Diagnóstico fitosanitario

CEPAS DE *TRICHODERMA* SPP. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC.

Sueli Corrêa, M. Mello,[1] Zilá R. Ávila,[2] Leonardo Minaré Braúna,[1] Raquel R. Pádua[1] y Diogo Gomes[2]

[1]*Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología, CP. 02372 CEP 70770-900, Brasília, DF, smello@cenargen.embrapa.br.*

[2]*Bolsista-CNPq–Faculdades Integradas da Terra, Q203 Área Especial lote 2, CEP 72610-300, Recanto das Emas, DF.*

RESUMEN

En Brasil se ha registrado la ocurrencia de Sclerotium rolfsii *Sacc. en diversos cultivos incluido el de soya (*Glycine max *L.). Informaciones de literatura indican que el uso del control biológico ofrece perspectivas para disminuir las poblaciones del patógeno. Este trabajo tuvo como objetivo enriquecer la colección de hongos para control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología con nuevos aislamientos de* Trichoderma*, identificados a nivel específico y seleccionar aquellos con potencial para el control de* S. rolfsii*. La prospección de cepas nativas de* Trichoderma *se desarrolló en áreas agrícolas de la región de Brasilia (DF). Se identificaron 20 cepas pertenecientes a las especies* T. aureoviride*,* T. harzianum*,* T. crassum *y* T. viride*. La cepa CEN219, indicada como perteneciente a la especie* T. harzianum*, se aisló de una muestra de un producto comercial. El aislado* S. rolfsii *(CEN216) utilizado en los ensayos se obtuvo de la colección de hongos fitopatógenos de Embrapa Cerrados. La inhibición del crecimiento radial de* S. rolfsii *se estudió* in vitro*, en cultivo dual y mediante incorporación de filtrado de colonias de* Trichoderma *al medio de agar-papa-dextrosa (BDA), donde se sembró el patógeno. El potencial de control biológico de las cepas también se estudió* in vivo*. En general, las cepas más eficientes en las pruebas de inhibición fueron también las que presentaron mejor actividad supresora sobre* S. rolfsii *en plantas de soya.*

Palabras claves: *Glycine max, control biológico, caída de plántulas*

ABSTRACT

The fungus Sclerotium rolfsii *Sacc., is a widespread soil-born pathogen in Brazil, attacking a large number of cultivated plants including soybean (*Glycine max *L.). Literature information has indicated the use of* Trichoderma *species as a viable alternative for reducing the pathogen populations. This work was carried out with the objective of enriching the Culture Collection of Fungi for Biocontrol of Plant Pathogens from Embrapa Genetic Resources and Biotechnology with new* Trichoderma *spp. isolates identified at species level and to select isolates for reducing the harmful effect of the pathogen. Twenty isolates, belonging to the species* T. aureoviride*,* T. harzianum*,* T. crassum *and* T. viride*, were collected from soil samples in cultured areas around Brasília (DF). The isolate (CEN219) indicated as* T. harzianum *species was obtained from a commercial formulation. The S. rolfii isolate (CEN216) used in the essays was obtained from the collection of Embrapa Cerrados. Inhibition of the mycelial growth of the pathogen isolate was studied in vitro by dual culture method and by the incorporation of culture filtrate of* Trichoderma *at potato-dextrose-agar media previous to sow the pathogen. The potential of biological control of the isolates was also studied in vivo. In general, isolates that performed high mycoparasitic activity in vitro assay also demonstrated good reduction of the disease in greenhouse.*

Key words: *Glycine max, biological control, damping off*

INTRODUCCIÓN

***S**clerotium rolfsii* Sacc. es un hongo patógeno de suelo que afecta alrededor de 500 especies en 100 familias botánicas [Ferreira y Boley, 1992] en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y causa los síntomas de caída de plántulas, podredumbres de parte baja del tallo y raíces y marchitamiento. En Brasil su distribución es muy amplia y puede ocasionar pérdidas considerables en diversos cultivos, entre los que se destaca la soya (*Glycine max* L.). La supervivencia del patógeno en el suelo es de extrema importancia epidemiológica y está relacionada a la formación de esclerocios, que permanecen viables por varios años, en condiciones de baja humedad con amplio rango de pH y temperatura [Polanco y Castro, 2005]. Por otra parte, la actividad miceliar de este microorganismo es bastante elevada en sustratos vegetales en proceso de descomposición [Pineda y Polaco, 2005]. En este aspecto, la incorporación de material orgánico al suelo incrementa

el potencial de inóculo, lo que constituye un serio problema, especialmente en áreas donde la rotación se hace basada en la alternancia de cultivos susceptibles.

Aunque los plaguicidas químicos son efectivos, tienen muchos atributos indeseables [Lima *et al*., 1997]. El control biológico de fitopatógenos constituye una alternativa para disminuir el potencial de inóculo del suelo sin traer riesgos al medio ambiental. Dentro de los microorganismos más utilizados en el control biológico están los hongos del género *Trichoderma*, los que todavía son objeto de investigación y desarrollo en muchos países [Agrawal *et al*., 1977; Wells *et al*., 1972; Mukherjee y Raghu, 1997; Tsahouridou y Thanassoulopoulos, 2002; Pérez, 2005; Polanco y Castro, 2005].

Especies de *Trichoderma* se han reportado como hiperparásitos de un gran número de hongos fitopatógenos al atacar directamente y producir la lisis de micelios y también de esclerocios de hongos [Benhamou y Chet, 1996]. Los resultados de Lima *et al*. (1997) evidenciaron la acción de una quitinasa en la pared celular de *S. rolfsii* y de *Rhizoctonia solani*. El-Katatny *et al*. (2001) demostraron la actividad de enzimas quitinasa y ß-1,3-glucanasa contra *S. rolfsii* en medio de cultivos con las enzimas purificadas a partir de filtrados de colonia del antagonista. Otros importantes mecanismos de acción que usan estos hongos, en dependencia de la especie y aun de la cepa utilizada dentro de una especie, están relacionados con la secreción de diversos antibióticos, competencia por nutrientes y espacio, inducción de resistencia en la planta y tolerancia a estrés [Harman, 2000; Howell, 2003]. Tales mecanismos pueden operar de manera independiente o simultánea en las interacciones microbianas [Howell, 2003]. Por otra parte, la efectividad en controlar un hongo fitopatógeno en particular puede variar para un aislamiento del antagonista en la medida de su peculiaridad en termos de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas [Dennis y Webster, 1971a; 1971b].

El objetivo del presente trabajo fue enriquecer la colección de hongos para control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología, con nuevos aislamientos de *Trichoderma* identificados a nivel específico, y seleccionar aquellos con potencial para control de *S. rolfsii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de cepas de *Trichoderma* y de hongo fitopatógeno

Se desarrolló una prospección de cepas nativas de *Trichoderma* en áreas agrícolas (Cooperbrás) de la región del Distrito Federal en Brasil. Las muestras se procesaron según el método de diluición seriada [Dhingra y Sinclair, 1981] en medio de Martin (1950) modificado por Homechin (1987), y las identificaciones y descripciones de las cepas obtenidas se realizaron de acuerdo con claves disponibles en la literatura correspondiente [Gams y Bisset, 1988; Samuels, 2005]. La cepa CEN219 indicada como perteneciente a la especie *T. harzianum* se aisló de una muestra de un producto comercial. Para los ensayos del biocontrol se utilizó un aislado representativo del patógeno (CEN216) cedido por el sector de fitopatología de Embrapa Cerrado.

Evaluación del antagonismo al hongo *S. rolfsii* por las cepas aisladas *Trichoderma* spp. en cultivo dual

El antagonismo al hongo *S. rolfsii* se evaluó con las cepas aisladas de *Trichoderma* spp. en cultivo dual. En las pruebas *in vitro* se siguió el método de cultivo dual de acuerdo con Dennis y Webster (1971a) y se utilizó el medio de agar-papa-dextrosa (BDA). Para cada aislamiento se establecieron cuatro réplicas. La incubación se realizó a 25°C. Para las evaluaciones se tomaron las medidas de diámetro de colonias después de 120 h de incubación y mediante observaciones de la formación de una zona de demarcación entre los inóculos. Se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula

$$PICR \quad \frac{R1 - R2}{R1} \; x \; 100$$

donde:

R1: Diámetro del testigo

R2: Diámetro del organismo ensayado

También se compararon las cepas con respecto a la capacidad antagonista, de acuerdo con la escala de notas establecida por Bell *et al*. (1982):

Clase	Características
Clase 1	Sobrecrecimiento de *Trichoderma*, que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno
Clase 2	Sobrecrecimiento de *Trichoderma*, que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio
Clase 3	*Trichoderma* y patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3). Uno no se sobrepuso al otro

Clase 4 Hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión por *Trichoderma*

Clase 5 Sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio

Evaluación del antagonismo a *S. rolfsii* mediante incorporación de filtrado de colonias de *Trichoderma* al medio

Para las pruebas de producción de sustancias difusibles por las cepas aisladas de *Trichoderma* se utilizó el método descrito por Agrawal *et al.* (1977) con algunas modificaciones, que consistieron en el cultivo de los aislados en medio líquido de batata-dextrosa (BD) por 12 días con agitación constante (50 rpm) sin presencia de luz y temperatura de 25°C. Después de este período de incubación la parte líquida se colectó en papel de filtro y posteriormente esterilizada por filtración en membrana milipore de 0,45 µm. El filtrado se adicionó al medio BDA en la proporción de 25% (v/v). Para cada aislamiento de *Trichoderma* se establecieron cuatro réplicas. Las placas de Petri con el medio se inocularon en su centro con discos de micelio de *S. rolfsii*. La incubación se realizó a 25°C, y cuando toda la superficie de las placas del testigo (colonias *S. rolfsii* crecidas en ausencia de filtrado de *Trichoderma*) se presentó colonizada por el hongo patógeno se realizó la medición de su crecimiento radial.

Evaluación del antagonismo de las cepas obtenidas de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* en casa de cultivo

Para la preparación de inóculo se utilizaron discos de micelio de los hogos antagonistas y fitopatógenos, los que se retiraron de la periferia de colonias cultivadas en BDA por cinco días y se colocaron en frascos que contenían granos de arroz humedecidos con agua destilada (60% p/v) y esterilizados a 120°C por 20 min. La incubación se realizó a 25°C y 12 h diarias de luz durante seis días.

En vasos de 500 g de capacidad con suelo fertilizado y esterilizado se adicionaron 2,5 g de granos de arroz colonizado por cada hongo (*S. rolfsii* y *Trichoderma)*. Para cada aislamiento de *Trichoderma* se establecieron cuatro réplicas; también se establecieron tratamientos sin inóculos *de S. rolfsii*, sin *Trichoderma* y sin ninguno de ambos, para servir como testigos. Seguidamente el suelo se humedeció y se mantuvo sin nuevos riegos por 24 h. Entonces se realizaron las siembras de las semillas de soya de la variedad BRS Milena, a razón de seis semillas por vaso, las que se mantuvieron en la casa de cultivo a una humedad relativa alrededor de 80% y temperatura de 23-40°C. A los 15 días de sembradas las semillas se evaluó el número de plantas vivas.

Los datos obtenidos en las evaluaciones se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y las medias comparadas por la prueba de Tukey a un nivel de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de cepas de *Trichoderma* y de hongo fitopatógeno

Se identificaron 20 cepas, de las cuales 15 pertenecen a la especie *T. harzianum*. Las otras fueron *T. aureoviride* (2), *T. crassum* (2) y *T. viride* (1). La cepa 219 indicada como perteneciente a la especie *T. harzianum* se aisló de una muestra del producto comercial. Las cepas se incorporaron a la colección de hongos para control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología con sus respectivos códigos (*Tabla 1*).

Evaluación del antagonismo al hongo *S. rolfsii* por las cepas aisladas *Trichoderma* spp. en cultivo dual

Los resultados de la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* por el método de cultivo dual se presentan en la *Fig. 1* y en la *Tabla 1*. Todas las cepas inhibieron el crecimiento del hongo patógeno cuando se aislaron en cultivo dual, en la proporción de 18,97 hasta 44,12%, comparado con el crecimiento del testigo. Las cepas CEN220, CEN249, CEN260, CEN262 y CEN266 fueron las que presentaron actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *S. rolfsii* a las 120 h, por lo que recibieron calificación de *1* en la escala de clasificación de Bell *et al.* (1982). Una vez alcanzada la zona de demarcación entre los inóculos, estas cepas continuaron su crecimiento hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno, sobre el que produjeron esporas. También las cepas CEN199, CEN207, CEN219, CEN252, CEN254, CEN255 y CEN264 revelaron buenas potencialidades contra el patógeno ensayado, y recibieron calificación de *2* en la misma escala. De otra parte, las cepas CEN224, CEN250, CEN251, CEN263 y CEN265 aparentemente no ejercieron acción antagonista sobre el hongo patógeno, pues este avanzó sobre ellas al colonizar toda la superficie del medio.

Tabla 1. Cepas de *Trichoderma* spp. obtenidas de muestras de suelo colectadas en área agrícola de la región del Distrito Federal, Brasil, y su clasificación con respecto al antagonismo sobre *S. rolfsii* en cultivo radial

Código de registro	Especie	Clase*
CEN 199	*T. aureoviride*	2
CEN 207	*T. harzianum*	2
CEN 219	*T. harzianum*	2
CEN 220	*T. harzianum*	1
CEN 224	*T. harzianum*	5
CEN 249	*T. harzianum*	1
CEN 250	*T. harzianum*	5
CEN 251	*T. harzianum*	5
CEN 252	*T. crassum*	2
CEN 253	*T. harzianum*	4
CEN 254	*T. harzianum*	2
CEN 255	*T. harzianum*	2
CEN 258	*T. harzianum*	3
CEN 259	*T. harzianum*	4
CEN 260	*T. viride*	1
CEN 261	*T. harzianum*	4
CEN 262	*T. harzianum*	1
CEN 263	*T. harzianum*	5
CEN 264	*T. harzianum*	2
CEN265	*T. aureoviride*	5
CEN 266	*T. crassum*	1

*Clasificación en conformidad con la escala de Bell *et al.* (1982).

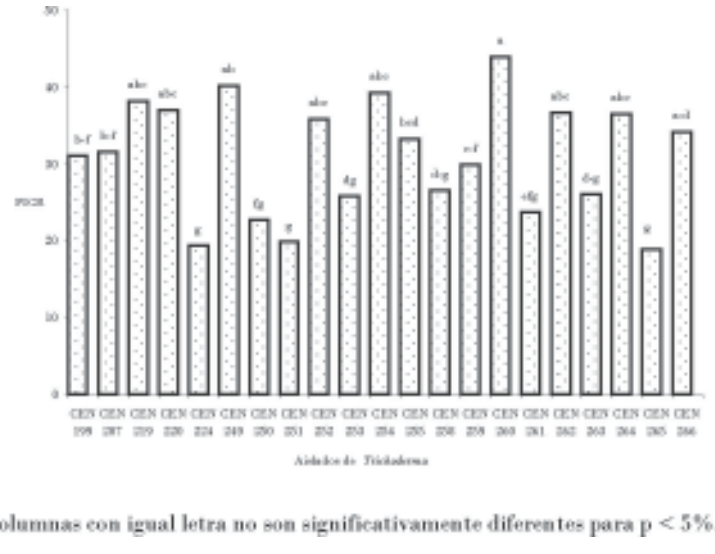


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de *S. rolfsii* en cultivo dual con *Trichoderma* spp. en el medio PDA después de 120 h de incubación a 25°C.

Evaluación del antagonismo a *S. rolfsii* mediante incorporación de filtrado de colonias de *Trichoderma* al medio

El porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* frente al testigo, a través de incorporación de filtrado de colonias, fue distinto con las cepas de *Trichoderma* ensayadas. El valor medio más elevado se obtuvo con la cepa CEN252 (PICR = 72,35%), que todavía no se diferenció de los valores obtenidos con CEN199, CEN260 y CEN266, que de otra parte no fueron diferentes de la CEN254 (*Fig. 2*). Las cepas CEN219, CEN220 y CEN249, que estuvieron entre las de buenas potencialidades contra el hongo patógeno en prueba anterior, no presentaron el mismo efecto en este ensayo, que no permite el contacto directo entre las hifas. Por lo tanto, se puede inferir probablemente que no hay acción por metabolitos tóxicos biológicamente difusibles en el medio de cultivo que recibió el filtrado de colonias de cualquiera de estas tres cepas.

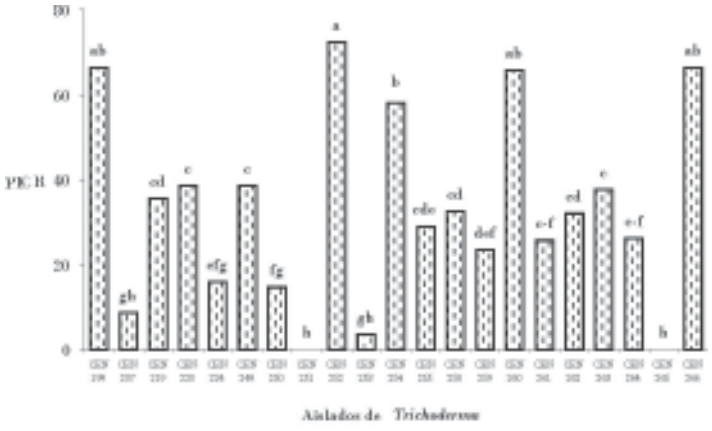


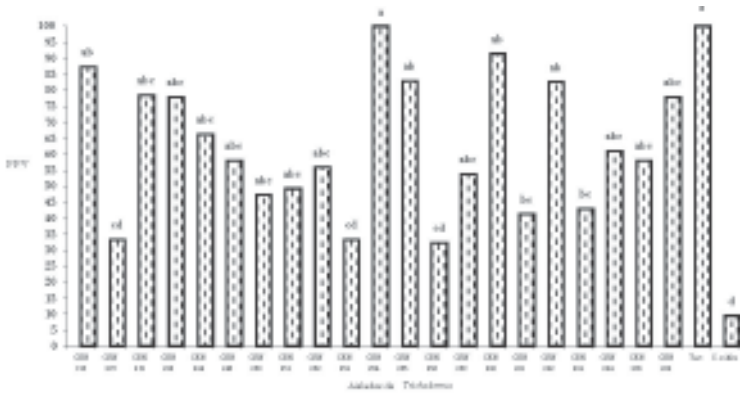
Figura 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *S. rolfsii* por filtrado de cepas de *Trichoderma* añadido al medio BDA.

Evaluación del antagonismo de las cepas obtenidas de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* en casa de cultivo

De acuerdo con la *Fig. 3*, hubo diferencia significativa con respecto a la capacidad de las cepas de *Trichoderma* de suprimir *S. rolfsii* en la prueba desarrollada en casa de cultivo. El tratamiento que recibió solo el hongo patógeno presentó más bajo porcentaje de plantas en la evaluación hecha 15 días después de sembradas las semillas. Por lo tanto, el tratamiento del suelo con *Trichoderma* redujo la enfermedad y promovió la germinación y supervivencia de las plantas en niveles, con variaciones entre 32 y 100%. El mejor resultado se alcanzó con la cepa CEN254, que no presentó diferencia frente al tratamiento con *Trichoderma* en la ausencia del hongo patógeno. El análisis de varianza no mostró diferencia significativa entre esta y otras 14 cepas, donde 10 mostraron valores medios de porcentaje de supervivencia de plántulas mayor que 60%.

Varios estudios sobre antagonismo de *Trichoderma* conducidos en el pasado no describieron el hongo con que se trabajó [Wells *et al.*, 1972]. Hay discordancia además entre taxonomistas con respecto a la clasificación del género *Trichoderma*. De acuerdo con el concepto de Bisset (1991), que incluye todos los hongos de la fase asexuada de *Hipocrea* en ese género, una clara definición morfológica para *Trichoderma* constituye un problema, pues la estructura de conidióforos es altamente variable y en muchos casos superficialmente semejan los géneros *Gliocladium* Corda o *Verticillium* Nees. Todo eso torna difícil diferenciar aislados en niveles de especie y dentro de una misma especie. No obstante, un análisis de características morfológicas permanece como primer recurso para la identificación de especies y utilizado en este trabajo, con base en las claves propuestas por Gams y Bisset (1998) y Samuels *et al.* (2005), que emplean la clasificación revisada por Bisset (1991).

El primer trabajo que describe a *Trichoderma* como agente de biocontrol fue publicado por Weindling (1932). Desde entonces varias especies del género siguen en investigación y desarrollo para el control de diversos hongos patógenos, incluido *S. rolfsii* [Agrawal *et al.*, 1977; Elad *et al.*, 1980; Bell *et al.*, 1982; Polanco y Castro, 2005] en diferentes cultivos agrícolas. Este trabajo presenta datos que indican la eficiencia de cepas de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* en plántulas de soya.



Columnas con igual letra no son significativamente diferentes para p < 5%.

Figura 3. Control de *S. rolfsii* por diferentes cepas de *Trichoderma* en plantas de soya bajo condiciones de casa de cultivo.

Aunque la mayoría de los agentes empleados en control biológico de hongos patógenos presentan cierto grado de especialización, se han referido especies de *Trichoderma* como parásitas de una amplia gama de patógenos. El nivel de control de un patógeno puede variar de acuerdo con la cepa utilizada y con su adaptabilidad a las condiciones bióticas y abióticas específicas [Dennis y Webster, 1971a; 1971b], dentro y entre especies de *Trichoderma*. También Wells *et al.* (1972) observaron que especies de *Trichoderma* pueden ser diferencialmente selectivas contra diferentes hongos. Bell *et al.* (1982), al comentar ese hecho, recomiendan la selección de antagonistas contra enfermedad específica y la evaluación de mezclas de antagonistas para amplias aplicaciones. Este trabajo representa un esfuerzo para seleccionar aislados altamente activos contra *S. rolfsii*. Varias cepas de *Trichoderma* se revelaron altamente efectivas *in vitro* y en los ensayos conducidos con soya en casa de cultivo. Ese potencial ahora necesita ser mejor examinado bajo condiciones de campo.

Finalmente, varios estudios han evidenciado que, además del parasitismo directo [Benhamou y Chet, 1996], algunos metabolitos secundarios pueden estar involucrados en la acción antagonista de especies de *Trichoderma* contra *S. rolfisii*, entre ellos los antibióticos [Dennis y Webster, 1971a] y una enzima quitinasa [Lima *et al.*, 1997; El-Katatny *et. al.*, 2001], así como ß-1,3 glucanasa [El-Katatny *et al.*, 2001], entre otras. Aun la actividad micoparásita de *Trichoderma* spp. puede ser resultado de mecanismos distintos o su combinación [Harman, 2000; Howell, 2003]. En este trabajo tres cepas elegidas entre las de buenas potencialidades en los ensayos en cultivo dual no se destacaron de igual manera en medio que contenía filtrado de cultivos, lo que es índice que esas cepas no fueron tan hábiles para producir metabolitos tóxicos en el medio. Eso permite sugerir que por lo menos dos mecanismos están involucrados en la acción antagonista de cepas de *Trichoderma* ensayadas contra *S. rolfsii* en el presente estudio.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 20 nuevas cepas de *Trichoderma* spp. en áreas agrícolas de la región de Brasilia (Brasil) y se incorporaron a la colección de hongos para el control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología.
- Doce cepas mostraron buenas potencialidades contra *S. rolfsii* en los ensayos, mientras cinco de estas se destacaron aun en la prueba de producción de metabolitos tóxicos en el medio.
- Son necesarios estudios de campo con las cepas más promisorias encontradas en este trabajo, con el fin de conocer su comportamiento frente a las condiciones ambientales en el sistema agroecológico.

REFERENCIAS

Agrawal, S. C.; M. N. Khare; P. S. Agrawal: «Biological Control of *Sclerotium rolfsii* Causing Collar Rot of Lentil», *Indian Phytopathology*, 30:176-179, 1977.

Bell, D. K.; H. D. Wells; C. R. Markham: «In Vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», *Phytopathology*, 72:379-382, 1982.

Benhamou, N.; I. Chet: «Parasitism of Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction», *Phytopathology*, 86:405-416, 1996.

Bisset, J.: «A Revision of the Genus *Trichoderma* II. Infrageneric Classification», *Canadian Journal of Botany*, 69:2357-2372, 1991.

Dennis, C.; J. Webster: «Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma* I. Production of Non-Volatile Antibiotics», *Transactions British Mycological Society*, 57:25-39, 1971a.

——: «Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*, III Hyphal Interactions», *Transactions British Mycological Society*, 57:363-369, 1971b.

Dhingra, O. D.; J. B. Sinclair: *Basic Plant Pathology Methods*, CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida, 1981.

Elad, Y.; I. Chet; J. Katan: «*Trichoderma harzianum*: a Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*», *Phytopatology*, 70:119-121, 1980.

El-Katatny, M. H.; M. Gudelj; K. H. Robra; M. A. Elnaghy; G. M. Gübitz: «Characterization of a Chitinase and an Endo-ß-1,3-Glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 Involved in Control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*», *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 56:137-143, 2001.

Ferreira, S. A.; R. A. Boley, *Sclerotium rolfsii*, http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm. Acceso en nov. 2005.

Gams, W.; J. Bisset: «Morphology and Identification of *Trichoderma*», *Trichoderma* and *Gliocladium*: *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis, Londres, 1998, pp. 3-34.

Harman, G. E.: «Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes in Perceptions Research on *Trichoderma harzianum* t-22», *Plant Disease*, 84:377-393, 2000.

Homechin, M.: «Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum*, Rifai, para controle de patógenos de soja», Tese Doutorado, ESAQ/USP, 1987.

Howell, C. R.: «Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: the History and Evolution of Current Concepts», *Plant Disease,* 87:4-10, 2003.

Lima, L. H. C.; C. J. Ulhoa; A. P. Fernandes; C. R. Felix: «Purification of a Chitinase from *Trichoderma* sp. and Its Action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* Cell Walls», *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43:31-37, 1997.

Martin, J. P.: «Use of Acid, Rose Bengal and Streptomycin in the Plate Method for Estimating Soil Fungi», *Soil Science*, 69:215-232.

Mukherjee, P. K.; K. Raghu: «*Trichoderma* sp. As a Microbial Suppressive Agent of *Sclerotium rofsii* on Vegetables», *World Journal of Microbiology and Biotechnolgy*, 13:497-499, 1997.

Pérez, L. M.: «Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos. Experiencia chilena», Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, 2005.

Pineda, J. B.; C. D. Polanco: «Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de *Penicillium notatum* Westl», *Agronomía Tropical*, 31:265-281, 2005.

Polanco, C. D.; J. L. Castro: «Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*», *Agronomía Tropical*, 27:539-547, 2005.

Samuels, G. J.; P. Chaverri; D. F. Farr; E. B. McCray: «*Trichoderma* on Line, Systematic Botany & Mycology», Laboratory, ARS, USDA, 2005, http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm. Acceso en feb. 2005.

Tsahouridou, P. C.; C. C. Thanassoulopoulos: «Proliferation of *Trichoderma koningii* in the Tomato Rhizosphere and the Suppression of Damping-Off by *Sclerotium rolfsii*», *Soil Biology and Biochemistry*, 34:767-776, 2002.

Wells, H. D.; D. K. Bell; C. A. Jaworski: «Efficacy of *Trichoderma harzianum* As a Biocontrol for *Sclerotium rolfsii*», *Phytopathology*, 62:442-447, 1972.

Weindling, R.: «*Trichoderma lignorum* As a Parasite of Other Soil Fungi», *Phytopathology*, 22: 837-845, 1932.