

AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE UN METABOLITO IMPLICADO EN LA ANTIBIOSIS DE UN AISLADO DE *Trichoderma* spp. CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

Fleitas Quiñónez Rilsy Viviana¹; Flores Giubi María Eugenia¹; Barúa Chamorro Javier Enrique¹

Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica, Ruta Mcal. Estigarribia km 11, Campus de la UNA, San Lorenzo, Paraguay.

javierbarua@qui.una.py

RESUMEN

La agricultura constituye una de las principales actividades económicas del Paraguay. Sin embargo, uno de los problemas que afecta la producción agrícola, ocasionando cuantiosas pérdidas, es la presencia de fitopatógenos. Los hongos del género *Trichoderma* spp. son los más utilizados como agentes de control biológico, representan una estrategia eficaz para el manejo de enfermedades en plantas causadas por agentes fúngicos del suelo y una alternativa al uso de fungicidas químicos nocivos para la salud y el ambiente. El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento biodirigido de un metabolito implicado en la antibiosis de *Trichoderma* sp. FCQ18 contra hongos fitopatógenos. Mediante técnicas cromatográficas, se fraccionó el extracto orgánico de *Trichoderma* sp. FCQ18 y se evaluó su actividad antifúngica contra *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*; el aislamiento biodirigido permitió identificar la fracción con capacidad inhibitoria del 100% frente a los fitopatógenos evaluados. La posterior purificación de la fracción con mayor actividad antibiótica rindió un compuesto mayoritario responsable de la antibiosis observada, cuyos datos espectroscópicos corresponden a la micotoxina trichodermina. El presente trabajo es la primera comunicación del aislamiento e identificación de una molécula obtenida a partir de un aislado nativo de *Trichoderma* sp. con una importante actividad antifúngica.

Palabras Clave: *Trichoderma* spp., aislamiento biodirigido, control biológico

AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE UN METABOLITO IMPLICADO EN LA ANTIBIOSIS DE UN AISLADO DE *Trichoderma* spp. CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

Fleitas Quiñónez Rilsy Viviana¹; Flores Giubi María Eugenia¹; Barúa Chamorro Javier Enrique¹

Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Biológica, Ruta Mcal. Estigarribia km 11, Campus de la UNA, San Lorenzo, Paraguay.
javierbarua@qui.una.py

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que afecta la producción agrícola, ocasionando cuantiosas pérdidas, es la presencia de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en numerosos cultivos de gran interés económico para el sector agrícola (Grabowski, Orrego, & Soilán, 2014), como las ocasionadas por *Rhizoctonia solani*, cuyo síntoma más común es la caída de las plantas o "damping off", que se presenta como un ablandamiento en la base del tallo que va adquiriendo una coloración marrón oscura ocasionando la caída de la plántula. (Centurión Belotto, Sara Anahi Aquino Jara, Alicia Susana y Bozzano Saguier, 2013; Mayo, 2017).

También, *Macrophomina phaseolina* es un hongo necrotrófico ampliamente distribuido a nivel mundial, transmitido a través del suelo y las semillas con posibilidad de afectar a más de 500 especies de plantas. (Coser et al., 2017; Gutiérrez, Alvarez, Roberto, Gómez, & Diana, 2002). Otro fitopatógeno de naturaleza polífaga bastante común en regiones húmedas o frescas, es *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodríguez, 2001), el cual es el agente causante del moho blanco o podredumbre blanca, patología considerada de gran importancia económica en la mayoría de los lugares del mundo (Rodríguez, 2004).

La forma más común para tratar y hacer frente a las enfermedades en las plantas ha sido el control químico, sin embargo, el abuso y la mala aplicación de agroquímicos han generado problemas adversos. (Gómez, 2013; Velázquez Sanabria, 2010). El uso de biocontroladores como *Trichoderma* spp. representa una estrategia potencialmente eficaz para el manejo de

enfermedades en plantas causadas por agentes fúngicos del suelo y una alternativa para reemplazar el uso de fungicidas químicos nocivos para la salud (Ezziyyani & Sánchez Pérez, 2004; Rai, Kashyap, Kumar, Srivastava, & Ramteke, 2016).

El género *Trichoderma* spp. comprende un gran número de especies fúngicas que actúan como agentes de control biológico, cuyas propiedades antagónicas se basan en la activación de múltiples mecanismos como competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis con la producción de enzimas y de metabolitos antibióticos (Benítez, Rincón, Limón, & Codón, 2004; Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009).

El mecanismo de antibiosis ejercido por *Trichoderma* spp. se produce por la acción directa de antibióticos o metabolitos secundarios producidos por el mismo frente a otros microorganismos sensibles a éstos (Infante et al., 2009). Elucidar la naturaleza de los agentes responsables de la antibiosis de *Trichoderma*, es fundamental para la comprensión de la actividad biológica observada y para garantizar la seguridad en su uso.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Realizar el aislamiento biodirigido de un metabolito implicado en la antibiosis de un aislado de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos.

Objetivos Específicos

- ❖ Determinar las fracciones del extracto orgánico de *Trichoderma* spp. FCQ18 con actividad antifúngica contra *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*.
- ❖ Identificar el metabolito bioactivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Como biocontrolador se utilizó *Trichoderma* spp. FCQ18 aislado de suelo asociado a cultivo de tomate. Además, se emplearon cuatro aislados nativos de hongos fitopatógenos; *Macrophomina phaseolina* FCQ26, aislado de cultivos de sésamo (*Sesamun indicum* L.), *M. phaseolina* FCQ39 aislado de cultivos de soja (*Glycine max*) y *R. solani* FCQ35, aislado de suelo rizosférico y *S. sclerotiorum* FCQ40, aislado de material vegetal, los dos últimos de pimiento (Insaurralde, Sanabria, Verdina, Sotelo, & Barúa, 2017)

Los aislados de *Trichoderma* spp. FCQ18 y los hongos fitopatógenos fueron mantenidos en placas de Petri estériles, conteniendo medio de cultivo PDA (Agar-Papa-Dextrosa, Liofilchem®). Las placas se mantuvieron en estufa microbiológica a 30°C y en ausencia de luz hasta que el micelio cubra totalmente la placa.

Obtención del extracto orgánico

Tres discos del micelio de 5 mm de diámetro de la cepa *Trichoderma* sp. obtenidos del medio de cultivo PDA, fueron inoculados en botellas de Roux conteniendo 200 mL de medio de cultivo líquido PDB, (Papa-Dextrosa-Caldo), y se dejaron crecer durante 7 días, a 30°C, en oscuridad y en estático.

El micelio fue separado del medio de cultivo líquido mediante filtración con gasa y la extracción del filtrado se llevó a cabo mediante una extracción con acetato de etilo (AcOEt) hasta agotamiento. Las fracciones orgánicas fueron secadas con Na₂SO₄ anhidro, filtradas y evaporadas para eliminar el solvente orgánico mediante un evaporador rotatorio. Se registró el peso del extracto orgánico.

Fraccionamiento del extracto orgánico crudo y análisis de los extractos obtenidos

El fraccionamiento del extracto crudo obtenido se realizó por Cromatografía en Columna (CC), utilizando gel de sílice 60 (0,063-0,200 mm de grosor, Merck®) como fase estacionaria y como

fase móvil una mezcla de Hexano:AcOEt de polaridad creciente (10% AcOEt, 40% AcOEt, 60% AcOEt y 100% AcOEt); mediante el cual se obtuvieron las fracciones C1, C2, C3 y C4.

Cada fracción fue examinada mediante cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck®) como fase estacionaria y una mezcla de hexano:AcOEt (1:1) como fase móvil. Las placas fueron visualizadas con luz ultravioleta y reveladas con vainillina. Se realizó una purificación por CC de la fracción más activa, utilizando como fase estacionaria gel de sílice de la marca Sigma Aldrich (malla 70-290, diámetro de poro 60 Å) y como fase móvil una mezcla de Hexano:AcOEt al 10 y al 20%.

Caracterización química de los metabolitos aislados

- **Cromatografía Líquida de Ultra Eficacia**

El extracto crudo de *Trichoderma* sp. FCQ18 y el compuesto purificado fueron disueltos en acetonitrilo (ACN) preparados a concentraciones de 5 mg/mL y 1 mg/mL respectivamente y filtradas con filtros PTFE de 0,2 µm. Se analizaron mediante un Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficacia (UPLC), marca Waters, modelo Acquity acoplado a detector de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), con una columna C18 de la marca Acquity, modelo BEH (1,7 micras x 3 cm x 2,1 mm). Las condiciones cromatográficas fueron: inyección automática de las muestras utilizándose como fase móvil una mezcla de agua (con 0,1% de ácido fórmico y 0,5% de amoníaco) y metanol en gradiente de concentración de 0 a 100% de metanol, con un tiempo de corrida de 10 min y flujo de 0,4 mL/min. El software utilizado para el análisis cromatográfico fue MassLynx para Windows.

- **Espectroscopía por Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Los espectros se registraron en equipos Varian-Inova 500 Mhz a temperatura ambiente (25°C). Las muestras se disuelven en cloroformo deuterado, cuyas señales de referencia para RMN-1H son: δ_H 7.25 ppm (s).

Los espectros de RMN fueron obtenidos en los Servicios Centrales de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz, España, a través de una colaboración interinstitucional.

Evaluación de la actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica se siguió la metodología utilizada por Vinale (Vinale *et al.*, 2006), con modificaciones. Como control positivo se utilizó Tebuconazole disuelto en solución acuosa de DMSO al 5%, agregándose 200 µg del antifúngico por placa. Como control negativo se utilizó 10 µL de solución acuosa de DMSO al 5%. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas o hasta que el control negativo cubrió la totalidad de la placa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Cálculo del Porcentaje de Inhibición del crecimiento

Para el cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC), se utilizó la siguiente fórmula:

$$PIC = \frac{(C-T)}{C} \times 100$$

Donde, C es la medida del diámetro del crecimiento del fitopatógeno en la placa control, T es la medida del diámetro de crecimiento del fitopatógeno en la placa de ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma* spp. FCQ 18

El rendimiento del extracto orgánico obtenido expresado en miligramos por litro de medio de cultivo PDB fue de 234,55 mg/L. La evaluación de la actividad antifúngica del extracto crudo de FCQ18 frente a los fitopatógenos se realizó evaluando el crecimiento de cada uno en presencia del extracto orgánico de *Trichoderma* sp. FCQ18 cada 12 horas. Los resultados demostraron que el aislado nativo FCQ18 presentó efecto inhibitorio del 100% sobre todos los fitopatógenos durante las 48 horas, tiempo que duró el ensayo.

Fraccionamiento del extracto orgánico crudo de FCQ18

Para determinar las fracciones responsables de la actividad antifúngica, se procedió al fraccionamiento del extracto orgánico mediante CC, obteniendo las siguientes fracciones: 10% AcOEt (**C1**; 9,3 mg), 40% AcOEt (**C2**; 87,6 mg), 60% AcOEt (**C3**; 20,2 mg) y 100% AcOEt (**C4**; 25,4 mg); las cantidades obtenidas se expresan entre paréntesis.

Las fracciones se analizaron por CCD lo que indicó la presencia de una banda de mayor intensidad con una relación de frente (rf) igual a 0,8 en la fracción **C2 (Fig 4.1)**.

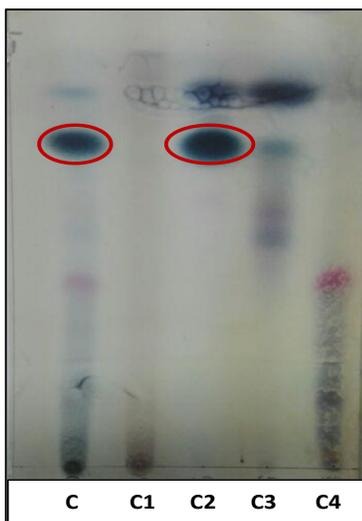


Figura 4.1. Cromatografía en Capa Delgada de las fracciones orgánicas del extracto crudo de *Trichoderma sp.* FCQ18. Fase estacionaria: gel de sílice 60 F₂₅₄; fase móvil (Hex: AcOEt) 1:1. El revelador utilizado fue vainillina. **(C)** extracto crudo FCQ 18. **(C1, C2, C3 y C4)** son las fracciones orgánicas obtenidas por CC 10%, 40%, 60% y 100%, respectivamente. Los círculos de color rojo indican el/los compuesto/s con relación de frente igual a 0,8.

Evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones C1-C4

Se evaluó la actividad antifúngica de las fracciones orgánicas **C1, C2, C3 y C4** sobre los fitopatógenos FCQ26, FCQ35, FCQ39 y FCQ40.

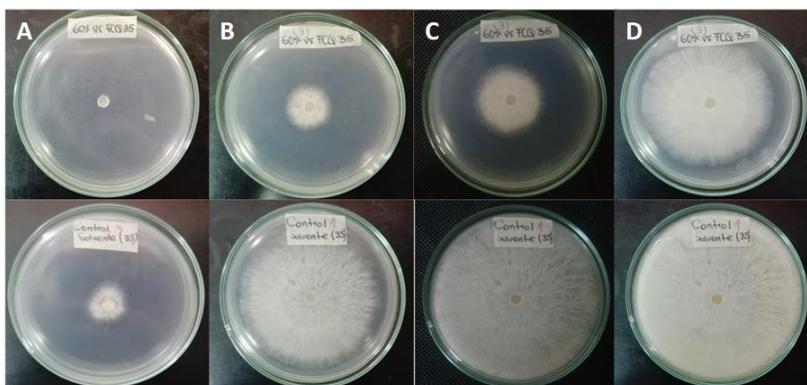


Figura 4.2. Imágenes representativas del ensayo de actividad antifúngica. Crecimiento del fitopatógeno *R. solani* FCQ35 frente a la fracción **C1**. **A:** 12 horas; **B:** 24 horas; **C:** 36 horas; **D:** 48 horas. **Abajo:** controles negativos.

Todas las fracciones del extracto crudo de FCQ18 fueron ensayadas contra *M. phaseolina* FCQ26 y FCQ39. Los resultados de las interacciones *in vitro* de las moléculas secretadas con el fitopatógeno demostraron una baja inhibición de crecimiento por parte de las fracciones **C1**, **C3** y **C4** (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Ensayo Antifúngico frente a *Macrophomina phaseolina* FCQ26 y FCQ39.

	PIC* FCQ26			
	12 hs	24 hs	36 hs	48 hs
C1	30,6±3,9	13,7±3,4	9±00	6,8±5,9
C2	100±00	100±00	100±00	100±00
C3	100±00	66,7±6,8	38,8±8,3	30,40±9,1
C4	14,8±3,2	0	18,5±10,3	8,7±5,2
	PIC* FCQ39			
	12 hs	24 hs	36 hs	48 hs
C1	18,6±18,2	14,77±19,28	1,18±17,87	4,9±3,12
C2	100±00	100±00	100±00	100±00
C3	100±00	61,65 ±9,84	16,57±2,51	14,71±4,16
C4	100±00	56,14±5,48	47,62±8,05	33,33±5,02

*PIC: $[(C-T) / C] \times 100$, PIC: Porcentaje de inhibición de crecimiento, C: crecimiento del control, T: crecimiento en la confrontación; los resultados se expresan como promedios \pm desviación estándar

La fracción **C2** presentó una inhibición del 100% del crecimiento de ambos aislados de *M. phaseolina*.

De igual manera, cada una de las fracciones fueron evaluadas frente a *R. solani* FCQ 35 y *S. sclerotiorum* FCQ40. Los resultados se recogen en la **Tabla 4.2**. La fracción 10% (**C1**) se obtuvo en muy pequeña cantidad, por lo que no pudo ser empleada para la evaluación de la actividad antifúngica del fitopatógeno FCQ40.

Tabla 4.2. Ensayo Antifúngico frente a *Rhizoctonia solani* (FCQ 35) y *Sclerotinia sclerotiorum* (FCQ40)

PIC* FCQ35				
	12 hs	24 hs	36 hs	48 hs
C1	0	4±2,3	9±00	7,2±6,1
C2	100±00	100±00	100±00	100±00
C3	100±00	100±0,0	68,7±5	27,1±11,6
C4	100±00	53±6,8	37,2±10,5	28,5±13,1
PIC* FCQ40				
C2	100±00	100±00	100±00	100±00
C3	100±00	100±00	61,20±3,20	52,60±2,5
C4	100±00	58,7±2,7	49,5±7,90	44,9±4,8

*PIC: $[(C-T) / C] \times 100$, PIC: Porcentaje de inhibición de crecimiento, C: crecimiento del control, T: crecimiento en la confrontación; los resultados se expresan como promedios ± desviación estándar

La fracción **C2** se destaca por presentar inhibiciones del 100% sobre el crecimiento de los fitopatógenos FCQ35 y FCQ40 durante todo el ensayo. Considerando la CCD de esta fracción (**Fig 4.1**), donde se evidenció la presencia de un compuesto mayoritario en dicha fracción, se sospecha que este metabolito podría ser el responsable de la elevada actividad antifúngica observada.

Purificación del compuesto mayoritario de C2 por Cromatografía en Columna

Debido a que la fracción **C2** presentó un metabolito mayoritario según lo observado por CCD y manifestó la mayor actividad antifúngica contra todos los patógenos ensayados, se fraccionó adicionalmente por CC, tal como se observa en la **Fig. 4.3**.

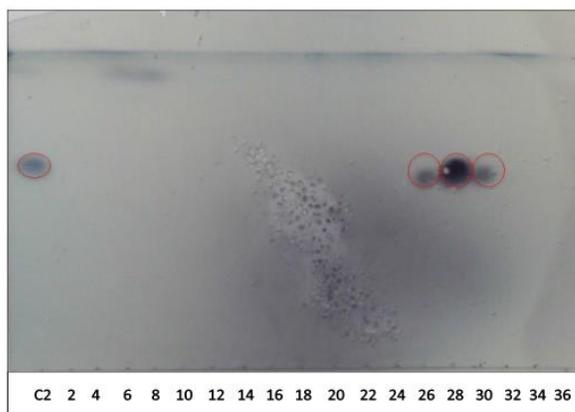


Figura 4.3. Cromatografía en Capa Fina. Fase estacionaria: gel de sílice 60 F₂₅₄; fase móvil Hex: AcOEt al 30%. Revelador químico: vainillina. Fracción **C2** y subfracciones **2-36**.

La **Fig 4.4** ilustra una CCD en donde el carril **C** corresponde al extracto crudo de FCQ18 y el carril **T** al compuesto purificado. Se demostró así la presencia del metabolito purificado en el extracto crudo de FCQ18.

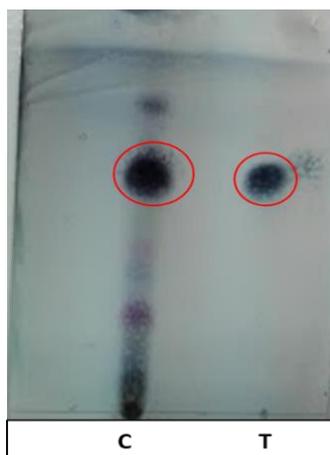


Figura 4.4. Placa Cromatográfica del extracto crudo de FCQ18 y el metabolito purificado. Fase estacionaria: gel de sílice 60 F₂₅₄; Fase móvil (hexano: acetato de etilo) al 30%. Revelador químico vainillina. Extracto crudo FCQ 18 (**C**), compuesto puro (**T**). Círculos de color rojo indican el compuesto con relación de frente igual a 0,6.

Evaluación química del compuesto purificado por técnicas de alta eficacia y métodos espectroscópicos

La caracterización del metabolito aislado se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^1H , mediante una colaboración con Universidad de Cádiz, a través de un proyecto interinstitucional.

Se aisló un aceite incoloro que mediante comparación con datos espectrales de RMN- ^1H fue identificado como 4-acetoxi-12,13-epoxi-9-trichoteceno conocido como trichodermina, pues sus señales corresponden con las descritas previamente en la literatura (Godtfredsen & Vangedal, 1965). El compuesto fue realizado mediante UPLC-ESI $^+$ -MS, donde se detectan nítidamente las señales correspondientes a iones estables con m/z 293 ($\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_4^+$) y m/z 315 ($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}^+$) cuyas masas son coherentes, respectivamente, con los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de la micotoxina trichodermina (Nielsen, Gräfenhan, Zafari, & Thrane, 2005).

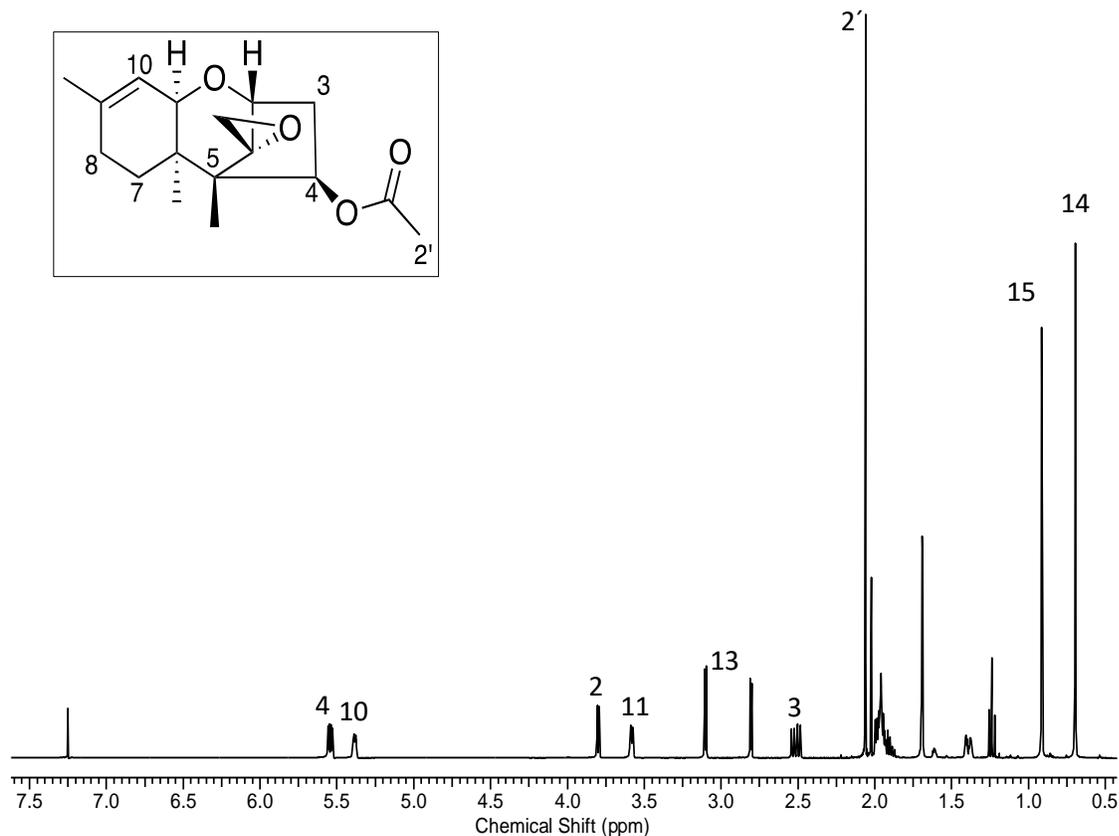


Figura 4.5. Espectro de RMN ^1H de trichodermina. Se muestran algunas señales características de la molécula. Los desplazamientos químicos expresados en ppm. **Datos espectroscópicos, RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz):** δ 5.506 (dd, 1H, $J = 6.4$, 3.2 Hz, H-4), 5.337-5.350 (m, 1H, H-10), 3.757 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H, H-2), 3.546 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-11), 3.059 (d, 1 H, $J = 3.2$ Hz, H-13), 2.768 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-13'), 2.473 (dd, $J = 12.4$, 6.4 Hz, 1H, H-3), 2.021 (s, 3H, H-18), 1.951~1.865 (m, 4 H, H-8, H-8', H-7, H-3'), 1.653 (s, 3H, H-16), 1.354 (m, 1H, H-7'), 0.875 (s, 3H, H-15), 0.658 (s, 3H, H-14)(Shentu, Zhan, Ma, Yu, & Zhang, 2014).

Actividad antifúngica de la trichodermina frente a los fitopatógenos

Finalmente se estudió la actividad inhibitoria del compuesto aislado, identificado como Trichodermina contra el crecimiento micelial de los fitopatógenos empleados.

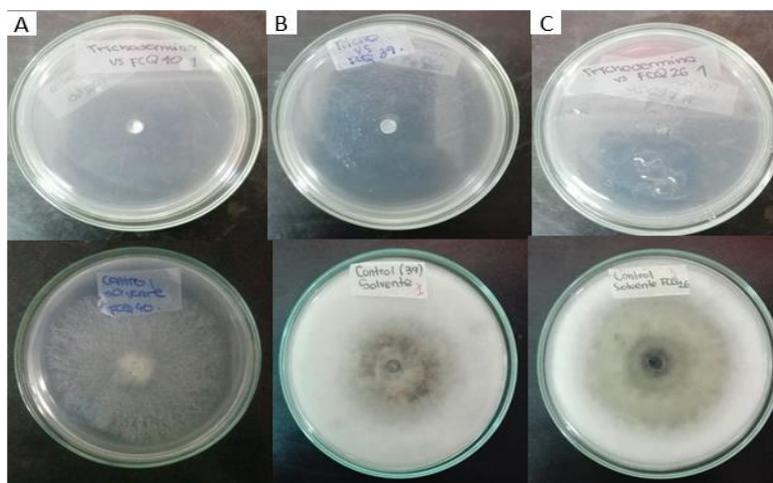


Figura 4.6: Imágenes representativas del ensayo de actividad antifúngica de trichodermina frente a fitopatógenos. **A.** *S. sclerotiorum* FCQ40, **B.** *M. phaseolina* FCQ39, **C.** *M. phaseolina* FCQ26. **Abajo:** controles negativos.

La trichodermina inhibió totalmente el crecimiento de los cuatro fitopatógenos hasta el final del experimento (**Fig. 4.6**). Los resultados demuestran que trichodermina posee una potente actividad antifúngica, la cual a la vez es inespecífica, y es el metabolito bioactivo presente en el extracto crudo de *Trichoderma* sp. FCQ18, que hace a este hongo un agente biocontrolador promisorio para su uso en agricultura.

Trichodermina es un trichoteceno, fue aislada por primera vez en 1964 de una cepa de *T. viride*, y descrita por Godtfredsen y Vangedal (Godtfredsen & Vangedal, 1965); posee probada actividad citotóxica contra células eucariotas. Las propiedades tóxicas de dicha molécula se deben a su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas con potente actividad inhibitoria sobre una peptidil transferasa al unirse en el mismo sitio del ribosoma. (Reino, Guerrero, Hernández-Galán, & Collado, 2008; Rocha, Ansari, & Doohan, 2005; Tijerino, 2010; Tijerino et al., 2011)

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antifúngica del extracto orgánico crudo de *Trichoderma* sp. FCQ18, contra cuatro fitopatógenos *M. phaseolina* FCQ26 y FCQ39, *R. solani* FCQ35 y *S. sclerotiorum* FCQ40. Se encontró que el extracto crudo orgánico de *Trichoderma* sp. FCQ18 posee 100% de actividad inhibitoria del crecimiento de todos los fitopatógenos evaluados.

Se obtuvieron fracciones del extracto orgánico de *Trichoderma* sp. FCQ18, de las cuales la fracción C2 correspondiente al 40% AcOEt demostró la mayor actividad antifúngica contra los fitopatógenos. Los resultados confirmaron que el compuesto purificado desde la fracción C2, identificado como trichodermina, es el responsable del mecanismo de antibiosis del aislado nativo *Trichoderma* sp. FCQ18.

BIBLIOGRAFIA

- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.
- Centurión Belotto, Sara Anahi Aquino Jara, Alicia Susana y Bozzano Saguier, G. (2013). Extractos vegetales para el control alternativo del damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate. *Investigación Agraria*, 15(1), 23-29.
- Coser, S. M., Chowda Reddy, R. V., Zhang, J., Mueller, D. S., Mengistu, A., Wise, K. A., Singh, A. K. (2017). Genetic architecture of charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance in soybean revealed using a diverse panel. *Frontiers in Plant Science*, 8(September), 1-12.
- Ezziyyani, M., & Sánchez Pérez, C. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, (26), 35-45.
- Godtfredsen, W. ., & Vangedal, S. (1965). Trichodermin, A New Sesquiterpene Antiotic. *Acta Chemica Scandinavica*, 19(5), 1088-1102.
- Gómez, M. (2013). *Biosíntesis del harzianum A y su papel en la fisiología y en la actividad de biocontrol ejercida por Trichoderma arundinaceum*. Universidad de León.
- Grabowski, C., Orrego, A., & Soilán, L. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en Paraguay. *Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe*, (February 2014), 9-81.
- Gutiérrez, M., Alvarez, S., Roberto, E., Gómez, M., & Diana, E. (2002). Podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), en soja sometida a estrés hídrico en el Nordeste de la Argentina, (2), 0-3.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina
acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. 17, 18 y 19 de octubre de 2018

- Insaurralde, L., Sanabria, A., Verdina, D., Sotelo, P., & Barúa, J. (2017). *Isolation and characterization of native Trichoderma spp. and phytopathogenic fungi in Paraguay*. (A. Benítez León, G. Macchi Leite, & A. González, Eds.), *Libro de Resúmenes IV Congreso Nacional de Ciencias Agrarias*.
- Mayo, S. (2017). *Evaluación de Trichoderma spp. en el control biológico de Rhizoctonia solani y la respuesta defensiva en plantas de alubia pertenecientes a la IGP «Alubia La Bañeza-León»*. Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad de León.
- Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Zafari, D., & Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8190-8196.
- Rai, S., Kashyap, P. L., Kumar, S., Srivastava, A. K., & Ramteke, P. W. (2016). Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. *SpringerPlus*, 5(1).
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123.
- Rocha, O., Ansari, K., & Doohan, F. M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22(4), 369-378.
- Rodríguez, M. A. (2004). *Hongos del suelo antagonistas de Sclerotinia Sclerotiorum: selección y estudio de potenciales agentes de biocontrol*. Universidad de Buenos Aires.
- Rodríguez, P. (2001). Biodiversidad De Hongos Fitopatogenos Del Suelo De Mexico, 24.
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X., & Zhang, C. (2014). Antifungal activity of

metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 248–254.

- Tijerino, A. (2010). *Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen Tbtri5 de Trichoderma brevicompactum*. Universidad de Salamanca.
- Tijerino, A., Elena Cardoza, R., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., ... Hermosa, R. (2011). Overexpression of the trichodiene synthase gene tri5 increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genetics and Biology*.
- Velázquez Sanabria, A. D. (2010). Manejo de hongos fitopatógenos mediante el uso del agente de control biológico *Trichoderma* spp. *Departamento Fitopatología. Centro de Investigación Hernando Bertoni (CIHB). Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA)*.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 143-148.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el marco del proyecto 14-INV-194 “**Identificación y Caracterización químico-biológica de aislados de *Trichoderma* spp. de Paraguay**” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el propósito de ampliar el conocimiento sobre la eficacia de aislados nativos de *Trichoderma* sp. para el control de hongos fitopatógenos.

