

Artículo Original

Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp frente a *Phytophthora cinnamomi*, fitopatógeno de *Persea americana* (Palta)

In vitro antagonistic capacity evaluation of *Trichoderma* spp strains against *Phytophthora cinnamomi*, phytopathogen of *Persea americana* (Palta)

Ebeling M. Morales T. ¹, Mirko D. Lino N. ², Eddy Ortega R. ³, Pedro L. Castellanos S. ²

Recibido: 09/04/2020 Aceptado: 04/08/2020 Publicado: 31/08/2020

RESUMEN

Phytophthora cinnamomi es un fitopatógeno reportado como el agente causal de la pudrición radicular del palto en el Perú. En este estudio se evaluó la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp aisladas de la rizósfera de un cultivo de paltos del distrito de Quilmaná, Cañete. Para la evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de las cepas aisladas se utilizó la técnica de cultivo dual en donde se midió los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *P. cinnamomi*. Del total de cepas aisladas, 3 (P1.1, P4.9 y P5.3) presentaron mayores PICR con 53,86, 56,24 y 60,49 % respectivamente. La identificación molecular indicó que las cepas P4.9 y P1.1 presentan un 99,66 y 100% de similitud con *Trichoderma asperellum* mientras que la cepa P5.3 un 98,17% de similitud con *Trichoderma* spp, según el análisis BLAST. En base a los resultados obtenidos estas cepas de *Trichoderma asperellum* representan un potencial para ser utilizadas como agentes biocontroladores de *P. cinnamomi*. por lo que se recomienda realizar ensayo en campo.

Palabras clave: *Phytophthora cinnamomi*; antagonismo; fitopatógeno; *Trichoderma* spp; biocontrolador.

ABSTRACT

Phytophthora cinnamomi is a phytopathogen reported as the causative agent of avocado root rot in Peru. In this study, the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp native strains isolated from the avocado crop rhizosphere in Quilmaná, Cañete, was evaluated. For the *in vitro* evaluation of the antagonistic capacity of the isolated strains, the dual culture technique was used, where the percentages of radial growth inhibition (PICR) of *P. cinnamomi* were measured. Of the total isolates, 3 strains (P1.1, P4.9 and P5.3) presented higher PICR with 53.86, 56.24 and 60.49% respectively. Molecular identification indicated that strains P4.9 and P1.1 show 99.66 and 100% similarity to *Trichoderma asperellum*, while strain P5.3, 98.17% similarity to *Trichoderma* spp, according to BLAST analysis. Based on the results obtained, these *Trichoderma asperellum* strains represent a potential to be used as biocontrol agents of *P. cinnamomi*. therefore, it is recommended to carry out a field trial.

Keywords: *Phytophthora cinnamomi*; antagonism; phytopathogen; *Trichoderma* spp; biocontrol.

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Micología Aplicada. Lima, Perú.

Autor para correspondencia: ebeling.morales@unmsm.edu.pe

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Micología Aplicada. Lima, Perú.

³ Vivero Los Viñedos, Laboratorio de Biología Molecular. Chincha, Ica, Perú.

Citar como:

Morales, E., Lino, M., Ortega, E. y Castellanos, P. (2020). Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp frente a *Phytophthora cinnamomi*, fitopatógeno de *Persea americana* (Palta). *Ciencia e Investigación* 2020 23(1):65-70. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/ci.v23i1.18754>

INTRODUCCIÓN

El Perú actualmente es el tercer exportador de “palta”, *Persea americana*, a nivel mundial. Este producto se ha constituido en el 2018 en el principal rubro de agro exportación del Perú, con una perspectiva de expansión muy ambiciosa y que va ayudar al desarrollo de la agricultura nacional y fortalecer el ingreso del trabajador rural¹. Sin embargo, este cultivo es sensible a diversas plagas como insectos, hongos o bacterias, que de no controlarse afectarían su producción de forma significativa. La podredumbre de raíces causada por *Phytophthora cinnamomi* es posiblemente la enfermedad más devastadoras que afecta a los cultivos de palta en el mundo, por ejemplo en México, *P. cinnamomi* está presente en todas las principales áreas productoras de palta, con incidencias que varían entre 5 – 90%; en California, en 1989, el número de cultivos infestados en algunas áreas alcanzó rangos entre 60 – 90%².

Numerosos fungicidas de origen químico son aplicados para el control de diferentes especies de *Phytophthora spp*³ pero sus efectos a la largo plazo son peligrosos sobre la salud y el ambiente; además de generar resistencia al fungicida por parte de los fitopatógenos^{4,5}, esto ha provocado una búsqueda de alternativas sustentables para la agricultura actual. Por ello, surge la importancia de aislar y seleccionar hongos con potencial utilidad como agentes para biocontrol (BCA). Los hongos del género *Trichoderma* han sido identificadas como potenciales agentes biocontroladores de diversos fitopatógenos⁶ Esto ha generado que durante los últimos años, varios investigadores y empresas han mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* del suelo como controlador biológico de patógenos⁷ pues presentan diversos mecanismos de acción como la producción de enzimas extracelulares, sustancias antibióticas y compuestos antifúngicos, además de ser fuertes competidores por espacio y nutrientes, lo que les permite proliferar en diferentes ambientes⁸. Además estudios recientes han mostrado que *T. asperellum* es un promisorio y efectivo agente controlador de *Phytophthora spp*^{9,10}, por lo que diversos estudios han procurado la selección e identificación molecular de estas cepas¹¹.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad antagonista de cepas nativas de *Trichoderma spp.* frente a *P. cinnamomi*, fitopatógeno del *Persea americana* (palta).

MATERIALES Y MÉTODOS

Phytophthora cinnamomi.

El fitopatógeno *Phytophthora cinnamomi* (aislado de cultivo de palto) fue proporcionado en ceparios por la Clínica de Fitopatología de la Universidad Agraria La Molina. La cepa fue repicada en agar papa dextrosa (APD) a pH 5.5 y conservada a temperatura entre 24 a 28°C, la cual se utilizó en los ensayos posteriores.

Muestreo y aislamiento de cepas de *Trichoderma spp.*

Se colectaron muestras de suelo de la rizósfera de una hectárea de cultivo de palta ubicada en el distrito de Quilmaná, provincia de Cañete.

Se tomaron 5 muestras de 100 gramos a 15 cm de profundidad a nivel de la rizósfera de paltos sanos. En los puntos de muestreo se evaluaron parámetros como el pH y temperatura, empleando un potenciómetro portátil y un termómetro digital respectivamente. Las muestras de suelo fueron colocadas en bolsas ziploc y transportadas en coolers al laboratorio de Micología Aplicada de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y se procesaron dentro de las 24 horas. El procedimiento de aislamiento se realizó siguiendo la recomendación de Corallo (2012) para ello 10 g de cada muestra se diluyeron en 90 mL de solución salina al 0,85% que es lo recomendado para mantener la viabilidad de las células. De esta dilución se inoculó 1 mL en placas con agar papa dextrosa (APD) a pH 5,5 con gentamicina (0,05mg/mL) como inhibidor del crecimiento bacteriano y se sembraron por diseminación. Cada muestra se sembró en 10 placas, los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (24 – 28°C) durante 10 días. A continuación se seleccionaron las colonias características del género *Trichoderma*, se tomaron porciones de micelio y sembraron en nuevas placas que contenían APD, dejándolas en incubación durante 7 días. Se realizó 3 repiques sucesivos para asegurar la pureza de las cepas.

Identificación a nivel de género de las cepas aisladas de *Trichoderma spp.*

Para la identificación a nivel género se observaron las características macroscópicas como el color, forma y crecimiento del micelio, para ello se las dejó crecer en agar papa dextrosa durante 10 días. Mediante la técnica de Microcultivo se evaluaron las características micromorfológicas como tipo de conidiogénesis, disposición y forma de los conidios y presencia/ausencia de clamidosporas. Se empleó las claves taxonómicas del libro *Trichoderma and Gliocladium* Volumen. Basic biology, taxonomy and genetics¹⁴.

Ensayo de antagonismo.

Previamente las cepas en estudio (antagonista y fitopatógeno) fueron sembradas en APD, de ellos se obtuvieron bloques circulares de 5 mm para el ensayo. Se empleó la técnica de cultivos duales, para tal fin, en una placa con APD se colocaron los bloques en 2 puntos equidistantes, 5cm uno del otro, y para el control se colocó solamente la porción de *P. cinnamomi*. El proceso se realizó por triplicado y para las 31 cepas aisladas. Se dejó incubar durante 8 días a temperatura ambiental (24- 28°C). Pasado el tiempo de incubación se determinó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), para ello se tomaron las medidas radiales en ángulo recto tanto del fitopatógeno y del antagonista y se seleccionaron las tres cepas con mayor PICR¹⁵.

El Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

Donde:

R1: Radio del crecimiento del micelio del fitopatógeno control (mm).

R2: Radio del crecimiento del micelio del fitopatógeno enfrentado al antagonista (mm).

Identificación molecular de hongos con mayor actividad antagonista.

Para la extracción del ADN, previamente las cepas de *Trichoderma* spp fueron cultivadas en APD e incubadas por 7 días a temperatura del ambiente. 100 g de la biomasa obtenida se utilizó para la extracción empleando el kit de extracción de ADN NucleoSpin Plant II de Macherey – naguel (Alemania), con ligeras modificación en la lisis, para lo cual el micelio se pulverizó con nitrógeno líquido y con ayuda de un mortero. Posteriormente los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% empleando espectrofotómetro de IBI Scientific (USA).

Se amplificaron las regiones ITS, para ello se emplearon los *primers* ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTTCGTAACAA-GG) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) ¹⁶. El procedimiento utilizado consistió en una desnaturación a 94°C durante 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturación a 94°C durante 30 segundos, alineamiento a 55°C durante 45 segundos, luego una extensión a 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos ¹⁷. Los tamaños de amplificación esperados fueron comparados con un marcador de tamaño molecular menor a 1500 pares de bases (bp) (GenerDix – USA) por electroforesis en gel de agarosa al 2% con Red SAFE (Intron Biothechnology – Korea) y el buffer de carga se preparó con DNA Loading 6X Dye (ABM – Canadá).

Las secuenciación fue realizada bajo el método de capilares SANGER por Bio Basic Inc (Canadá) y el análisis

se realizó con el software online Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National center Biotechnology Information) - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software STATISTICA versión 10 para comparar el PICR de las tres cepas seleccionadas, verificando así si existen diferencias significativas. Posteriormente se realizó la prueba de HSD-Tukey ($p < 0,05$) para seleccionar la o las cepas que presentaron diferencias significativas.

RESULTADOS

A partir de los aislamientos realizados se seleccionaron 31 cepas que, por sus características morfológicas y culturales se ajustaron a las descritas para el género *Trichoderma*, de acuerdo a las claves taxonómicas del libro *Trichoderma and Gliocladium* volumen 1: Basic biology, taxonomy and genetics. La temperatura de los puntos de muestreo variaron entre 23,5 y 24,4 °C y el pH de los suelos muestreados variaron entre 5,5 y 6,0.

Las características macroscópicas que presentaron todas las cepas de *Trichoderma* spp. fueron micelio aéreo, inicialmente blanco algodonoso que con el transcurrir de los días cambiaba a verde oscuro o en algunos casos a amarillo oscuro, ello debido a la abundancia de conidias (Figura 1C).

Microscópicamente se observaron conidióforos hialinos ramificados en forma piramidal de donde surgían las fialides en verticilos de 2 ó 3. Se observaron conidios o esporas asexuales unicelulares, ovoides (Figura 1A). Además se observaron clamidosporas terminales e intercalares globosas, las cuales son estructuras de resistencia que le confiere a estos hongos la capacidad de sobrevivencia bajo condiciones adversas (Figura 1B).

El ensayo de antagonismo de las 31 cepas de *Trichoderma* spp aisladas mostró variaciones en el porcentaje de la inhibición del crecimiento radial (PICR) de *P. Cinnammomi* entre el 20.1% a 60.49%; de ellas 12 cepas de *Trichoderma* spp inhibieron por encima del 50% el crecimiento del micelio de *P. cinammomi*. Los mayores PICR se obtu-



Figura 1. (A) Conidios y conidióforos de *Trichoderma* sp. vistas al microscopio (40x). (B) Clamidosporas de *Trichoderma* sp. vistas al microscopio (40x). (C) Crecimiento de *Trichoderma* sp. en APD.

vieron al enfrentar el fitopatógeno con las cepas de *Trichoderma* spp codificadas como P1.1, P4.9 Y P5.3 (53.86, 56.24 y 60.49% respectivamente) (Tabla 1).

La prueba ANOVA de las cepas de *Trichoderma* sp. P1.1, P4.9 Y P5.3 mostró diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (Tabla 1). El análisis de HSD - Tukey permitió seleccionar a la cepa P5.3 como la de mayor PICR con una diferencia significativa comparada con la cepa P1.1.

Mediante PCR se obtuvieron productos amplificados cercanos a los 500 pb tanto para las cepas P1.1, P4.9 Y P5.3, y el análisis de las secuencias de nucleótidos realizado mediante BLAST mostró una homología del 99.66% para la cepa P4.9 y 100% para la cepa P1.1 con secuencias correspondientes a cepas de *Trichoderma asperellum*. Para el caso de la cepa P5.3 mostró una homología del 98.17% al género *Trichoderma* spp. (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Del proceso de aislamiento de la rizósfera de cultivos de palto de un fundo en Cañete se lograron aislar e identificar 31 cepas que correspondían a las características de *Trichoderma* spp, esta cantidad de aislamientos fue favorecido por el menor uso agroquímicos para el control de

plagas de palto; a diferencia de los obtenido por Guerrero (2016), quien aisló solo 12 cepas de *Trichoderma* spp de la rizósfera de plantas de un cultivo de tomate en La Plata, debido al uso de agroquímicos de elevada toxicidad como Diclorvos (DDVP), Ipridone, entre otros¹⁹.

Por otro lado, Roiger et al. (1991) indicaron que en suelos donde el pH es mayor a 6.0 las esporas presentan mejor resistencia. En este estudio los valores de pH del suelo donde se tomaron las muestras variaron entre los rangos de 5,5 a 6,0. Otro factor que se debe considerar en el desarrollo de *Trichoderma* spp es la temperatura. De acuerdo a Castro et al. (2014) el rango que favorece el crecimiento de *Trichoderma* sp está entre 15 y 30°C dentro del cual se encontraron las muestras de suelo aisladas para este estudio; además se trabajó en un ambiente con temperatura entre 24 a 28°C.

Todas las cepas aisladas de *Trichoderma* sp. presentaron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *P. cinnamomi* en el medio de cultivo sólido, esto debido a un crecimiento más abundante, que limitaba el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*. Según Castro et al. (2014) las cepas de *Trichoderma* spp son excelentes competidores por espacio y nutrientes; además son muy versátiles para emplear diversos sustratos como fuente de carbono

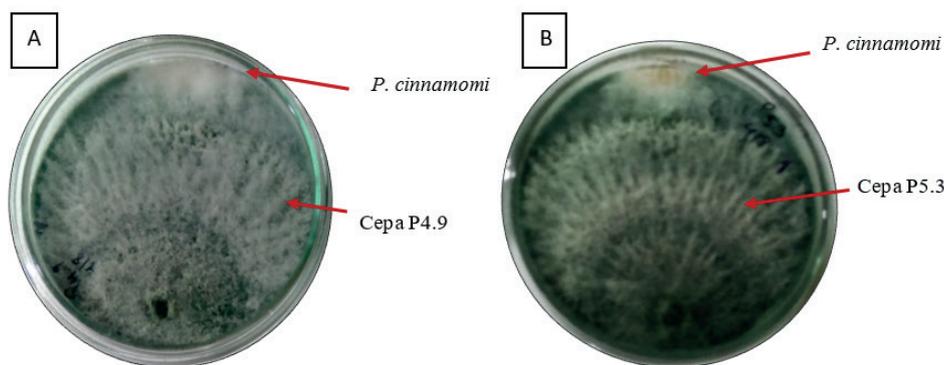


Figura 2. (A) Enfrentamiento mediante cultivo dual entre *P. Cinnamomi* y la cepa P4.9. (B) Enfrentamiento mediante cultivo dual entre *P. Cinnamomi* y la cepa P5.3.

Tabla 1. Análisis de ANOVA para PICR de *P. Cinnamomi* frente a 3 de las cepas de *Trichoderma* spp.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	29103.22	1	29103.22	4972.369	0.000000
CEPAS	67.70	2	33.85	5.783	0.039850
Error	35.12	6	5.85		

* Indica que existe diferencia significativa con p< 0.05

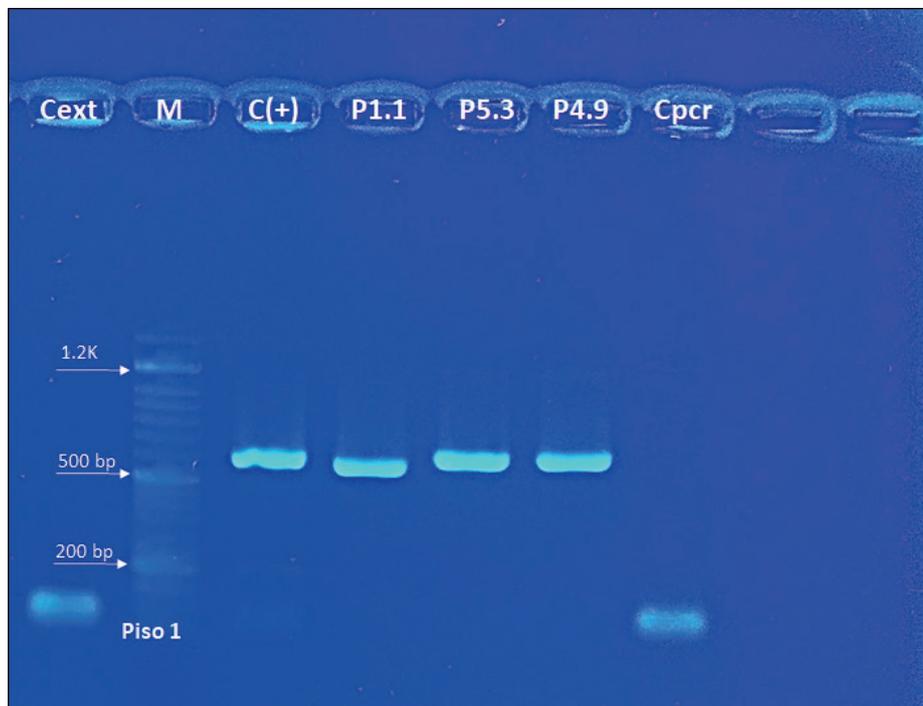
Tabla 2: Prueba de Tukey HSD para el PICR de *P. Cinnamomi* frente a 3 cepas de *Trichoderma* spp. (MS=5.8530 Y Df = 6.00).

	CEPAS	{1}	{2}	{3}
1	P5.3		0.159018	0.035365
2	P4.9	0.159018		0.493909
3	P1.1	0.035365	0.493909	

* Indica que existe diferencia significativa pues p< 0.05

Tabla 3. Descripción del origen y similitudes encontradas según el análisis BLAST.

cepa	origen de la cepa/año	identificación	homología	cepa referente
P4.9	Cultivo de palta-Cañete/2018	<i>Trichoderma asperellum</i>	99.66%	CCTCC:AV420 (GenBank: KT588247.1)
P1.1	Cultivo de palta-Cañete/2018	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	MPSf8 (GenBank:KP760065.1)
P5.3	Cultivo de palta-Cañete/2018	<i>Trichoderma</i> sp.	98.17%	UACH143 (GenBank:MG966413.1)

**Figura 3.** Perfiles de muestras de ADN amplificadas de aislados de *Trichoderma* sp. usando ITS 4 e ITS 6. C (+): Cepa control de propiedad de Vivero los Viñedos.

y nitrógeno, ello le favorece tener crecimiento acelerado en un medio, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat. Además tienen la capacidad de producir una amplia gama de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que inhiben el desarrollo de otros microorganismos y defensa de la planta, destacando diterpenos, tetracíclicos, sesquiterpenos, entre otros ²⁷.

En un estudio reciente realizado por Sánchez *et al.* (2019) donde evaluaron la capacidad antagonista de cepas aisladas de *Trichoderma* spp contra cuatro especies de *Phytophthora* sp obtuvieron 18 cepas que inhibieron, mediante la técnica de cultivo dual, entre el 38 % al 65 % el crecimiento del micelio de los fitopatógenos. En el presente estudio, 12 cepas de *Trichoderma* spp inhibieron entre el 50% a 60.49% el crecimiento de *P. cinnamomi* de las que se seleccionaron 3 con los mayores porcentajes de inhibición; demostrando así el poder antagonista de las cepas seleccionadas. Esto se ve reforzado por diversas investigaciones que respaldan la alta actividad antagonista *in vitro* de *Trichoderma* spp frente a patógenos de plantas ^{21, 22, 23}.

De las 3 cepas seleccionadas, el análisis de la secuencia de nucleótidos realizado mediante BLAST mostró una

homología del 99.66 % para la cepa P4.9 y 100% para la cepa P1.1 con secuencias reportadas para *Trichoderma asperellum*. Esto concuerda con lo reportado por Sánchez *et al.* (2017). La cepa P5.3 presentó una homología del 98.17% con secuencias reportadas para el género *Trichoderma*, confirma la identificación a nivel de género mediante la técnica de Microcultivo y empleando las claves taxonómicas. La identificación de *Trichoderma* spp empleando técnicas moleculares, mediante la amplificación de regiones ITS 1 e ITS 2 también fue realizada por diversos autores ^{25,26}. Investigaciones realizadas por Guijón *et al.* (2010), Raut *et al.* (2017), demuestran que especies de *Trichoderma asperellum* presentan buena actividad antagonista frente a diversos patógenos de plantas como *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Phymatotrichopsis omnívora* y *Fusarium* sp.

CONCLUSIÓN

De la rizósfera de un cultivo de paltos fueron aislados 31 cepas de *Trichoderma* spp, de las cuales 3 cepas (P1.1, P4.9 y P5.3) fueron seleccionadas por presentar los mayores porcentaje de inhibición contra *P. cinnamomi*. Las cepas P1.1 y P4.9 fueron identificadas como *Trichoderma asperellum* mientras que la cepa P5.3, *Trichoderma* sp. Se recomienda profundizar los distintos meca-

nismos de acción de las cepas seleccionadas frente a este fitopatógeno y continuar con ensayos en campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ministerio de Agricultura y Riego. La situación del mercado internacional de la palta, su análisis desde una perspectiva de las exportaciones peruanas: Documento de análisis económico; 2019 enero; Lima, Perú.
- Pérez R. Significant avocado Diseases caused by fungi and oomycetes. Eur. J. Plant Sci. Biotechnol. 2008; 2(1): 1-24.
- Rebollar A, Madden L, Ellis M. Pre- and Post-Infection Activity of Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Mefenoxam, and Phosphite Against Leather Rot of Strawberry, Caused by *Phytophthora cactorum*. Plant Dis. 2007; 91 (5): 559-64.
- Grünwald NJ, Sturbaum AK, Romero G, Garay E, Lozoya H, Fry W.E. Selection for Fungicide Resistance Within a Growing Season in Field Populations of *Phytophthora infestans* at the Center of Origin. Phytopathology. 2006; 96(12): 1397-1403.
- Jeffers SN, Schnabel G, Smith JP. First Report of Resistance to Mefenoxam in *Phytophthora cactorum* in the United States and Elsewhere. Plant Dis. 2004; 88(5): 576.
- Herrera E, Alejo JC, Ramos JA. *Trichoderma* strains as growth promoters in *Capsicum annuum* and as biocontrol agents in *Meloidogyne incognita*. Chilean JAR. 2017; 77(4): 328-24.
- Tovar JC. Evaluación de la capacidad antagonista "in vivo" de aislamientos de *Trichoderma* spp frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. [Tesis para optar el grado de Microbiólogo Agrícola y Veterinario]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
- Castro AM, Rivillas CA. *Trichoderma* spp. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café: Boletín Técnico Cenicafe; 2014 dic; Caldas, Colombia; Cenicafe; 2012.
- Cheng CH, Yang CA, Peng K.C. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* Mycelium in Culture Conditions. Phytopathology. 2012; 102(11): 1054-63.
- Kuzmanovska B, Rusevski R, Jankulovska M, Oreshkovikj KB. Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. Chilean JAR. 2018; 78(3): 391-99.
- Sanchez AD, Ousset MJ, Sosa MC. Biological control of *Phytophthora collar* rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. Biocontrol. 2019; 135 (2019): 124-34.
- Corallo B. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. antagonistas del patógeno de sorgo *Fusarium nygamai*. [Tesis para optar el título en Licenciatura en Ciencias Biológicas]. Montevideo: Universidad de la República; 2012.
- Arias EL, Piñeros PA. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. [Tesis para optar el título de Microbiólogas Industriales]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
- Gams W, Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. En: Kubicek CP y Harman GE, editors. *Trichoderma* and *Gliocladium*. New York, USA: Taylor & Francis; 2002. p. 3-34.
- Astorga K, Meneses K, Zúñiga C, Brenes J, Rivera W. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnol Marcha. 2014; 27(2): 82-91.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press Inc; 1990. p. 315-22.
- Ortega E. Detección de *Phytophthora cinnamomi* en raíces de *Persea americana* "palto" por NESTED-PCR. [Tesis para optar el título profesional de Microbiólogo Parasitólogo]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
- Guerrero R. Selección y efectividad del uso de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control del Cancro Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). [Tesis para optar el título de Magister en Protección Vegetal]. La Plata: Universidad Nacional La Plata; 2016.
- Fernandez V, Del Pino M Caracterización de los qgroquímicos usados en los cultivos hortícolas de La Plata en relación a las Buenas Prácticas Agrícolas. En: XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura: 5 - 8 de octubre de 2015, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Horticultura; 2015. P. 128.
- Roiger DJ, Jeffers SN, Caldwell RW. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. Soil Biol Biochem. 1991; 23 (4): 353-59.
- Soma N, Anjanadevi I, Sukumari V, Alias S, Lajapathy M, Jhon KS, et al. Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus* – a polyphasic approach. Biocontrol. 2015; 90: 164-72.
- Sriwati R, Melnick R, Bailey B. *Trichoderma* from Aceh Sumatra reduce *Phytophthora* lesions on pods and cacao seedlings. Biolcontrol. 2015; 89 (2015): 33-41.
- Raut J, Oancea F, Belén A, López T, Calin M, Constantinescu D, et al. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against *Phytophthora parasitica*. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies. 2017; 21: 179-82.
- Sánchez B, Espinoza E, Villordo E, Rodríguez R, Mora M. Identificación Molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrociencia. 2017; 51 (1): 63-79 .
- Valiente M, Pavone D. Identificación de cepas del hongo *Trichoderma* spp. por métodos moleculares. Faraute de Ciencias y Tecnología. 2013; 8(2): 5-9.
- Guijón C, Guerrero V. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Rev. Mex. fitopatol. 2010; 28(2): 87-96.
- Hernández D, Ferrera R, Alarcón A. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean J. Agric. Amin. Sci. 2019; 35(1): 98-112.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Autofinanciado.