente y duradero (Danay Infante et al. 2009). Estos resultados son similares a los encontrados por Martínez et al. (2008) y Reyes et al. (2008) con *R. solani* en arroz, donde *Trichoderma* spp. muestra alta capacidad antagónica con diferentes tipos de interacción hifal como lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración.

Al respecto, Gato et al., (2014), observó enrollamiento, penetración y fragmentación en las hifas de *R. oryzae-sativae*, ocasionadas por la producción de enzimas líticas. No siempre, todas estas interacciones son observadas, pues al parecer dependen del aislamiento de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente (Coca et al, 2017).

En las evaluaciones de antibiosis, en el análisis de la varianza no se alcanzaron los niveles de significancia propuestos; esto no escapa a la importancia de la misma como parte de la actividad antagonista de *Trichoderma* spp., debido a que este hongo puede secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente y así impedir la aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos (Mondino y Vero, 2006; Martínez et al., 2008; Reyes et al., 2008; Osorio et al., 2016).

## CONCLUSIONES

Los tres aislados de *Trichoderma* spp. lograron demostrar su acción antagónica *in vitro* frente a *R. oryzae*.

El tratamiento 4 que correspondió al aislado A3, procedente de Saladas, fué el que presentó mayor porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC %) en la técnica de cultivos duales, demostrando mayor competencia por sustratos y por espacio.

Con respecto al bioensayo de antibiosis, no se observó un efecto estadísticamente significativo entre los tratamientos evaluados.

Los tres aislados de *Trichoderma* spp. inhibieron la formación de esclerocios del patógeno *R. oryzae*.

La capacidad de una cepa antagonista de poseer varios tipos de interacción, es una característica significativa de los aislados de *Trichoderma* spp., siendo un aspecto destacado para la selección de los mismos como agentes de control biológico.

Los resultados obtenidos, indican la necesidad de continuar con estas evaluaciones, complementando con la evaluación *in vivo* en plantas de arroz, de manera de verificar su eficacia biológica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, LM., Pfenning, LA. 2022. Qué es *Trichoderma*? Capítulo 3. En: Meyer, MC., Mazaro, SM., Silva, JC. da (ed.). *Trichoderma: su uso en la agricultura*. Brasília, DF: Embrapa, 2022, 547 p.
- Argumedo-Delyra, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Peña-Cabriales, J. P. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Rev. Int. Contam. Ambient. 25 (4) 257-269.

- Bale, J., Van Lenteren, JC., Bigler F. 2008. Biological control and sustainable food production. *Phil Trans R Soc B*. 363:761–76.
- Barata da Silva, G., Ferreira Rêgo, MC., Santos de Françam SK., Pereira de Sousa, T., Nascente, AS., Lanna, Ac., Corsi de Filippi, MC., Alves de Souza, AC., Bezerra Andrade, G. 2022. Uso de *Trichoderma* en el cultivo de arroz. Capítulo 14:355-367. En: Meyer, MC., Mazaro, SM., Silva, JC. da (ed.). *Trichoderma: su uso en la agricultura*. Brasília, DF: Embrapa, 2022, 547 p.
- Bell, DK., Wells, HD., Markham, CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 389-372.
- Benhamou, N., Chet, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathol.* 83:1062-71.
- Coca Martínez, B., Infante Martínez, D., Reyes Yusimy, D., Gonzalez Marquetti, I., Delgado Oramas, BP., Arias Vargas, Y., Duarte Leal, Y., Miranda Cabrera, I., Cruz Triana, A., Gonzalez Fuentes, E. 2017. Bases científico-metodológicas para la selección, caracterización y uso de aislamientos de *Trichoderma* como agente de control biológico del tizón de la vaina *Rhizoctonia solani* en arroz. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* 7(1): 1-7.
- Cook, RJ., Baker, KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant Pathogens. Pp. 190-195. In: *Phytophthora. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. APS. St. Paul. MN-USA.
- Couto Alfenas, A., Gonçalvols Mafia, R. 2007. Métodos en Fitopatología. Ed. UFV. 382 p.
- Cúndom, MA., Gutiérrez, S., Miño, R., Duarte, JA. 2008. Prevalencia e incidencia de las enfermedades del tallo y vainas foliares del arroz en la provincia de Corrientes. En: Actas 1er. Congreso Argentino de Fitopatología. pp. 614
- Danay Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24(1):14-21.
- Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I: Production of non-volatile antibiotics. *Trans Brit Mycol Soc*.25-39.
- Di Rienzo, JA., Casanoves, F., Balzarini, MG., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo CW. InfoStat (versión 2018) [Software]. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Druzhinina ES., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz BA., Kenerley CM., Monte E., Mukherjee PK., Zeilinger S., Grigoriev IV., Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*. 9: 749-759.
- França, SKS., Cardoso, AF., Lustosa, DC., Ramos, EM L.S., Filippi, M. CC., Silva, GB. 2015. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for Sustainable Development* 35(1):317-324, 2015.
- Garrido, M., Vilela, N. 2019. Capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakatea sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de arroz. *Scientia Agropecuaria* 10(2):199-206.
- Gato, CY., Pérez, Y., Carreras, B., Yamilé, Y., Quesada, Y., Ramírez, R. 2014. Actividad antagónica de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. frente a fitopatógenos de suelo. *Fitosanidad* 18(1): 45-48.
- Gutiérrez, SA., Cúndom, MA. 2020. Enfermedades del tallo y vaina foliar del cultivo de arroz (*Oryza sativa*) en Argentina. *Boletín de la Asociación Argentina de Fitopatólogos N°9* Córdoba, Argentina.
- Gutiérrez, SA., Cúndom, MA., Dirchwolf, PM. 2017. Patógenos de suelo causantes de enfermedades en cultivos de arroz en Corrientes. En: XI Reunión Nacional de Biología de Suelos, FCA, UNNE. Corrientes.
- Hossain, M., Sreenivasaprasad, S., Meena, M., Sharma, NR. 2017. Morphological and Genetical study on *Rhizoctonia* sheath disease complex of rice in Bangladesh. *Universal Journal of Agricultural Research* 5(6): 344-349, 2017.

- Lanoiselet, VL., Cother, EJ., Ash, GJ., Harper, DI. 2005. Yield loss in rice caused by *Rhizoctonia oryzae* and *R. oryzae-sativae* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 34: 175-179.
- Lanoiselet, VM., Cother, EJ., Ash, GJ. 2007. Aggregate sheath spot and sheath spot of rice. *Crop Protection*, 26. p. 799-808.
- Linde, CC., Zala, M., Paulraj, RSD., McDonald, BA., Gnanamanickam, G. 2005. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. *European Journal of Plant Pathology* 112:113-121.
- Martínez B., Reyes Y., Infante D., Gonzalez E., Baños H., Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Protección Vegetal*, 23 (2): 118-125.
- Mondino P., Vero, S. 2006. Control Biológico de patógenos de plantas, Departamento de Publicaciones, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Naeimi, S., Okhovvat, SM., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi,C., Khosravi, V., Kredics, L. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight ith *Trichoderma* strains. *Phytopathologia Mediterranea* 49:289-300.
- Osorio, H E., Hernández, FD., Rodríguez, RH., Varela, S D F., Estrada, B D., López, JAS. 2016. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* in vitro. *Investigación y Ciencia*. 67(24):5-11.
- Ou, SH. 1985. Rice diseases. 2nd ed CMI, Kew, Surrey, England, 380 pp.
- Pedraza, M.V. 2005. En: Principales actividades sobre enfermedades del cultivo en la EEA Concepción del Uruguay del INTA. Resultados experimentales 2004-2005. - Editor/es: PROARROZ. Páginas/s: 11.
- Rahman, A., Begum, MF., Rahman, M., Bari, MA., Ilias, GN., Alam, MF. 2011. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. *Turkish Journal of Biology* 35:183-194.
- Reyes, Y., Martínez, B., Infante, D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Rev. *Protección Veg.*23(2): 112-117.
- Savin-Molina, J., Hernández-Montiel, LG., Ceiro Catasú, W., Avila-quezada, GD., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, FH., Romero-Bastidas, M. 2021. Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. *Revista Mexicana de fitopatología* 39(3):435-451.
- SISA - Sistema de Información Simplificado Agrícola (2021). Arroz.2021.2022.
- Sivila, N., Álvarez, SE. 2013. Producción artesanal de *Trichoderma*. 1a ed, San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias, 48p.
- Skidmore, AM., Dickinson, CH. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66:57-64.
- Vongphachanh, P., Saksirirat, W., Seapaisan, S. 2016. Biological control of sheath diseases of rice caused by *Rhizoctonia oryzae* and *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma* spp. *Journal of Pure and Applied microbiology* 10(3):1735-1744.
- Webster, RK., Gunnell PS. (eds.) 1992. Compendium of Rice Diseases. St. Paul, Minnesota, USA, The American Phytopathological Society 92 pp.
- Zin, NA., Badaludinn, NA. 2020 Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann Agric Sci*;65(2):168-78.

## ANEXO

### Cultivos Diales crecimiento radial (cm):

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>e</sup>	R <sup>s</sup>	Aj	CV
CR 24hs	12	0,60	0,46	9,18	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,37	3	0,12	4,07	0,0498
Tratamiento	0,37	3	0,12	4,07	0,0498
Error	0,24	8	0,03		
Total	0,61	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45250

Error: 0,0300 gl: 8

#### Tratamiento Medias n E.E.

1	2,10	3	0,10	A
3	1,92	3	0,10	A B
2	1,91	3	0,10	A B
4	1,61	3	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>e</sup>	R <sup>s</sup>	Aj	CV
CR 48 hs	12	0,63	0,49	13,16	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,49	3	1,16	4,50	0,0394
Tratamiento	3,49	3	1,16	4,50	0,0394
Error	2,07	8	0,26		
Total	5,56	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,32997

Error: 0,2587 gl: 8

#### Tratamiento Medias n E.E.

1	4,80	3	0,29	A
2	3,56	3	0,29	A
4	3,56	3	0,29	A
3	3,54	3	0,29	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>e</sup>	R <sup>s</sup>	Aj	CV
CR 72 hs	12	0,70	0,58	18,12	

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14,41	3	4,80	6,11	0,0182
Tratamiento	14,41	3	4,80	6,11	0,0182
Error	6,28	8	0,79		
Total	20,69	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,31723

Error: 0,7854 gl: 8

#### Tratamiento Medias n E.E.

1	6,73	3	0,51	A
3	4,53	3	0,51	A B
2	4,44	3	0,51	A B
4	3,85	3	0,51	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Cuadro 6. Capacidad de inhibición del crecimiento por competencia de los tratamientos a las 24, 48 y 72 hs.