***Trichoderma harzianum* como herramienta en el manejo
integrado de enfermedades de tomate**

*Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata*

Tesista: Ingeniero Agrónomo Román Gabriel Müller

Año 2021

Facultad de
Ciencias Agrarias
y Forestales

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Director
Dra. Ing. Agr. Marta Mónica Astiz Gassó

Codirector
Dra. Ing. Agr. María del Carmen Molina

Jurado de tesis de Maestría

Dra. Laura Gasoni

Dra. Alicia Godeas

Dr. Eduardo Wright

Dedicatoria

A mi esposa María Marta y mis hijos.

Agradecimientos

A mi directora de tesis Dra. M. Mónica Astiz Gassó, por compartir su vocación y expertiz. Por su generosidad y paciencia a lo largo del trabajo.

A mi codirectora de tesis Dra. María del Carmen Molina, por abrirme las puertas del Instituto Santa Catalina y su dedicada labor de corrección en el manuscrito final.

A mis colegas Silvia Sánchez, por brindarme su valiosa ayuda en el desarrollo del trabajo y a Rosana Rodas por su colaboración en los ensayos.

Al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, del cual soy parte, por darme la oportunidad y los medios para realizar la Maestría.

A mis compañeros de curso Ramón Capomane, Héctor Medina y Sebastián Staltari, gran equipo.

A la educación pública y gratuita donde me formé.

Publicaciones derivadas

-**Müller, R.**; Sánchez, S.; Rodas, R.; Molina, M.C; Astiz Gassó, M.M. 2017. Compatibilidad entre *Trichoderma* y fungicidas en el manejo integrado de *Sclerotium rolfsii* en *Lycopersicum esculentum*. IV Jornada Uruguay de Fitopatología. II Jornada Uruguay. Libro de Resúmenes Pág. 52

-**Müller R.**; Astiz Gassó M.M.; Sánchez S.; Rodas R. y Molina M. del C. 2017
Compatibilidad entre *Trichoderma* y Thiram en el manejo integrado de *Sclerotium rolfsii* en *Lycopersicum esculentum*. 4° Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes Pág. 307

-**Müller R.**; Astiz Gassó M.M.; Sánchez S.; Rodas R. y Molina M. del C. 2021. Eficacia y compatibilidad de *Trichoderma harzianum* con fungicidas en el manejo de *Sclerotium rolfsii* en tomate. 5° Congreso Argentino de Fitopatología. 59th Meeting of the APS Caribbean Division. En prensa

Índice

Publicaciones derivadas	Pág. I
Índice de Tablas	VI
Índice de Figuras	VII
Abreviaturas	IX
Resumen	XI
Abstract	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia y producción nacional e internacional del tomate	1
1.2 Características botánicas y requerimientos agrícolas del tomate	2
1.3 Manejo integrado de plagas	3
1.4 <i>Trichoderma</i>	6
1.5 Mecanismos de control biológico de origen fúngico	8
1.6 <i>Trichoderma</i> en Argentina y a nivel mundial	10
1.6 Interacción entre <i>Trichoderma</i> y los fungicidas comerciales	12
1.7 <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	13
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	16
2.1 Hipótesis de trabajo:	16
2.2 Objetivos generales y específicos	16
2.2.1 Objetivo general	16
2.2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.1 <i>Trichoderma</i>	17
3.1.2 <i>Sclerotium rolfsii</i>	17
3.1.3 Tomate platense	17
3.2 Fungicidas	18
3.3 Metodología	18
3.3.1 Etapa 1: Pruebas in vitro de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	18
3.3.1.1 Multiplicación de Th y Sr	18

3.3.1.2 Cortes histológicos de esclerocios <i>S. rolfsii</i> para analizar el micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> sobre el patógeno	19
3.3.1.3 Determinación de la tasa de crecimiento de <i>T. harzianum</i> y <i>S. rolfsii</i>	20
3.3.1.4 Evaluación de antagonismo entre <i>T. harzianum</i> y <i>S. rolfsii</i>	20
3.3.1.5 Compatibilidad de <i>T. harzianum</i> con fungicidas comerciales	22
3.3.2 Etapa 2: Desarrollo en cámara de crecimiento desde germinación hasta plántula tamaño comercial	23
3.3.2.1.1 Pruebas de eficacia del inóculo <i>S. rolfsii</i> .	23
3.3.2.1.2 Aplicación de los fungicidas en la semilla de tomate	23
3.3.2.1.3 Aplicación de <i>T. harzianum</i> en la semilla de tomate	24
3.3.1.4. Uso de <i>Sclerotium rolfsii</i>	24
3.3.2.2. Evaluación de las interacciones entre <i>T. harzianum</i> , los fungicidas y <i>S. rolfsii</i>	24
3.3.3 Etapa 3: Evaluación en condiciones de campo, desde plántula hasta planta adulta	26
Análisis Estadístico	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Etapa 1: Evaluación de <i>T. harzianum</i> y <i>S. rolfsii</i> <i>in vitro</i>	29
4.1.1 Micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> sobre los esclerocios de <i>S. rolfsii</i>	29
4.1.2. Determinación de la tasa de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	32
4.1.3. Evaluación del antagonismo de <i>T. harzianum</i> vs. <i>S. rolfsii</i>	33
4.1.4 Compatibilidad de <i>T. harzianum</i> con fungicidas comerciales	34
4.1.4.1 Germinación de las semillas de tomate en Blotter Test	34
4.1.4.2 Efectos de <i>S. rolfsii</i> , <i>T. harzianum</i> y los fungicidas sobre la germinación de la semilla de tomate	35
4.1.4.3 Interacción entre los fungicidas, <i>T. harzianum</i> y <i>S. rolfsii</i>	37
4.2 Etapa 2: En cámara de crecimiento hasta plántula de tamaño comercial	38
4.2.1. Pruebas de eficacia del inóculo	38
4.2.1.1. Regresión Inóculo-Mortandad	39
4.2.1.2. Efecto de <i>S. rolfsii</i> en plántulas de tomate tratadas con fungicidas y <i>T. harzianum</i>	40
4.2.1.3 Observaciones microscópicas del daño producido por <i>S. rolfsii</i> en el cuello de la planta	42

4.2.2 Promoción de crecimiento en plántulas de tomate por <i>T. harzianum</i> y los fungicidas	43
4.2.2.1 Longitud radicular	45
4.2.2.2 Peso fresco de raíz	46
4.2.2.3 Peso seco de la raíz	47
4.2.2.4 Peso fresco aéreo	48
4.2.2.5 Peso Seco Aéreo	49
4.3 Etapa 3: En planta adulta a campo	50
4.3.1 Desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de tomate a campo	50
4.3.2 Parámetros evaluados a campo	53
4.3.2.1. Promedio de flores	53
4.3.1.2 Promedio de frutos	54
4.3.1.3 Curva de crecimiento	54
4.3.1.4 Rendimiento por planta	55
4.3.2. Severidad de <i>Sclerotium rolfsii</i> en plantas adultas de tomate platense a campo	57
5. DISCUSIÓN	60
5.1 Etapa 1: “in vitro”	61
5.1.1 Micoparasitismo de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre los esclerocios de <i>Sclerotium rolfsii</i>	61
5.1.2 Cinetismo e inhibición <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	62
5.1.3 Efecto de los fungicidas comerciales, <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i> sobre la germinación de la semilla de tomate platense y el PICR	63
5.2 Etapa 2. En Cámara de Crecimiento	66
5.2.1 Prueba de patogenicidad y virulencia de <i>Sclerotinium rolfsii</i> en cámara de crecimiento	66
5.2.2 Efecto de los fungicidas comerciales, <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i> sobre tomate platense en condiciones controladas	67
5.3 Etapa 3: Planta adulta a campo	69
5.3.1 Evaluación del comportamiento a campo de las plantas de tomate platense tratadas con Captan, <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Sclerotinium rolfsii</i>	69
6. CONCLUSIONES:	72
7. BIBLIOGRAFÍA	73

8.1 Soluciones Utilizadas	91
8.1.1 Fijador FAA	91
8.1.2 Tinción de Safranina / Verde rápido	91
8.2 Resultados del BLAST de las secuencias de la <i>Trichoderma</i> cepa del IFSC.	93

Índice de Tablas	Pág.
Tabla 1. Desarrollo radial de <i>S. rolfsii</i> y <i>T. harzianum</i> creciendo aisladas y en cultivos duales	34
Tabla 2. Blotter test de germinación de las semillas de tomate platense variedad Luna evaluando el efecto de los fungicidas Captan, Carbendazim, Thiram, el hongo patógeno <i>S. rolfsii</i> y a <i>T. harzianum</i>	35
Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial inducidos por los fungicidas Thiram, Carbendazim y Captan sobre <i>T. harzianum</i> y <i>S. rolfsii</i>	37
Tabla 4. Evaluación de la severidad de <i>S. rolfsii</i> en plántulas de tomate, tratados con fungicidas y Th. Escala de severidad Sherwood y Hagedorn (1958).	41
Tabla 5. ANOVA. Efecto de los tratamientos en las variables: Altura de planta, LR, PFR, PSR, PFA y PSA	45
Tabla 6. ANOVA del Rendimiento de frutos de tomate por planta	56
Tabla 7. Severidad de <i>S. rolfsii</i> en plantas adultas de tomate a campo tratadas con <i>Trichoderma</i> y el fungicida Captan	60

Índice de Figuras	Pág.
Figura 1. Material Biológico	19
Figura 2. Cultivo dual de <i>T. harzianum</i> y <i>S. rolfsii</i>	21
Figura 3. Multiplicación de cepas de <i>T. harzianum</i> del IFSC usadas a campo	27
Figura 4. Desarrollo de la colonia puras de Th y Sr	29
Figura 5. Micoparasitismo de esclerocios de Sr	30
Figura 6. Micoparasitismo de esclerocios etapa inicial	31
Figura 7. Micoparasitismo de esclerocios etapa avanzada.	31
Figura 8. Regresión lineal del diámetro de crecimiento de la colonia de <i>T. harzianum</i> en función del tiempo	32
Figura 9. Regresión lineal de diámetro de colonia de Sr en función del tiempo	33
Figura 10. Interacción de <i>S. rolfsii</i> , <i>T. harzianum</i> y los fungicidas comerciales sobre la germinación de las semillas de tomate platense	36
Figura 11. Ensayo en cámara con diferentes dosis de inóculo	38
Figura 12. Función de ajuste de la concentración de inóculo (Log I) en relación a la mortandad de las plantas in vitro (M)	40
Figura 13. Estrangulamiento del cuello de la plántula de tomate provocado por <i>S. rolfsii</i>	42
Figura 14. Síntomas de <i>S. rolfsii</i> en tomate	43
Figura 15. Microfotografía de interacción de hifas de Th y Sr	43
Figura 16. Crecimiento de las plántulas de tomate platense en condiciones controladas	44
Figura 17. Grupos homogéneos test de Tukey y valores absolutos para largo de raíz en los distintos tratamientos	46
Figura 18. Grupos homogéneos test de Tukey y distribución de las medias para peso fresco de la raíz para los distintos tratamientos	47
Figura 19. Grupos homogéneos test de Tukey y las medias para el peso seco de la raíz para los catorce tratamientos	48
Figura 20. Grupos homogéneos test de Tukey y las medias para el peso fresco aéreo de los tratamientos evaluados	49

Figura 21. Grupos homogéneos según el test de Tukey y las medias para el peso seco aéreo de los tratamientos evaluados	50
Figura 22. Crecimiento de las plantas de tomate a campo	52
Figura 23. Desarrollo a campo estado reproductivo	52
Figura 24. Grupos homogéneos del test de Tukey y dispersión	53
Figura 25. Grupos homogéneos test de Tukey y dispersión del promedio de número de frutos por planta	54
Figura 26. Crecimiento de las plantas en condiciones de campo desde el trasplante hasta su cosecha	55
Figura 27. Grupos homogéneos test de Tukey y medias	57
Figura 28. Nivel de severidad en plantas adultas (Nivel de severidad N=0 y N=1)	58
Figura 29. Nivel de severidad en plantas adultas (Nivel de severidad N=2 y N=3)	58
Figura 30. Nivel de severidad en plantas adultas (Nivel de severidad N=4)	59

Abreviaturas

ANOVA: análisis de la varianza

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

C: Diámetro del testigo

cm³: centímetro cúbico

°C: grados centígrados

CB: Control Biológico

CIPF: Convención Internacional de Protección Fitosanitaria

DIAM COL: diámetro de colonia

DCA: diseño completamente aleatorizado

FAA: Formol-Ácido Acético-Agua

g: gramo

h: hora

I: Concentración de inóculo

IFSC: Instituto Fitotécnico de Santa Catalina

LR: longitud raíz

m: metro

M: mortandad

ml: mililitros

MIP: Manejo Integrado de Plagas

NIMF: Normas Internacionales de Medidas Fitosanitarias

p: probabilidad

PFR: peso fresco raíz

PSR: peso seco raíz

PSA: peso seco aéreo

PFA: peso fresco aéreo

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDA: papa agar dextrosa

PICR: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial

PGPRs: rizobacteria promotoras del crecimiento de las plantas

R²: Coeficiente de determinación

RSI: Resistencia sistémica inducida

SC: solución concentrada

Sr: *Sclerotium rolfsii*

Th: *Trichoderma harzianum*

Tk: *Trichoderma koningii*

Tv: *Trichoderma viride*

T: Diámetro del organismo ensayado

T1: tratamiento 1

Tⁿ: tratamiento n

TC: tratamiento campo

TE: tratamiento de eficiencia de inóculo

WG: granulado dispersable en agua

WP: polvo mojable

Resumen

En nuestro país como a nivel mundial, el tomate (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.), es una de las hortalizas más consumida y de mayor valor económico. Durante su cultivo, se encuentra expuesto a distintas plagas, entre ellas a *Sclerotium rolfsii*. Para un control eficiente de las enfermedades es conveniente utilizar un manejo integrado de plagas, utilizando distintas técnicas de cultivo tanto clásicas como nuevas tecnologías como el control biológico, que contemplen paralelamente el cuidado del medio ambiente y la producción del cultivo. *Trichoderma* spp., es uno de los organismos más utilizados para el control biológico de las enfermedades de origen fúngico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la cepa de *Trichoderma harzianum* del IFSC como controlador biológico de *Sclerotium rolfsii*, ya sea sola o con fungicidas comerciales y analizar su capacidad como promotora de crecimiento del cultivo de tomate platense variedad Luna. Se evaluó el comportamiento de Th del IFSC para controlar a *Sclerotium rolfsii* *in vitro*, en cámara de crecimiento y a campo. Como resultado de los ensayos se comprobó que la cepa de Th del IFSC incrementó la germinación en condiciones *in vitro* e inhibió el desarrollo de *S. rolfsii*, poniéndose en evidencia el mecanismo de destrucción de los esclerocios. Indujo la promoción del crecimiento de la plántula obteniéndose plantas con mayor sanidad y porte. La cepa Th del IFSC tuvo mayor afinidad con el fungicida Captan incrementando la germinación y el desarrollo de las plántulas en el cultivo de tomate. Se comprobó la factibilidad del uso de Th del IFSC en un planteo de manejo integrado en el cultivo de tomate platense variedad Luna ya sea sola o con un fungicida como Captan.

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.), is the most consumed vegetable both in our country and all around the world. It is also the vegetable with the highest economic value. Many pests affect its crop among which we can find *Sclerotium rolfsii*. This is the reason why the integrated pest management becomes an utter necessity including classical techniques as well as biological control in order to take environmental issues into account. One of the organisms most frequently used to control diseases with fungi is *Trichoderma* spp. In fact, the studies of action as a biocontrol and growth promotion, as well as the interaction between *Trichoderma* spp. and commercial fungicides are worth a thorough research. The goal of this research is to study *T. harzianum* 's potential for the biological control, how it promotes growth as part of an integrated pest management of a platense tomato crop. We analysed the use of *T. harzianum* together with

commercial fungicides in three different conditions: *in vitro*, growth chamber and field. It was verified that *T. harzianum* inhibit *S. rolfsii* in vitro and the mechanism of destruction of sclerotia was revealed. Its efficient control and growth promotion of seedling could also be proved as we observed healthier and stronger plants. Besides, it's been found that Captan shows a higher affinity with *T. harzianum*. According to these results, the use of *T. harzianum* in integrated pest management of tomato crop platense has proved its feasibility.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia y producción nacional e internacional del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L. = *Lycopersicon esculentum* Mill.), su nombre proviene de *tomatl*, en la lengua azteca náhuatl, se mencionó por primera vez en el libro de *The History of Tomatoes as Food* en 1595 (Smith 1994). Perteneció a la familia de las Solanáceas, su centro de origen se ubica en Centro América. Se cultivaba desde antes de la llegada de los españoles al continente americano. Fue introducido en Europa a principios del siglo XVI y posteriormente se difundió a África y Asia. (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995; López Marín 2017).

En la actualidad, constituye la hortaliza más consumida y de mayor valor económico a nivel mundial. Es cultivado en todo el mundo, tanto para consumo en fresco, como para su industrialización. La producción mundial en el 2018 se ubicó en torno a los 182 millones de toneladas, en una superficie sembrada de 4,7 millones de hectáreas (FAOSTAT 2020).

Los mayores productores mundiales son China, India, Estados Unidos, Turquía y Egipto (Cestoni et al. 2006; FAOSTAT 2020). Su producción se encuentra en constante crecimiento, no solo por el incremento de las áreas cultivadas, sino también porque los agricultores utilizan nuevas tecnologías que les permiten aumentar los rendimientos (Díaz 2014; López Marín 2017). En este sentido se prevé que la demanda de productos agrícolas aumentará un 15% durante la próxima década. La manera de cubrir esta demanda determinará el impacto que el sector causará en la base de recursos naturales, sobre todo, la tierra, el agua y la biodiversidad (OCDE/FAO 2019).

A nivel nacional, la producción de tomate alcanza 1,2 millones de toneladas aproximadamente. Se destina una parte al consumo en fresco, principalmente tipo redondo, y otra cantidad importante a la industria. Esta última procesa la variedad perita u oblongo, elaborándose conservas de tomate entero, cubeteado, deshidratado o tomate seco, puré, salsas y extracto (Ministerio de Agroindustria 2016). A pesar del incremento en la producción de tomate en estos últimos años, no alcanza a cubrir la demanda nacional destinada a la industria, razón por lo cual se importa tomate industrializado fundamentalmente de China e Italia (Quaizel 2019).

1.2 Características botánicas y requerimientos agrícolas del tomate

El tomate, es una planta dicotiledónea (Cestoni et al. 2006) y herbácea perenne, que se cultiva en forma anual para el consumo de sus frutos (Semillaria 2015). El tallo de la plántula presenta apariencia herbácea. Del mismo se forman tallos secundarios, nuevas hojas y racimos florales. En la porción distal se ubica el meristemo apical, de donde surgen nuevos primordios florales y foliares (Escobar y Lee 2009). Las hojas, se encuentran dispuestas en posición alternada sobre el tallo y son de tipo pinnada-compuesta. Las flores son perfectas, regulares con pétalos de color amarillo. Se encuentran dispuestas de formas helicoidales y agrupadas en inflorescencias. El fruto es una baya bilocular o plurilocular, con forma globosa o alargada, que puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos hasta 600 g. En estado inmaduro es verde y, cuando madura puede presentar distintos colores como amarillo, negro, verde, atigrado y rojo que es el más común (IPGRI 1996). Respecto al sistema radicular, está constituido por una raíz principal y las raíces secundarias y adventicias. Estas últimas son numerosas y potentes y se encuentran ubicadas principalmente hasta los 30 cm de profundidad (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995; Infoagro Systems 2016).

Con respecto a sus hábitos de crecimiento se pueden diferenciar, a grandes rasgos, dos grupos:

a) Plantas con crecimiento determinado: El tallo principal y lateral detiene su crecimiento después de un cierto número de inflorescencias, difiriendo según la variedad. Presentan porte bajo y compacto.

b) Plantas con crecimiento indeterminado: El tallo principal y el lateral crecen en forma continua. La yema terminal de cada tallo desarrolla la yema del siguiente tallo. La floración, fructificación y cosecha se extienden por periodos muy largos. Esta característica del cultivo les permite adaptarse en invernaderos y/o campo, siempre con tutorado.

Existen plantas con hábitos de crecimiento que conjugan características de los dos tipos mencionados. A estas plantas se las denomina de crecimiento semideterminado (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995; Haifa Chemicals 2014; Ministerio de Agroindustria 2016).

El tomate es un cultivo poco exigente en cuanto a calidad de suelo, sin embargo, su crecimiento y desarrollo óptimo se obtienen en suelos profundos (1 m o más), de texturas medias, permeables, con un buen contenido de materia orgánica, y sin impedimentos físicos en el perfil. En la fase de germinación la temperatura óptima del suelo es de 28-30 °C. Los procesos de establecimiento del cultivo inmediatos al trasplante, se ven favorecidos con temperaturas entre los 15 y 25 °C. El cultivo responde muy bien en suelos con pH entre 5,5 y 6,8, (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995; Iglesias 2006; Goites 2008).

1.3 Manejo integrado de plagas

Por tratarse de un cultivo donde un alto porcentaje de la producción se consume en fresco, la protección del cultivo debe contemplar el uso de un manejo integrado de plagas de manera de optimizar y minimizar el uso de fitosanitarios. Esto permite obtener productos de calidad e inocuidad asegurada y al mismo tiempo minimizar el impacto al medio ambiente (Argerich 2011)

Por otro lado, el cultivo se encuentra a lo largo de su ciclo de producción expuesto a distintos factores de estrés biótico y abiótico, en particular en los cultivados bajo cubierta, donde las condiciones de mayor temperatura y humedad favorecen el desarrollo de plagas y enfermedades principalmente fúngicas (Haifa Chemicals 2014). Entendiéndose por plaga a cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y/o la calidad de un recurso humano (Hajek 2004).

Entre las técnicas de control clásico de adversidades biológicas se encuentran el uso de productos de síntesis química y cultivos genéticamente modificados resistentes a plagas. Por otra parte, teniendo en cuenta el impacto en el agroecosistema de las tecnologías antes mencionadas, se ha profundizado el estudio de otras alternativas, entre ellas el control biológico mediante el uso de enemigos naturales y/o antagonistas, biofumigación en base a compuestos de origen orgánico y uso de extractos vegetales por diversas técnicas de incorporación. Actualmente se procura utilizar estas técnicas en forma combinada, realizando un manejo integrado de plagas combinando una o más de estas herramientas (Fischbein 2012; Perniola et al. 2016; Abu Irmaileh et al. 2017).

En este sentido, el Manejo Integrado de Plagas (MIP) aborda la producción y protección de los cultivos teniendo en cuenta un enfoque ecosistémico, combinando diferentes estrategias y prácticas para producir cultivos sanos y minimizar el uso de plaguicidas (FAO 2019).

Las estrategias de manejo integrado de plagas han tenido un nivel de adopción variable entre los diferentes sistemas productivos y regiones agropecuarias. Por tal motivo, es necesario trabajar en la generación de conocimiento biológico y agroecológico básico con el fin de lograr un mayor alcance (Rodríguez y Niemeyer 2005). Otro concepto, introducido por La Organización Internacional de Lucha Biológica e Integrada, define a la Producción Integrada como un sistema agrícola de producción de alimentos que utiliza al máximo los recursos y los mecanismos de regulación naturales y asegura a largo plazo una agricultura viable. En ella los métodos biológicos, culturales, químicos y demás técnicas son cuidadosamente elegidos y equilibrados, teniendo en cuenta el medio ambiente, la rentabilidad y las exigencias sociales. Esta forma de producir garantiza el respeto por el medio ambiente y la salud de los productores y consumidores (Andrade et al. 2017).

El acrecentamiento de la producción agropecuaria a nivel mundial, basada en un manejo clásico de las plagas ha provocado un incremento en el uso de fitosanitarios, con una tendencia constante a aumentar su uso (March, 2014). En tanto, un informe reciente de la Agencia Europea de Medio Ambiente (2019) señala a la agricultura entre los principales factores contaminantes, tal es así que de mantenerse los patrones de consumo y producción actual se presentan insostenibles y sea comenzado a trabajar hacia transiciones sostenibles en los principales sistemas de producción.

La intensificación en el uso de insumos químicos en la agricultura, junto con el uso inapropiado de ciertas tecnologías, provocan impactos que perjudican, tanto a los recursos propios de los sistemas agrícolas, atentando contra su capacidad productiva, como a los recursos globales o de otros sistemas (ciudades, ríos, lagos, atmósfera) y a las personas que forman parte de ellos (Sarandón y Flores 2014).

Según lo señalado por March (2014) se ha llegado a un límite ambiental crítico, y los costos totales en términos de pérdida o beneficios no percibidos de los servicios ambientales, son muy elevados. Como consecuencia de ello, existe la necesidad

imperiosa de utilizar nuevas estrategias y tácticas que hagan a la producción de los cultivos más sustentable, señalándose entre ellas el uso de bioplaguicidas.

Como parte de estas iniciativas los países que conforman la Unión Europea, se encuentran en proceso de transición de su agricultura, vinculando la agricultura con la energía, la seguridad alimentaria y el cuidado del medio ambiente, migrando a sistemas agrícolas que propicien los equilibrios naturales a fin de disminuir el uso de insumo químicos (OCDE/FAO 2019).

En este mismo sentido, la implementación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), en los principales cultivos de frutas y hortalizas, están orientadas a la sostenibilidad ambiental, económica y social de los procesos productivos agropecuarios, en tanto se garantizan la calidad e inocuidad de los alimentos. Esto implica un uso responsable de los productos fitosanitarios para prevenir posibles daños a la salud humana y el ambiente. (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca 2020)

Dentro de las prácticas que hacen a la sustentabilidad de la producción agropecuaria en el marco del MIP, se incorpora el control biológico, el cual propicia los mecanismos de autorregulación del agroecosistema minimizando los impactos en el ambiente y en la salud de la población. Este método emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos plaga (FAO 2013).

Baker y Cook (1974) y Cook y Baker (1983) definen el concepto de control biológico en un sentido amplio como la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad productora de enfermedad por parte de un patógeno, lograda a través de uno o más organismos distintos del hombre.

Por su parte, la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) define al control biológico (CB) como una estrategia de control contra plagas donde se utilizan enemigos naturales, antagonistas, competidores, u otros agentes de control biológico (FAO 2019).

Para su aplicación se usan un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos. Este accionar puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Dentro de los hongos podemos mencionar, por ejemplo, los

géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. En este último género se encuentran algunas de las especies más utilizadas para el control de importantes patógenos de suelo (Fernández-Larrea Vega 2001; Pal y MacSpandden Gardener 2006; Schuster y Schmoll 2010).

1.4 *Trichoderma*

El género *Trichoderma* se encuentra entre los organismos más utilizados en el control de enfermedades de origen fúngico. Esto se debe, en gran parte, a sus características de facilidad para ser aislada y cultivada, siendo de crecimiento rápido, con capacidad para producir diversos metabolitos y de adaptarse a numerosas condiciones ambientales y sustratos (Infante 2009; Martínez et al. 2013; Hernández-Melchor 2019).

Las mencionadas características le confieren a *Trichoderma* spp. la posibilidad de ser utilizada en la industria biotecnológica (Papavizas et al. 1982; Wright et al. 2000; Ezziyyani et al. 2004; Martínez et al. 2013, Hernández-Melchor et al. 2019). Entre las ventajas de usar en biocontrol las especies que componen el género *Trichoderma*, se destaca su actividad antagonista frente a hongos patógenos para las plantas, actuar como promotor del crecimiento, son inductoras de resistencias (RSI) y mejorar la germinación (Fernández-Larrea Vega 2001; Pal y MacSpandden Gardener 2006; Kumar et al. 2014).

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Persson en 1794 y Rifai (1969), realizó la primera clasificación del género teniendo en cuenta aspectos comunes de las especies pertenecientes a este género.

Trichoderma spp. se caracteriza por ser un hongo saprófito, aeróbico, que sobrevive en suelos con diferentes porcentajes de materia orgánica y en determinadas condiciones particulares pueden comportarse como anaerobios facultativos, lo que les permite tener una amplia plasticidad ecológica.

Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento

y proliferación de este antagonista en la rizosfera de la planta (Rifai 1969; McBeath y Adelman 1991; Infante et al. 2009, Lorito et al. 2010; Martínez et al. 2013).

Las colonias del género *Trichoderma*, inicialmente se observan de color blanco, tornándose posteriormente a verde oscuro o amarillento debido a la abundante producción de esporas. En su estado vegetativo se caracterizan morfológicamente por presentar un micelio con septos simples, haploides, cuya pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, filídes simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de rápido desarrollo en medios sintéticos. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales que por lo general son unicelulares, pero pueden excepcionalmente unirse dos o más. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas (Harman 2004).

Tiene la capacidad para resistir un amplio rango de temperaturas, distribuyéndose desde latitudes ecuatoriales hasta lugares tan septentrionales como Alaska (McBeath y Adelman, 1991). La relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma* spp., varía entre especies y aislamientos, por ejemplo, *Trichoderma pseudokoningii* y *T. saturnisporum* Hammill toleran hasta 40 a 41 °C (Danielson y Davey 1973).

Por lo general la mayor parte de los aislamientos presentan un crecimiento óptimo a temperaturas que varían entre 25 y 30 °C. Sin embargo, se ha observado que la actividad antagónica de esta especie fue casi nula a 30 °C. En tanto, comparando el comportamiento de seis especies de *Trichoderma* frente a *Sclerotinia* spp y *Sclerotium rolfsii* se obtuvo mayor colonización a un rango de temperaturas entre 25-30 °C para *Sclerotinia* spp en cambio para *Sclerotium rolfsii* el rango óptimo fue de 20-25 °C (Rollán et al. 1999; Martínez et al. 2013). Paralelamente, se observó que cuando las temperaturas del suelo descienden por debajo de 10 a 15 °C, y existe baja disponibilidad de nutrientes esenciales, *Trichoderma* spp. disminuyó o detuvo su crecimiento, así como su actividad antagonista (Rodríguez 1993; Ezziyani et al. 2004; Martínez et al. 2013).

Otra variable a tener en cuenta es la exposición a la luz ya que colonias del hongo que se desarrollaron bajo condiciones de luz/oscuridad en forma alternada, fueron blancas y algodonosas al inicio y posteriormente presentaron zonas concéntricas, alternando una

banda delgada hialina, coincidente con el período de tiempo de oscuridad, con otra ancha de color verde oscuro correspondiente a las horas expuestas a la luz. En tanto que cuando las mismas colonias fueron expuestas a la luz en forma continua, presentaron color verde oscuro uniforme (Wells et al. 1972).

Las especies del género *Trichoderma*, presentan una cierta plasticidad a las condiciones de acidez del sustrato, los valores óptimos de pH se encuentran entre 5,5-6,5, es decir en un sustrato ligeramente ácido (Friedl et al. 2008). El desarrollo de *Trichoderma* spp. se activa con la presencia de humedad, siendo el óptimo un 60% de la capacidad de retención de humedad del suelo o capacidad de campo. A porcentajes mayores de saturación, la colonización y sobrevivencia disminuye por la baja disponibilidad de oxígeno (Páez 2006)

Los aislamientos de *Trichoderma* spp se encuentran en suelos con abundante materia orgánica, y ayudan a la descomposición de la misma, por lo cual se los clasifica en el grupo de hongos hipogeos, lignolícolas y predadores (Arias 2008; Friedl et al. 2008).

Los trabajos realizados por Harman et al. (1981); Papavizas et al. (1982, 1985); Elad et al. (1983), presentan los primeros antecedentes del uso de *Trichoderma* spp., como antagonista de patógenos. En la actualidad existe abundante información que confirma la capacidad de *Trichoderma* spp. para ser utilizada como insumo biológico (Gasoni et al. 2001, 2004; Harman, 2005; Correa et al. 2007; Shores et al. 2010; Narayanasamy et al. 2013; Martínez et al. 2013; Coppola et al. 2017).

1.5 Mecanismos de control biológico de origen fúngico

El control biológico de los hongos patógenos de las plantas se realiza a través de dos tipos de mecanismos. Aquellos que actúan en forma directa afectando al patógeno (micoparasitismo, competencia y antibiosis por medio de metabolitos secundarios) y los que actúan en forma indirecta por el accionar de la planta hospedante, como inducción de la resistencia sistémica (RSI) y estimulación de la producción de metabolitos secundarios que promueven el crecimiento (Ezziyyani et al. 2004; Harman 2005; Malmierca et al. 2012; Kumar 2013; Khaledi y Parissa 2016; Ownley et al. 2010; Jaber y Ownley, 2017;

Hernández-Melchor et al. 2019). Estos mecanismos no son excluyentes entre sí, y la importancia relativa de cada uno de ellos aún no está bien establecida, aunque dependería de la cepa de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones edáficas y ambientales (Stocco 2014).

El micoparasitismo es un proceso que involucra una serie de complejas relaciones entre el hongo patógeno y el antagonista, este proceso incluye el reconocimiento entre patógeno-antagonista, adhesión y enrollamiento, y por último la producción de enzimas líticas que degradan las paredes celulares del patógeno, con su posterior colapso celular (Harman 2005; Correa et al. 2007; Martínez et al. 2013; Pérez et al. 2020)

La competencia, se puede definir como el comportamiento o capacidad de dos o más organismos para obtener un mismo recurso. En los hongos está relacionada a la posibilidad de acceder a determinados nutrientes como carbono, nitrógeno y hierro (Alonso Reyes et al. 2002; Heydari y Passalakli 2010).

La antibiosis es la capacidad de algunos microorganismos de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, los que protegen a la planta de la actividad de los patógenos, entre estos podemos citar compuestos que brindan facultades antimicrobiales, insecticidas y acción citotóxica (Howel 2003; Reino et al. 2008; Ownley et al. 2010)

Entre los mecanismos de acción indirecta; se encuentra la resistencia sistémica inducida. En este caso la colonización de los tejidos de la planta por determinados microorganismos le permite activar su sistema de defensas (RSI), aumentando la producción de metabolitos secundarios. Los mismos permiten que las plantas se adapten con mayor facilidad a los factores de estrés bióticos y/o abióticos (Conrath et al. 2006; Shores et al. 2010; Sharon et al. 2011; Battaglia et al. 2013; Coppola et al. 2017).

Entre los metabolitos generados por RSI, se encuentran las fitoalexinas que poseen características antibióticas, antifúngicas y antivirales. Howell (2003) en un detallado trabajo acerca de los mecanismos utilizados por *Trichoderma harzianum* muestra las diferentes estrategias utilizadas, entre ellas el aumento en plantas inoculadas de sustancias como las fitoalexinas, indicando un claro efecto de activación de las defensas de la planta.

La promoción del crecimiento de las plantas es otro mecanismo de acción presentado por algunas cepas de *Trichoderma*, esto se encuentra ampliamente documentado por numerosos trabajos (Harman et al. 2004; Wright et al. 2004; Martínez et al. 2013). *Trichoderma* spp puede producir más de setenta metabolitos secundarios, identificados como sustancias con capacidad de promoción del crecimiento de las plantas, especialmente las que actúan a nivel de raíz (Páez 2006; Harman et al. 2004; Infante et al. 2009; Joshi et al. 2010; Nosir 2016). Además de la promoción del crecimiento de las plantas, se comprobó en varios estudios, la capacidad de algunas cepas de *Trichoderma* de estimular la germinación de semillas en varias especies de interés agronómico, efecto denominado “*biopriming*” y mejorar el comportamiento de las plantas frente a factores de estrés tanto de origen biótico como abiótico (Conrath et al. 2006; Saba et al. 2012; Camargo-Cepeda y Ávila 2014; Nosir 2016; Coppola et al. 2017).

1.6 *Trichoderma* en Argentina y a nivel mundial

Entre los trabajos realizados en Argentina con *Trichoderma* podemos mencionar, los ensayos en laboratorio llevados a cabo por Wright et al. (1988), en los cuales se probó la capacidad de dos aislamientos de *Trichoderma koningii* (Tk1 y Tk2) y uno de *Trichoderma viride* (Tv) como antagonista de *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* a través del uso de cultivos duales en cajas de Petri, estos autores determinaron la velocidad de crecimiento inicial y el ritmo de crecimiento de los antagonistas, y la superficie cubierta de la caja de Petri con micelio de 10 patógenos.

Por otro lado, Martinengo de Mitidieri (1988; 1989) a partir de 1.200 aislamientos de *Trichoderma* spp en laboratorio, invernáculo y campo, seleccionó las cepas T473, T643 y T668 que demostraron su eficiencia en el control de patógenos de suelo como *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor* en ensayos con tomate, pimiento, lechuga y frutilla.

Como resultado de investigaciones llevadas a cabo en La Plata, Mónaco et al. (1994) observaron que cepas de *Trichoderma koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. hamatum* y *T. viride* aisladas de cultivos hortícolas se desarrollaron

adecuadamente *in vitro*. Además, demostraron que *Trichoderma pseudokoningii* y *T. hamatum* presentaron la mayor eficacia de control frente a *Fusarium solani*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor* y *Sclerotium rolfsii*. Menéndez y Godeas (1998) señalaron la eficacia de *Trichoderma harzianum* para el control de *Sclerotinia sclerotium* en plantas de soja.

El uso de *Trichoderma harzianum*, formulado con conidios del antagonista como cápsulas de alginato de sodio, harina de trigo y caolín, fue efectivo frente a *Sclerotium rolfsii* en las semillas de poroto. Además, se observó un incremento en el peso seco y fresco de la materia verde. (Montealegre et al. 2005). En esta misma línea de experimentos se inocularon cepas de *Trichoderma* preseleccionadas a semillas de cultivos extensivos, lo cual permitió evaluar la efectividad en plantín para el control de los patógenos de suelo (Dal Bello et al. 1994). Asimismo, la eficiencia de la aplicación de *T. harzianum* como antagonista de patógenos de plantas se encontraría estrechamente relacionada con su formulación, ya que tiene influencia directa en su supervivencia en el suelo. Entre los principales factores que influyen en su éxito, se hallarían la temperatura y tipo de suelo (Montealegre et al. 2009; Stocco et al. 2019)

El trabajo de Mónaco et al. (2006) donde se caracterizaron molecularmente cepas de *Trichoderma*, y se evaluaron su crecimiento *in vitro* junto con los patógenos *Pythium sp.* y *Rhizoctonia sp.*, demostró el crecimiento de *Trichoderma virens* alrededor de las hifas de los patógenos, efecto que se corroboró en ensayos con semillas de albahaca y tomate.

De las investigaciones realizadas sobre 189 cepas de *Trichoderma* de la colección del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (IFSC) se seleccionaron 33 cepas con capacidad antagonista en patógenos causantes de damping off (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *F. equiseti* y *Macrophomina phaseolina*) las que fueron evaluadas en invernáculo para posteriormente realizar la formulación de la enmienda biológica BIAGRO TL®. Dicha enmienda utilizada en plántulas de tomate indujo la promoción de crecimiento (Varaschin et al. 2000 a, b, c, 2011).

En una recopilación bibliográfica sobre *Trichoderma*, Amerio et al. (2020) destacan, que el género *Trichoderma* es uno de los microorganismos de mayor uso y efectividad en los programas de manejo integrado de plagas (MIP), utilizándose como antagonico y regulador de hongos fitopatógenos. Se han realizado numerosos estudios de control biológico de enfermedades de las plantas en la Argentina, tanto básicos como aplicados. Dado lo extenso del país, donde se presentan diferentes condiciones edafo-climáticas, se necesitan aplicar estrategias de manejo particulares para cada una de las regiones, estudiando principalmente cepas nativas, adaptadas a las condiciones ambientales locales.

1.6 Interacción entre *Trichoderma* y los fungicidas comerciales

La interacción entre *Trichoderma* spp. y los fungicidas de uso comercial merecen un estudio detallado. Entre ellos, podemos mencionar los aportes de Wokocha (1990) quien trabajó en el marco del MIP usando *Trichoderma viridae* con un fungicida para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* en plantas de tomate. Por su parte, Ortiz Molinuevo et al. (1995) observaron un buen desarrollo de *Trichoderma* a concentraciones bajas de Captan y el fungicida PCNB, esto hizo suponer que podrían aplicarse en forma conjunta con el antagonista.

Para el control de *Sclerotinia sclerotiorum* de lechuga en macetas, se usó un formulado de *Trichoderma koningii*, el cual redujo la incidencia de la enfermedad, tanto usándolo sólo o en forma conjunta con Carbendazim (Varaschin et al. 2000), resultados similares obtuvieron Espinosa-Ahumada et al. (2019) controlando a *F. oxysporum* y *R. solani* con *Trichoderma*. En otros trabajos donde se usaron diferentes cepas de *Trichoderma* en un manejo integrado con cinco fungicidas distintos, arrojó resultados promisorios en el control de patógenos del cultivo de lechuga (Silva et al. 2018). Sin embargo, en un planteo de manejo integrado de enfermedades, con dos cepas de *Trichoderma*, estas se mostraron sensibles al uso de Carbendazim, en tanto fueron más tolerantes a los demás fungicidas utilizados (Castillo et al. 2017). Queda demostrado que la respuesta de *Trichoderma* spp. es diferente según los distintos principios activos utilizados, mostrando alta variabilidad genética al respecto (Nowara y Radwan 2017).

En el manejo integrado de *Ustilago bullata* en *Bromus catharticus* y *Tilletia laevis* en trigo, no se manifestaron efectos negativos con la *Trichoderma* formulada BIAGRO TL® y los fungicidas aplicados en la semilla (Astiz Gassó et al. 2009a, b). En un bioensayo en almácigo, el tratamiento con *Trichoderma koningiopsis* aplicados en las semillas y en riego en suelo, se obtuvo un porcentaje mayor de germinación en cebolla (61%) y mayor colonización de las raíces. El mismo tratamiento fue aplicado en las raíces de las plántulas de 120 días, observando una reducción de raíces menor por acción del patógeno contrastado con el aislamiento comercial (Sánchez et al. 2015).

En investigaciones realizadas para el manejo integrado de *Fusarium graminearum* de trigo utilizando *Trichoderma* y biofumigación con restos de *Brassica juncea*, se obtuvieron resultados promisorios que evidenciaron que el biocontrolador no fue afectado por la biofumigación, sino que hubo un efecto sinérgico *Trichoderma*-biofumigación en el control del patógeno (Perniola et al. 2014, 2016)

En un trabajo reciente realizado con plantas de tomate usando cepas de *Trichoderma* spp. nativas de diferentes suelos de la provincia de Buenos Aires (Bader et al. 2019), demostraron el efecto de inhibición de patógenos entre un 20 al 100%. Asimismo, observaron plántulas más vigorosas, sugiriendo un efecto “*priming*” a favor de una mayor resistencia a patógenos.

Es de destacar que entre los principales factores de estrés biótico que inciden la sanidad y productividad de los cultivos intensivos, se encuentran las enfermedades de origen fúngico, ya que son una de las causas de importantes pérdidas en la producción hortícola y en la producción de tomate en particular (Goites 2008; López Marín 2017; Bader et al. 2019).

Dal Bello (1987) haciendo un relevamiento y determinación de la microflora que afecta al cultivo de tomate en el Cinturón Hortícola de La Plata halló entre los patógenos más importantes a *Rhizoctonia* sp. *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani*, *F. trincietum*, *Sclerotinia sclerotium* y *Phytophthora* sp.

1.7 *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Entre los hongos fitopatógenos del suelo, tenemos a *Sclerotium rolfsii* Sacc. que afecta a más de 500 hospederos. Se encuentra distribuido mundialmente, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Ataca desde plántulas a especies herbáceas, leñosas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo (Aycock 1966).

Sclerotium rolfsii, infecta tanto plantas cultivadas como silvestres, incluyendo especies cultivadas como el tomate, pimiento, maní, zanahoria y otros cultivos de importancia económica. El mismo causa la pudrición de la base del tallo (damping off) en semilleros y de las plantas jóvenes en siembras directas (Alonso Reyes et al. 2002). Su variabilidad morfológica ha sido demostrada a través de cultivos monobasidiospóricos en papa-dextrosa-agar (PDA), donde se ha visto que los medios de cultivo y la temperatura pueden influir tanto en la morfología del micelio como en la producción de esclerocios, los cuales son estructuras de supervivencia (Hernández-Jiménez et al. 2004).

Entre los síntomas ocasionados por *S. rolfsii* se pueden observar amarillamiento en las hojas inferiores y lesiones en las bases de los hipocótilos de las plantas. A nivel de la base del tallo hay hundimientos, ablandamientos y decoloraciones de la corteza. En estadios avanzados de la enfermedad, las hojas de las ramas superiores pueden marchitarse y finalmente provocar la muerte de la planta y/o el quiebre por la base del tallo. Los esclerocios del hongo aparecen generalmente en grandes cantidades adheridos a la base de los tallos de las plantas afectadas junto con masas de micelios de color blanco característico de esta especie (Alonso Reyes et al. 2002).

S. rolfsii tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo en ausencia del hospedero en forma de esclerocios de 2 a 5 años. Los esclerocios son la fuente principal de inóculo y diseminación del patógeno (Hernández-Jiménez et al. 2004). Para que se presente una patogénesis, primero deben germinar los esclerocios para lo cual existen dos formas diferentes, una hifal y otra eruptiva. Esto dependerá de condiciones bióticas y abióticas. En el primer tipo, el esclerocio germina y crecen hifas individuales que provienen de las células de la médula del esclerocio. En el segundo caso se produce una germinación de tipo eruptiva, la cubierta del esclerocio se rompe y se expulsan agregados hifales, los que causarán las lesiones en el hospedante. En condiciones favorables el hongo a través de sus hifas infectará algunas plantas susceptibles para continuar con su ciclo (Punja y Grogan 1981)

La diseminación de *S. rolfsii* puede producirse en forma pasiva o activa.

La forma más frecuente es la pasiva a través de los esclerocios presentes en el suelo contaminado. Se diseminan principalmente a través de las prácticas agrícolas como remoción del suelo o barbecho y el riego donde los esclerocios puede trasladarse arrastrados por el agua hacia un suelo no contaminado (Aycock 1966). Por otro lado, el trasplante de plántulas contaminadas, así como las semillas pueden dispersar al patógeno a grandes distancias (Jenkins y Averre 1986). En tanto la dispersión activa del patógeno, menos frecuente en condiciones naturales, se da a través de las basidiosporas de *S. rolfsii* (Aycock 1966).

En la República Argentina, *S. rolfsii* se encuentra ampliamente distribuido y afecta a diversos cultivos de importancia económica entre las cuales tenemos a *Allium sativum*, *Arachis hypogaea*, *Capsicum annuum*, *Fragaria ananassa*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Helianthus annuus*, *Ipomoea batatas*, *Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Medicago sativa*, *Olea europaea*, *Phaseolus vulgaris*, *Saccharum officinarum*, *Solanum lycopersicum* y *Sorghum bicolor* (SINAVIMO 2021). En el cultivo de tomate, *S. rolfsii* es uno de los hongos patógenos más comunes causante de enfermedades denominadas podredumbre basal del tallo ya que se ubica a nivel de la base del tallo y raíz. En condiciones de alta humedad los tejidos muertos se recubren de un abundante micelio blanco con los esclerocios visibles de color castaño. Cuando la enfermedad avanza provoca marchitez y muerte de la planta (Mónaco et al. 1991; Mitidieri y Polak 2012; Obregon 2018).

Por lo antes expresado se deduce que el manejo integrado de los patógenos que afecta al cultivo de tomate, requiere un abordaje que incluya el control biológico, utilizando diferentes microorganismos, entre estos *Trichoderma harzianum*. El complemento del control biológico, con el uso de técnicas de manejo clásicas, redundaría en alternativas de control más eficientes y de menor impacto en el agroecosistema (Wokocha 1990; Mónaco et al. 1994; Ortiz Molinuevo et al. 1995; Mónaco et al. 2006; Varaschin et al. 2000 y 2011; Ramírez y Nienhuis 2012; Sánchez et al. 2015; Stocco et al. 2019).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de trabajo:

La utilización de *Trichoderma harzianum* sería una herramienta eficaz en el manejo integrado con fungicidas, para el control de *Sclerotium rolfsii* en el cultivo de tomate.

2.2 Objetivos generales y específicos

2.2.1 Objetivo general

Analizar el comportamiento de una cepa de *Trichoderma harzianum* como biocontrolador y activador de crecimiento. Determinar su compatibilidad con fungicidas comerciales para controlar a *Sclerotium rolfsii* en tomate.

2.2.2 Objetivos específicos

- a) Evaluar la eficacia de la cepa de *Trichoderma harzianum* perteneciente al cepario del IFSC como controlador biológico de *Sclerotium rolfsii*, en tomate
- b) Determinar el efecto de la cepa de *Trichoderma harzianum* del IFSC como potencial promotor de crecimiento del cultivo de tomate platense variedad Luna.
- c) Analizar la compatibilidad de la cepa de *Trichoderma harzianum* del IFSC, interactuando con fungicidas comerciales en el marco de manejo integrado de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 *Trichoderma*

La cepa del hongo *Trichoderma* sp. fue cedida por el Cepario del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina (IFSC), Facultad de Cs. Agrarias y Forestales de la UNLP. La identificación de la cepa del hongo, fue realizada por el Laboratorio de Virología y Técnicas Moleculares de la Dirección de Laboratorio Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA. La técnica utilizada para la identificación molecular, fue la de purificación y secuenciación por PCR (by MACROGEN®).

3.1.2 *Sclerotium rolfsii*

El agente fitopatógeno utilizado fue *Sclerotium rolfsii* (Sr). La cepa se obtuvo de aislamientos de cultivos de lechuga (*Lactuca sativa*) realizados en el IFSC.

3.1.3 Tomate platense

Como material vegetal se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* (Sl) (IPNI 2018) de la variedad platense población local “Luna”, los mismos fueron

cedidos por la Cátedra de Extensión Rural de la Facultad de Cs. Agrarias y Forestales de la UNLP.

3.2 Fungicidas

Se emplearon las siguientes marcas comerciales, principios activos y dosis:

- **Captan 60 % WP** [(N-triclorometiltio) Tetrahidroftalamina 37], dosis: 250 cm³/100 kg de semilla.
- **Thiram 80 % WG** (Disulfuro de Tetrametiltiuram), dosis: 350 cm³/100 kg de semilla.
- **Carbendazim 50% SC** [(2-metoxicarbamoil)-bencimidazol 50 g], dosis: 200 cm³/100 kg de semilla.

Todos ellos de uso común en el tratamiento de semillas y plantines hortícolas.

3.3 Metodología

La realización de los experimentos se planificó en tres etapas:

Etapas 1: Pruebas *in vitro* de multiplicación de Th, obtención de esclerocios de Sr, ensayos de inhibición y compatibilidad de fungicidas.

Etapas 2: Evaluación en cámara de crecimiento de la interacción entre Th, Sr y los fungicidas Captan, Carbendazim y Thiram, desde siembra hasta plántula de tomate de tamaño comercial.

En función de los resultados obtenidos en las **etapas 1 y 2**, se seleccionará la densidad de inóculo y el fungicida a utilizar en el ensayo a campo.

Etapas 3: Evaluación en condiciones de campo, desde plántula hasta planta adulta.

3.3.1 Etapas 1: Pruebas *in vitro* de *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii*

3.3.1.1 Multiplicación de Th y Sr

Para la realización de los experimentos se utilizaron los cultivos axénicos del Cepario perteneciente al IFSC.

- La cepa de Th se multiplicó sembrándola en caja de Petri con PDA 2% (papa-dextrosa-agar) para posteriormente extraer discos del hongo del borde de la caja (Fig. 1a).
- La cepa de Sr se multiplicó en semillas de trigo, previamente esterilizadas en autoclave durante 1 h a 1,5 atmósferas, para la obtención de esclerocios (Fig. 1b).

Ambos cultivos fueron conservados en cámara frigorífica a 4 °C para posteriormente utilizarlos en los diferentes ensayos *in vitro*.

Figura 1. Material Biológico: a) Multiplicación de la cepa de *Trichoderma harzianum* del IFSC en medio de PDA, b) Obtención de esclerocios de *Sclerotium rolfsii* en semillas de trigo esterilizadas.

3.3.1.2 Cortes histológicos de esclerocios *S. rolfsii* para analizar el micoparasitismo de *T. harzianum* sobre el patógeno

Para analizar el efecto y la eficiencia del micoparasitismo de Th sobre los esclerocios de Sr se utilizaron cajas de Petri con medio PDA. En las cajas con el tratamiento se colocó un disco de 5 mm de Ø de Th en el centro y a los 7 días se sembraron entre 10 a 12 esclerocios de Sr por caja. En las cajas control, solo se sembraron esclerocios de Sr.

A los 7 días de sembrada la Th se inició el ensayo con la siembra de los esclerocios y se prolongó durante 28 a 30 días, fijándose al iniciar el ensayo 10 esclerocios y posteriormente se extrajeron y fijaron semanalmente 10 esclerocios de las cajas de Petri tratadas con Th y del control. Las muestras se fijaron en FAA (Formol-Ácido Acético-Etanol-Agua).

Para la observación de los esclerocios de Sr, se los incluyó en parafina realizándose posteriormente cortes histológicos transversales seriados de aproximadamente de 10-12 μm de espesor con un micrótopo tipo Minot (rotativo) marca Arcano. Se realizó una doble tinción con safranina-fast-green y se montaron con DePex. Los preparados se observaron en un microscopio óptico (D'Ambrogio Argüeso 1986; Astiz Gassó 2015, 2017).

3.3.1.3 Determinación de la tasa de crecimiento de *T. harzianum* y *S. rolfii*

Para establecer la tasa de crecimiento diario de Th y Sr *in vitro*, se realizó un ensayo con 5 repeticiones y dos tratamientos (cada tratamiento estaba constituido por cada uno de los hongos testeados), considerándose cada caja de Petri como una unidad experimental (Correa et al. 2007). Para ello se tomó la cepa de Th obtenida previamente *in vitro* y se sembró colocando en el centro de la caja de Petri de 90 mm de diámetro con medio de PDA 2%, un disco 5 mm Ø de micelio extraído de los márgenes de las colonias de Th. En el caso de Sr se colocó un propágulo (esclerocio) en el centro de la caja. Posteriormente, se incubaron en cámara de cultivo a 12/12 h luz-oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C. La evaluación se realizó midiendo cada 24 h el diámetro de crecimiento de las colonias con un Vernier Caliper (0-150 mm).

3.3.1.4 Evaluación de antagonismo entre *T. harzianum* y *S. rolfii*

Para evaluar el antagonismo entre Th y Sr se utilizó la técnica de cultivo dual (Ezziyany et al. 2004). Se realizó un ensayo con 5 repeticiones, considerándose como unidad experimental a cada una de las cajas de Petri. Cada repetición estaba constituida por la interacción entre Th y Sr y como testigos los cultivos de Th y Sr. La interacción

como los testigos se sembraron en caja de Petri con medio de PDA 2%. Para evaluar la interacción se sembró un disco de 5 mm Ø de micelio de Th, extraído de los márgenes de las colonias de Th y un propágulo (esclerocio) de Sr enfrentados cada uno en un extremo de la caja (Fig. 2). Los testigos se sembraron por separado colocando un disco de Th o un propágulo en Sr. Las cajas se incubaron en cámara de cultivo con 12/12 h luz-oscuridad a temperatura de 25 ± 2 °C durante siete días.

Figura 2. Cultivo dual de *T. harzianum* y *S. rolfsii*

La medición de la actividad antagonista se evaluó cada 24 h y se calculó a través del porcentaje de inhibición del micelio usando la fórmula de Bell et al. (1982)

$$\text{PICR} = (C - T) / C \times 100$$

PICR=Porcentaje de inhibición del Crecimiento Radial

C=Diámetro de la colonia del testigo

T=Diámetro de la colonia del organismo ensayado

Paralelamente, se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de preparados con o sin líquido de montajes de azul de algodón para visualizar las áreas de interacción entre las hifas de Th y Sr (D'Ambrogio Argüeso 1986; Astiz Gassó 2015, 2017).

3.3.1.5 Compatibilidad de *T. harzianum* con fungicidas comerciales

Para evaluar la compatibilidad de Th con fungicidas comerciales de diferentes principios activos y actividad fungicida, se realizaron dos tipos de ensayos:

I. Pruebas de germinación en Blotter Test de semillas de tomate platense sin tratar (Testigo) y tratadas con los fungicidas comerciales. Se evaluaron los resultados, teniendo en cuenta lo establecido por las Normas ISTA 2018.

II. El porcentaje de inhibición se calculó midiendo los diámetros de las colonias en los distintos tratamientos de acuerdo a la fórmula $PICR = (C-T) / C \times 100$, Bell et al. (1982).

Para ambas pruebas, la aplicación de los principios activos, se realizó mediante el método del Slurry, colocando la cantidad de semilla a tratar en bolsas de nylon donde se agregó las dosis de fungicidas antes detalladas (3.2) para cada tratamiento. Se agitaron enérgicamente por un minuto para obtener una distribución homogénea. Luego se orearon al aire sobre papel durante 24 h.

El ensayo, se realizó en cajas de Petri con medio PDA, disponiéndose 5 semillas, previamente tratadas, alineadas en el centro de la caja de Petri. En los tratamientos donde se incluyeron Th y/o Sr, se dispusieron en el extremo de la caja un disco 5 mm Ø de micelio extraído de los márgenes de las colonias de Th y en el caso de Sr se colocó un propágulo (esclerocio).

Los tratamientos evaluados fueron 13 y 1 testigo; **T1:** Captan; **T2:** Captan+Sr; **T3:** Captan+Sr+Th; **T4:** Captan+Th; **T5:** Carbendazim; **T6:** Carbendazim+Sr; **T7:** Carbendazim+ Sr + Th; **T8:** Carbendazim+Th; **T9:** Sr+Th; **T10:** testigo blanco; **T11:** Thiram; **T12:** Thiram+Sr; **T13:** Thiram+Sr+Th; **T14:** Thiram+Th.

La germinación de las semillas de tomate se realizó teniendo en cuenta lo establecido por las Normas ISTA 2018, midiéndose a los 7 días energía germinativa y a

los 14 días poder germinativo. El porcentaje de inhibición se evaluó cada 24 h y se calculó a través del porcentaje de inhibición del micelio usando la fórmula de Bell et al. (1982)

El diseño experimental de los ensayos fue un DCA formado por 13 tratamientos y 1 testigo con 5 repeticiones, considerándose como unidad experimental a cada caja de Petri.

3.3.2 Etapa 2: Desarrollo en cámara de crecimiento desde germinación hasta plántula tamaño comercial

3.3.2.1 Métodos de aplicación de *S. rolfii*, Fungicidas y *T. harzianum*

3.3.2.1.1 Pruebas de eficacia del inóculo *S. rolfii*.

Técnica de Bouhot (1975) adaptada: Previo a los ensayos en cámara de crecimiento y a campo se realizó un ensayo preliminar para determinar la densidad de inóculo de Sr más adecuada.

Se sembró 1 semilla de tomate desinfectada (alcohol 70 durante 30 segundos e hipoclorito de Na al 0,1% 10 min), se enjuagaron con agua destilada tres veces y se sembraron en cada una de las celdas de la bandeja de germinación. Cada celda contenía 60 g de suelo estéril (autoclavado 1h a 1,5 atmósferas) y se le incorporaron los esclerocios teniendo en cuenta los distintos tratamientos: **TE1:** 0 esclerocio; **TE2:** 0,075 g esclerocios; **TE3:** 0,150 esclerocios; **TE4:** 0,225 g esclerocios; **TE5:** 0,300 g esclerocios. Se contabilizó el número de plantas emergidas y muertas a los 14 días.

El diseño experimental para el ensayo fue un DCA con 5 tratamientos, según la concentración de inóculo, cada tratamiento con tres repeticiones.

3.3.2.1.2 Aplicación de los fungicidas en la semilla de tomate

Los fungicidas comerciales se aplicaron por peleteado de las semillas utilizando el método del Slurry, colocando la cantidad de semilla a tratar en bolsas de nylon donde se

agregaron las dosis de fungicidas antes detalladas (3.2) para cada tratamiento, esta operación se realizó 24 horas antes de la siembra. En todos los casos la aplicación del producto comercial se realizó con la precaución de un buen secado del producto. En los casos donde se utilizó Th junto con el fungicida, se aplicó primero el fungicida, y una vez seco, el insumo biológico.

3.3.2.1.3 Aplicación de *T. harzianum* en la semilla de tomate

Para la aplicación de la cepa de Th a la semilla de tomate se procedió a “peletear” las mismas con una suspensión de *T. harzianum* 24 h antes de la siembra. La preparación de la suspensión Th se realizó por medio del método de diluciones sucesivas y recuento de conidios con cámara hematocímetro (Cámara de Neubauer), hasta obtener concentraciones de la solución de $1 \times 10^{6-8}$ conidios/ml, adicionándole agar agua al 2,5% + Tween 80 para facilitar la adherencia a la semilla (Astiz Gassó et al. 2009a, 2017). Las semillas de tomate se sumergieron en 50 ml de la mezcla y se colocaron en un agitador rotativo durante 20 min para la adherencia de Th. Posteriormente, las semillas peleteadas se secaron sobre papel absorbente estéril pasándole una corriente de aire estéril durante 3 h. Posteriormente se sembraron en bandeja de germinación, colocando 60 g de una mezcla de suelo estéril-perlita (50-50), en cada una de las celdas.

3.3.1.4. Uso de *Sclerotium rolfsii*

La densidad de inóculo aplicada en este ensayo, se determinó en función de los ensayos de dosis óptimas realizados *ad hoc* (3.3.2.1.1). Para la siembra se mezcló en cada celdilla; sustrato, esclerocios de Sr y la semilla de tomate. Las celdillas fueron completadas con 60 g de sustrato donde se colocó 1 semilla de tomate y se agregaron 1,5 g de esclerocios/celdilla.

3.3.2.2. Evaluación de las interacciones entre *T. harzianum*, los fungicidas y *S. rolfsii*

En esta etapa se evaluó en plántulas de tomate, los efectos de las interacciones entre la cepa de Th, los fungicidas (Captan, Thiram y Carbendazim) y el patógeno Sr, desarrollándose en cámara de cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura. Para la incorporación de Th a las semillas de tomate, se usó el método descrito en el punto 3.3.2.1.3. Los fungicidas fueron aplicados según lo expuesto en el punto 3.3.2.1.2, cuando los tratamientos requerían fungicida + Th se procedió a aplicar primero el fungicida y una vez secado el mismo se aplicó Th. El uso de Sr se aplicó mediante la técnica detallada en el punto 3.3.1.4 (pruebas de eficacia) usando como referencia la dosis óptima encontrada.

El ensayo se sembró manualmente en bandeja de germinación de 60 cm³/celda y se mantuvo a capacidad de campo con agua estéril. Las bandejas se colocaron en cámara de crecimiento a un fotoperiodo de 12/12 h luz-oscuridad y a temperatura de 25±2 °C, hasta que alcanzaron el tamaño de plantines comerciales a los 30 días después de la germinación.

Se evaluaron 13 tratamientos y 1 testigo compuestos por distintas combinaciones entre *Trichoderma*, Sr, fungicidas y como Testigo a Sr: **T1**: Captan; **T2**: Captan+Sr; **T3**: Captan+Sr+Th; **T4**: Captan+Th; **T5**: Carbendazim; **T6**: Carbendazim+Sr; **T7**: Carbendazim+Sr+Th; **T8**: Carbendazim+Th; **T9**: Sr+Th; **T10**: testigo Sr; **T11**: Thiram; **T12**: Thiram+Sr; **T13**: Thiram+Sr+Th; **T14**: Thiram+Th.

El diseño utilizado para el ensayo fue el DCA con 13 tratamientos, más el testigo y 4 repeticiones. Cada repetición estuvo constituida por 3 plantas en cada tratamiento.

El experimento se evaluó teniendo en cuenta:

1. Efectos directos del patógeno: en los distintos tratamientos, se utilizó la escala de severidad de Sherwood y Hagedorn (1958). Considerándose la severidad como la proporción del área o cantidad de tejidos de la planta que presentaron síntomas de la enfermedad (Agrios, 2005).

La escala de Sherwood y Hagedorn se compone de los siguientes niveles:

0 = no se observan síntomas

- 1 = se observan síntomas leves en la base del tallo con decoloración de los tejidos
- 2 = se observa la colonización del cuello, con aplanamiento de la base del tallo
- 3 = pérdida marcada de volumen y turgencia de la base del tallo, aspecto anguloso
- 4 = pérdida completa del volumen tallo, estrangulamiento del cuello (muerte de planta)

2. Promoción del crecimiento inducido por Th: en los 13 tratamientos y el testigo para cada una de las 4 repeticiones se evaluó el peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz y la longitud de planta aérea/raíz.

3.3.3 Etapa 3: Evaluación en condiciones de campo, desde plántula hasta planta adulta

De los resultados obtenidos en las etapas anteriores, en base a las variables evaluadas, se seleccionó para aplicar a campo la combinación de Th, Captan y el inóculo Sr con la dosis que mejor performance general tuvo en los ensayos previos.

El ensayo se implantó en el mes de septiembre en un lote que provenía de un barbecho de 1 año y se surqueo a una distancia de 1 m entre surco y 0,5 m entre plantas.

El diseño experimental del ensayo fue completamente aleatorio con cinco repeticiones, tomándose a cada una de las plantas de los tratamientos como una unidad experimental.

Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera: **TC1:** Testigo con semilla desinfectada; **TC2:** semilla+Sr; **TC3:** semilla+Th; **TC4:** semilla+Th+Sr; **TC5:** semilla con Captan; **TC6:** semillas con Captan+Sr; **TC7:** semillas con Captan+Th+Sr; **TC8:** semillas con Captan+Th.

Las plántulas de tomate platense variedad Luna, se multiplicaron en cámara de cultivo hasta los 30 días. Para trasplantarlas a campo, se tomaron al azar cinco plántulas por cada uno de los tratamientos.

Al trasplante se las regó con una suspensión Th de 50 ml con una concentración de 10^{6-8} conidios/ml/planta (Fig. 3). Para proteger a las plántulas de la deshidratación por las altas temperaturas se cubrió el ensayo con una malla de media sombra al 30 %.

Posteriormente, se las regó de manera de mantener el suelo a capacidad de campo. El riego fue sectorizado por planta, para evitar contaminaciones. A los 15 días del trasplante, conjuntamente con el riego, se realizó la segunda aplicación de 50 ml de la suspensión de Th con una concentración de 10^{6-8} conidios/ml/planta. Durante el desarrollo de las plantas se realizaron dos desbrotes y el tutorado, prácticas habituales en el cultivo

Figura 3. Multiplicación de cepas de *T. harzianum* del IFSC utilizadas a campo

Las variables evaluadas en el ensayo a campo fueron:

- 1. Tiempo a floración**, número de días desde el trasplante hasta inicio de floración.
- 2. Desarrollo de las plantas**, se midió cada 15 días altura de la planta, para obtener las curvas de crecimiento.

3. Rendimiento estimado, se calculó a partir del peso total de frutos por planta en el término de 60 días.

4. Variables cualitativas, finalizado el ensayo a campo, se observó la aparición de canchros en plantas sintomáticas y asintomáticas y se analizó si las mismas se habían enfermado con Sr. Para ello, en las plantas sintomáticas se observó la presencia de desarrollo del patógeno en el cuello. En las muestras asintomáticas, se realizó una cámara húmeda de las muestras extraídas del cuello, se las incubó en cámara de crecimiento a un fotoperiodo de 12/12 h luz-oscuridad y a una temperatura de 25 ± 2 °C. A los 7 días se analizó si había desarrollado Sr.

Análisis Estadístico

El Diseño experimental para los ensayos se desarrolló según un diseño completamente aleatorizado. Para el análisis de los resultados se usó el análisis de la Varianza y comparaciones entre las medias para detectar diferencias entre ellas. La significancia estadística se determinó mediante el test de Tukey, con un nivel de significancia del 5 % (Steel y Torrie, 1980).

4. RESULTADOS

4.1 Etapa 1: Evaluación de *T. harzianum* y *S. rolfii* *in vitro*

4.1.1 Micoparasitismo de *T. harzianum* sobre los esclerocios de *S. rolfii*

La tasa de crecimiento de Th en condiciones óptimas de luz, temperatura y medio de cultivo *in vitro*, se produjo a los cinco días de sembrada, cubriendo el micelio totalmente la caja de Petri (Fig. 4a). En cambio, Sr tuvo un crecimiento más lento, cubriendo el micelio totalmente la caja de Petri a los 7 días (Fig. 4b).

Figura 4. Desarrollo de las colonias puras de Th y Sr. a) cepa de Th a los 5 días de su siembra; b) colonia de Sr a los 7 días de su siembra.

Sembrados conjuntamente de Th y Sr (Fig. 5a), Th desarrollo de manera similar a los cultivos puros, en cambio, los esclerocios de Sr, fueron parasitados por Th afectando la germinación de los mismos (Fig. 5b) o detuvieron su crecimiento teniendo un menor desarrollo (Fig. 5b).

Figura 5. Parasitismo de esclerocios de Sr por Th. a) esclerocios de Sr sembrados sobre la cepa de Th del IFSC; b) esclerocios de Sr parasitado por Th.

Del análisis microscópico de los cortes de los esclerocios en las diferentes etapas de colonización (Fig. 6 y Fig.7), se observó un deterioro progresivo de las estructuras de resistencia del patógeno cuanto mayor era el tiempo que estaban en contacto con Th.

Los esclerocios de Sr sin parasitar por Th (testigo) tenían forma casi esférica (Fig. 6a), siendo de color marrón a negro la pared externa protectora (plecténquima) y su parte interna compacta (seudoparénquima-promesenchima).

En los cortes efectuados a los 7 días de iniciado el parasitismo del esclerocio por Th, se observó que comienza a producirse deformación y contracción de la pared externa del esclerocio (Fig. 6b). A los 14 días se incrementó la contracción de la pared externa plecténquima y se inicia la desorganización y degradación del seudoparénquima-promesenchima del esclerocio (Fig. 7a). Entre los 28-30 días de micoparasitado el esclerocio, se produjo la degradación total del mismo (Fig. 7b).

Figura 6. Parasitismo de los esclerocios por Th. a: esclerocio sin tratamiento (testigo); b: esclerocio a los 7 días de colonizado por Th. Observación microscópica con 100X

Figura 7. Parasitismo de esclerocios etapa avanzada. a: comienzo de la degradación del esclerocio a los 14 días de parasitado; b: reducción y degradación total del esclerocio a los 30 días de parasitado. Observación microscópica con 100X

4.1.2. Determinación de la tasa de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii*

La tasa de crecimiento de Th y de Sr obtenida de la medición diaria de los diámetros de las colonias cultivadas *in vitro* y en condiciones óptimas de cultivo se observan en la Fig. 8 y Fig. 9.

En la Fig. 8, se observa el desarrollo diario del diámetro de la colonia de Th, mostrando un comportamiento de tipo lineal: $\text{DIAM COL Th} = 0,5189 + 1,5101 \cdot x$, con un ajuste $R^2 = 0,98735022$ p-value=0,000, siendo la tasa de evolución de Th equivalente a 1,50 mm/día, coincidente con la pendiente de la curva.

Figura 8. Regresión lineal del diámetro de crecimiento de la colonia de *T. harzianum* en función del tiempo.

En la Fig. 9, se observa el desarrollo diario de la colonia de Sr, respondiendo a una curva de tipo exponencial (Fig. 9a), incrementándose el crecimiento a partir del segundo día y alcanzando el diámetro máximo a los siete días de sembrados.

La tasa de crecimiento lineal, obtenida por la aplicación de la función logarítmica a los valores de diámetros de desarrollo se observan en la Fig. 9b. La curva del crecimiento según: $\text{Log DIAM COL Sr.} = 1,3769 + 0,7591 \cdot x$, con un ajuste $R^2 = 0,94693235$ indicó una tasa de crecimiento de Sr del orden de 0,76 mm/día.

Comparando las curvas de crecimiento de Th (Fig. 8) y de Sr (Fig. 9a y Fig. 9b), se deduce que Th tiene una tasa de crecimiento superior al de Sr porque la primera tiene un desarrollo diario lineal (Fig. 8) y el segundo exponencial (Fig. 9a).

Figura 9. Regresión lineal de diámetro de colonia de Sr en función del tiempo, a: crecimiento exponencial de la colonia de Sr; b: tasa de crecimiento lineal obtenida por aplicación de ajustes por la función logarítmica de los valores de crecimiento diario.

4.1.3. Evaluación del antagonismo de *T. harzianum* vs. *S. rolfsii*

En la Tabla 1, se detallan los resultados de las mediciones de los diámetros de las colonias de Th y Sr, creciendo en forma aislada, y en cultivos duales entre Th y Sr y viceversa. Para su cálculo se aplicó la fórmula propuesta por Bell et al., 1982.

$$\text{PICR} = \frac{C - T}{C} \cdot 100$$

En el caso de Th, su desarrollo fue superior al de Sr (Tabla 1), estos valores se correlacionan con los resultados obtenidos previamente (Fig. 8 y Fig. 9a, 9b). En cambio, en los cultivos duales, el comportamiento de ambos organismos fue diferente (Tabla 1). Mientras que Th en presencia de Sr se mantuvo con un crecimiento similar, en el cultivo inverso Sr experimentó una disminución en su desarrollo (0,88) con respecto al testigo (1,01). En cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento radial observado fue de $PICR=23,35$, teniendo una disminución del crecimiento Sr en presencia de Th.

Tabla 1. Desarrollo radial de *S. rolfsii* y *T. harzianum* creciendo aisladas y en cultivos duales.

TRATAMIENTO	Crec. medio acumulado (mm)	Tasa de crec. Diario (mm/día)
<i>T. harzianum</i>	2,78	1,42
<i>S. rolfsii</i>	1,47	1,01
<i>T. harzianum</i> + <i>S. rolfsii</i>	3,08	1,30
<i>S. rolfsii</i> + <i>T. harzianum</i>	1,13	0,88

4.1.4 Compatibilidad de *T. harzianum* con fungicidas comerciales

4.1.4.1 Germinación de las semillas de tomate en Blotter Test

En la Tabla 2 se observan los resultados de la germinación de las semillas de tomate platense tratadas con tres fungicidas comerciales (Captan, Carbendazim y Thiram), esclerocios de Sr (patógeno), Th (biocontrolador) y un testigo sin tratamiento.

Del análisis de los resultados (Tabla 2) se deduce que hay cinco grupos homogéneos para la variable de germinación de la semilla de tomate. El testigo (T10), tuvo un porcentaje de germinación del 72%, hallándose entre los grupos de rendimientos intermedios.

Entre los grupos A y B, con mayor porcentaje de germinación, se encuentran los tratamientos con Captan y sus combinaciones (T1, T2, T3 y T4) y Thiram y sus combinaciones (T11, T12, T13 y T14). Con ambos fungicidas la combinación con Th incrementa la germinación, en el caso del Captan hasta un 100% y para Thiram hasta un

95%. Con Sr la germinación es menor con Captan (T4) y superior con Thiram (T12). Cuando interactúan Captan o Thiram con Th y Sr (T3 y T13), el porcentaje de germinación es inferior a la de los fungicidas solos (T1 y T11).

Los tratamientos con Carbendazim y sus combinaciones (T5, T6, T7 y T8), tuvieron un porcentaje menor de germinación (grupos homogéneos C, D y E), siendo en algunos casos inferior a la germinación del testigo.

En la combinación de Th y Sr (T9) el porcentaje de germinación (90%), es superior al testigo y equivalente a las de Captan y Thiram solos

Tabla 2: Blotter test de germinación de las semillas de tomate platense variedad Luna, efecto de los fungicidas Captan, Carbendazim, Thiram, *S. rolfsii* y *T. harzianum*

Tratamiento	Combinación			% de Germinación	Grupos Homogéneos
T1	Captan			92,5	AB
T2	Captan	Sr		85,0	ABC
T3	Captan	Sr	Th	82,5	ABCD
T4	Captan		Th	100,0	A
T5	Carbendazim			62,5	DE
T6	Carbendazim	Sr		70,0	CDE
T7	Carbendazim	Sr	Th	60,0	E
T8	Carbendazim		Th	70,0	CDE
T9		Sr	Th	90,0	AB
T10	Testigo			72,5	BCDE
T11	Thiram			90,0	ABC
T12	Thiram	Sr		97,5	A
T13	Thiram	Sr	Th	87,5	ABC
T14	Thiram		Th	95,0	A

4.1.4.2 Efectos de *S. rolfsii*, *T. harzianum* y los fungicidas sobre la germinación de la semilla de tomate

En la Fig.10a se observa el ensayo de Sr, Th y los fungicidas (Captan, Carbendazim y Thiram) con distintos tratamientos realizado en cámara de cultivo. Cuando las semillas

de tomate se sembraron *in vitro* conjuntamente con un esclerocio de Sr, colonizó la caja de Petri cubriéndola con sus hifas e impidiendo la germinación de las semillas (Fig. 10b), en cambio cuando se sembraron conjuntamente con Th, las semillas germinaron normalmente (Fig. 10d) o se produjo un incremento en el porcentaje de germinación.

Los fungicidas tuvieron distintos comportamientos, Captan (Fig. 10c, Tabla 2, T1) y Thiram (Tabla 2, T11) no afectaron la germinación de la semilla de tomate, sino que por el contrario la favorecieron. En ambos casos se incrementó el porcentaje de germinación respecto al testigo (Tabla 2, T10). En cambio, Carbendazim afectó la germinación disminuyendo el poder germinativo de la semilla de tomate respecto al testigo (Tabla 2, T5)

Figura 10. Interacción de *S. rolfsii*, *T. harzianum* y los fungicidas comerciales sobre la germinación de las semillas de tomate platense. a: ensayo en cámara de cultivo, b: el micelio de *S. rolfsii* colonizó el medio impidiendo la germinación de las semillas de

tomate, c: germinación normal en las semillas tratadas con Captan, d: semillas de tomate sembradas sobre *T. harzianum* germinando en forma normal.

4.1.4.3 Interacción entre los fungicidas, *T. harzianum* y *S. rolfii*

En la Tabla 3 se observan los resultados de la inhibición del crecimiento radial de Th y Sr en presencia de los fungicidas Thiram, Carbendazim y Captan, en comparación al desarrollo de los testigos sin fungicida.

Del análisis del comportamiento de cada uno de los fungicidas con respecto a la inhibición del crecimiento de Th y Sr (Tabla 3), se concluye que Thiram afectó en forma similar el desarrollo a Th (28,90%) y a Sr (30,48%), Carbendazim en cambio produjo mayor inhibición a Th (42,19%), que a Sr (26,46%). En el tratamiento con Captan, la inhibición de Th fue de un 30,48%, mientras que la de Sr fue de un 23,36% (Tabla 3).

Analizando la inhibición de Th por el accionar de los fungicidas evaluados (tabla 3), se observa que Carbendazim fue el fungicida que más afectó el crecimiento de Th, mientras que Thiram y Captan tuvieron efectos similares con una inhibición que variaba entre un 28-30%. Sin embargo, en el caso de Thiram no inhibió la formación de esclerocios de Sr, mientras que Captan tuvo desarrollo micelial pero no formación de esclerocios.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial inducidos por los fungicidas Thiram, Carbendazim y Captan sobre *T. harzianum* y *S. rolfii*.

TRATAMIENTO	PICR= C-T/C*100	TÉRMINOS DE LA ECUACIÓN
Thiram-Th	28,90	C= Th - testigo T= Th + Thiram
Thiram-Sr	30,48	C= Sr – testigo T= Sr + Thiram
Carbendazim-Th	42,19	C= Th – testigo T= Th + Carbendazim
Carbendazim-Sr	26,46	C= Sr – testigo T= Sr + Carbendazim
Captan-Th	30,48	C= Th – testigo T= Th + Captan
Captan-Sr	23,36	C= Sr – testigo

		T= Sr + Captan
--	--	----------------

4.2 Etapa 2: En cámara de crecimiento hasta plántula de tamaño comercial

4.2.1. Pruebas de eficacia del inóculo

El ensayo para determinar la concentración del inóculo de Sr, permitió paralelamente dilucidar cuál era la relación de Sr con la mortandad de las plántulas de tomate producida en los primeros estadios de crecimiento. En el suelo sin esclerosios de Sr (**TE1**) la germinación del tomate fue normal, con baja relación de esclerocios (**TE2**) se vio poco afectada la germinación y el desarrollo de las plántulas. El crecimiento de Sr fue escaso (Fig. 11a). Con una concentración intermedia (**TE3**) se obtuvo la relación óptima entre cantidad de inóculo y mortandad de plántulas (Fig. 11b). En los tratamientos **TE4** y **TE5** con alta concentración de esclerocios, no hubo emergencias de las plántulas y mayor desarrollo de Sr. Los resultados obtenidos, mostraron la dinámica propia de esta enfermedad, a medida que se incrementó la concentración de Sr fue incrementándose la mortandad de las plántulas hasta el punto donde se mantuvo estable, aún con un incremento de la concentración de Sr. A partir de los resultados del ensayo se buscó la función de ajuste, es decir la relación entre la concentración de inóculo y mortandad de plántulas.

Figura 11. Ensayo en cámara con diferentes dosis de inóculo. a: emergencia de plantas de tomate con desarrollo incipiente de *S. rolfsii*, b: en las celdas superiores se observan plantas de tomate recién emergidas y en la inferior mayor desarrollo de *S. rolfsii*, y sin emergencia de plántulas.

4.2.1.1. Regresión Inóculo-Mortandad

La función que mejor explicó la Mortandad (M) en relación a la Concentración de Inóculo (I) se ajustó a una curva de tipo logarítmica:

$$\text{Log I} = -3,0325 + 32,0472 * \text{Log}_{10}(x)$$

Log I = concentración de inóculo

Log₁₀(x) = valor de mortandad

Para la función antes descrita, se halló un alto grado de ajuste, indicado por el valor de $R^2=0,70$, dando un valor de probabilidad de $p=0,033$. Por lo antes mencionado se dedujo que con la función hallada de concentración de inóculo (log) explicaba en forma significativa la mortalidad de las plantas de tomate, con un grado de certidumbre mayor al 95%. Dada la información que aportó la función de la curva (Fig. 12), se definió que la concentración de inóculo que mejor se ajustaba era el tratamiento 3 (TE3=0.150 esclerocios/60 g de substrato), porque a partir de esa concentración un incremento del inóculo no producía un aumento en la mortandad de las plantas (M). Es decir, el punto TE3 representa la concentración máxima “plateau”, sería el punto de inflexión a partir del cual un incremento de inóculo no producirá cambios en los valores de M.

Figura 12. Función de ajuste de la concentración de inóculo (Log I) en relación a la mortandad de las plantas *in vitro* (M)

4.2.1.2. Efecto de *S. rolfii* en plántulas de tomate tratadas con fungicidas y *T. harzianum*

Teniendo en cuenta la escala de severidad de Sherwood y Hagedorn (1958), permitió cuantificar el impacto de la enfermedad producida por Sr en la planta. En general, se observó que la aplicación de los fungicidas o fungicida más Th produjo una adecuada protección contra el patógeno, aunque en todos los casos las plántulas presentaron síntomas cuando estuvieron en contacto con Sr. Los daños se produjeron generalmente a nivel del cuello de la planta (Fig. 13a y Fig. 13b), produciendo en los casos más severos la muerte de la plántula en la etapa de evaluación en la cámara.

Tabla 4. Evaluación de la severidad de *S. rolfsii* en plántulas de tomate, tratadas con fungicidas y Th. Escala de severidad Sherwood y Hagedorn (1958)

N.º	TRATAMIENTOS	Plántulas con síntomas	Escala de severidad de 0-4
T1	Captan	0	0
T2	Captan + Sr	2	4
T3	Captan + Sr + Th	0	0
T4	Captan + Th	0	0
T5	Carbendazim	0	0
T6	Carbendazim + Sr	1	4
T7	Carbendazim + Sr + Th	0	0
T8	Carbendazim + Th	0	0
T9	Th + Sr	3	4
T10	Testigo (Sr)	4	4
T11	Thiram	0	0
T12	Thiram + Sr	3	4
T13	Thiram + Sr + Th	0	0
T14	Thiram + Th	0	0

Analizando los resultados (Tabla 4), se deduce que Sr (T10), produjo en el 100% de las plantas estrangulamiento del cuello, debilitamiento y en algunos casos muerte de las plántulas de tomate. Cuando se trató a la semilla con los fungicidas Captan (T1), Carbendazim (T5) y Thiram (T11) más Sr un porcentaje de las plantas se enfermaron, produciendo en algunos casos muerte de las mismas por estrangulamiento del cuello.

Cuando se trató con los fungicidas más Th y Sr (T3, T7 y T13), no se manifestó la enfermedad siendo el 100% de las plantas normales.

En el caso del tratamiento de Th y Sr (T9), presentaron un porcentaje de plantas enfermas, principalmente por estrangulamiento del cuello (Fig. 13a y Fig. 13b), pero no se produjo la muerte de las mismas.

Figura 13. Estrangulamiento en la zona del cuello de la plántula de tomate producido por *S. rolfsii*. a: plántula de una semana con daño y debilitamiento en el cuello, b: plántula de 20 días persistiendo el daño en el cuello.

4.2.1.3 Observaciones microscópicas del daño producido por *S. rolfsii* en el cuello de la planta

Analizando microscópicamente a las plantas con canchros y/o estrangulamiento de cuello producido por Sr (Fig. 14), se observó en las plántulas un deterioro de los tejidos a nivel del cuello (Fig. 14a), produciendo en las plantas adultas el colapso del mismo, con presencia de micelio y canchros (Fig. 14b) y la posterior muerte de las plantas.

Figura 14. Síntomas de *S. rolfsii* en tomate. a: plántula con cancro a nivel del cuello. b: planta adulta con colapso de los tejidos del cuello, presencia de micelio y canchros.

En los tratamientos donde interactuaban Th y Sr se observó el desarrollo de hifas de ambos microorganismos (Fig. 15a) y micoparasitismo por parte de Th con enrollamiento sobre las hifas de Sr (Fig. 15b).

Figura 15. a: Fotomicrografía de interacción de hifas de Th y Sr. b: Fotomicrografía de Th donde se observa enrollamiento sobre las hifas de Sr. Observación 400X.

4.2.2 Promoción de crecimiento en plántulas de tomate por *T. harzianum* y los fungicidas

Las variables seleccionadas como indicadores para evaluar la promoción del crecimiento en plántulas de tomate por efecto de Th y los fungicidas fueron: Altura de planta, longitud de raíz, peso fresco/seco de raíz y parte aérea. En la cámara de cultivo, los tratamientos en el ensayo se dispusieron al azar (Fig. 16c), evaluándose a los 30 días cuando las plántulas alcanzaron el tamaño comercial para ser trasplantadas (Fig. 16d). En la Fig. 16a, se observa el desarrollo de las plántulas de tomate a los 7 días de su emergencia, en la Fig. 16b a los 15 días y en la Fig. 16d a los 30 días.

Figura 16. Crecimiento de plántulas de tomate platense en condiciones controladas. a: a los 7 días de emergencia, b: a los 15 días, c: disposición del ensayo en la cámara de germinación, d: a los 30 días en condiciones de ser trasplantados.

En la Tabla 5 se detalla el ANOVA y el nivel de significancia para Altura de planta, Longitud de Raíz, Peso Fresco y Seco de la Raíz, Peso Fresco y Seco de la parte Aérea, en los catorce tratamientos analizados para determinar la posible inducción del crecimiento en las plántulas de tomate a los 30 días.

En el análisis de la varianza (Tabla 5), se hallaron diferencias altamente significativas para todas las variables a excepción de altura de la planta a los 30 días. De lo que se

deduce que las diferencias entre los tratamientos, a excepción de altura de plántula, con un 95% de certeza no fueron debidas al azar (Tabla 5).

Tabla 5. ANOVA. Efecto de los tratamientos en las variables:

Altura de planta, LR, PFR, PSR, PFA y PSA.

Variable	F	P	Significancia
Altura de planta	1,7610	0,13000	N/S
Longitud de Raíz	8,1610	0,00000	**
Peso Fresco Raíz	14,1338	0,00000	**
Peso Seco Raíz	3,9707	0,00032	**
Peso Fresco Aéreo	43,6770	0,00000	**
Peso Seco Aéreo	5,4201	0,00001	**

F=valor de la prueba de F. p=valor de probabilidad. Asterisco (*) grado de significancia * significativo ** altamente significativo y N/S no significativo.

A continuación, se detallan los resultados de la prueba de Tukey para las variables seleccionadas.

4.2.2.1 Longitud radicular

En la Fig. 17 se observa los valores de las medias para longitud radicular (LR) y los grupos homogéneos por el test de Tukey para los 14 tratamientos, siendo el T10 el tratamiento testigo.

En términos generales los tratamientos con Captan (T1 a T4) y con Carbendazim (T5 a T8) tuvieron mayor desarrollo del sistema radicular que el testigo, en cambio con Thiram (T11 a T14), a excepción de T14 (Thiram+Th) que es levemente superior al testigo, todos tienen menor desarrollo

Los tratamientos T2 (Captan+Sr), T3 (Captan+Sr+Th) y T6 (Carbendazim+Sr) mostraron los mayores valores absolutos de longitud de raíz. Los mismos se diferenciaron significativamente del testigo T10. El tratamiento T3, obtuvo el mayor valor de longitud de raíz, con diferencias significativas con respecto a T7 (Carbendazim+Sr+Th) y T13 (Thiram+Sr+Th) tratamientos producto de la combinación de fungicida + patógeno + *Trichoderma*, teniendo el fungicida Captan en esta combinación el mejor comportamiento (Fig. 17).

La combinación de Th+Sr (T9), tuvo un desarrollo levemente superior al testigo, no siendo significativa la misma.

Figura 17. Grupos homogéneos test de Tukey y valores absolutos para largo de raíz en los distintos tratamientos (T1: Captan; T2: Captan+Sr; T3: Captan+Sr+Th; T4: Captan+Th; T5: Carbendazim; T6: Carbendazim+Sr; T7: Carbendazim+Sr+Th; T8: Carbendazim+Th; T9: Sr+Th; T10: testigo; T11: Thiram; T12: Thiram+Sr; T13: Thiram+Sr+Th; T14: Thiram+Th).

4.2.2.2 Peso fresco de raíz

En la Fig. 18 se observa la distribución de las medias para los catorce tratamientos y los grupos homogéneos por el test de Tukey, para peso fresco de la raíz (PFR).

En términos generales Captan (T1 a T4) sus tratamientos tuvieron mayor PFR que el testigo, diferenciándose significativamente el tratamiento T3 (Captan+Sr+Th) por ser el de mayor peso del ensayo (Fig. 18).

Con Carbendazim a excepción del T7 (Carbendazim+Sr+Th) que no tuvo diferencias significativas con el testigo, el resto tuvo más PFR, destacándose el T6 (Carbendazim+Sr) por tener mayor peso fresco de la raíz (Tabla 18). El T9 (Th+Sr) fue

levemente superior al testigo. El tratamiento donde se combinan los fungicidas+Sr+Th (T3, T7 y T13), tuvo el mayor valor de PFR la combinación con Captan que los otros fungicidas.

Con Thiram (T11 a 14) en todos los casos fue significativamente menor el PFR que el testigo y especialmente con los otros dos fungicidas (Fig. 18).

Figura 18. Grupos homogéneos test de Tukey y distribución de las medias para peso fresco de la raíz para los distintos tratamientos (T1: Captan; T2: Captan+Sr; T3: Captan+Sr+Th; T4: Captan+Th; T5: Carbendazim; T6: Carbendazim+Sr; T7: Carbendazim+Sr+Th; T8: Carbendazim+Th; T9: Sr+Th; T10: testigo; T11: Thiram; T12: Thiram+Sr; T13: Thiram+Sr+Th; T14: Thiram+Th)

4.2.2.3 Peso seco de la raíz

En la Fig. 19 se observa la distribución de las medias y los grupos homogéneos para el test de Tukey para peso seco de la raíz (PSR), para los catorce tratamientos evaluados.

Para la variable PSR se diferencian dos grupos homogéneos para todos los tratamientos, siendo de destacar que sólo los tratamientos T2 y T3, se diferenciaron

significativamente del resto de los tratamientos y el testigo. Los tratamientos del fungicida Captan y todas sus combinaciones fueron las que tuvieron el mayor PSR. En tanto, Carbendazim y todas sus combinaciones, tuvieron menor PSR que con el fungicida Captan, pero mayor PSR que el testigo. En el caso de Thiram y sus combinaciones todas tuvieron menor PSR que el testigo y los otros dos fungicidas (Fig. 19). La combinación de Th+Sr (T9) tuvo mayor PSR que el testigo (Fig.19)

Figura 19. Grupos homogéneos test de Tukey y medias para el peso seco de la raíz para los catorce tratamientos. (T1: Captan; T2: Captan+Sr; T3: Captan+Sr+Th; T4: Captan+Th; T5: Carbendazim; T6: Carbendazim+Sr; T7: Carbendazim+Sr+Th; T8: Carbendazim+Th; T9: Sr+Th; T10: testigo; T11: Thiram; T12: Thiram+Sr; T13: Thiram+Sr+Th; T14: Thiram+Th).

4.2.2.4 Peso fresco aéreo

En la Fig. 20, se observa la distribución de las medias y los grupos homogéneos según el test de Tukey para el peso fresco aéreo (PFA) de los catorce tratamientos evaluados.

Las medias con mayor masa fresca aérea corresponden a T2 (Captan+Sr), T4 (Captan+Th) y T9 (Th+Sr) diferenciándose significativamente del testigo (Fig. 20). Los tratamientos T11, T12, T13 y T14 correspondientes a Thiram y sus variantes, presentaron los menores valores para esta variable, con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos y el testigo. En el caso de Carbendazim y sus combinaciones (T5, T6, T7 y T8), tuvo un comportamiento inferior que Captan y sus combinaciones (Fig. 20).

Figura 20. Grupos homogéneos test de Tukey y medias para el peso fresco aéreo de los tratamientos evaluados. (T1: Captan; T2: Captan+Sr; T3: Captan+Sr+Th; T4: Captan+Th; T5: Carbendazim; T6: Carbendazim+Sr; T7: Carbendazim+Sr+Th; T8: Carbendazim+Th; T9: Sr+Th; T10: testigo; T11: Thiram; T12: Thiram+Sr; T13: Thiram+Sr+Th; T14: Thiram+Th).

4.2.2.5 Peso Seco Aéreo

En la Fig. 21 se observa la distribución de las medias y los grupos homogéneos según el test de Tukey para el peso seco aéreo (PSA) para los catorce tratamientos evaluados.

Para la variable peso seco aéreo (Fig. 21), si bien se mantuvo la tendencia expresada en la variable PFA (Fig. 20), donde T2, T4 y T9 presentaron los mayores valores, en el caso de PSA, el único tratamiento con diferencias significativas respecto al testigo (T10), fue el T2 (Captan+Sr). En el caso del Thiram los tratamientos T12 y T14 (Fig. 21) tuvieron mejor comportamiento que en el peso fresco aéreo (Fig. 20) que en general fue muy bajo.

De lo observado en la Fig. 21 se concluye que el fungicida que tuvo mejor comportamiento fue Captan.

Figura 21. Grupos homogéneos según el test de Tukey y las medias para el peso seco aéreo de los tratamientos evaluados. (T1: Captan; T2: Captan+Sr; T3: Captan+Sr+Th; T4: Captan+Th; T5: Carbendazim; T6: Carbendazim+Sr; T7: Carbendazim+Sr+Th; T8: Carbendazim+Th; T9: Sr+Th; T10: testigo; T11: Thiram; T12: Thiram+Sr; T13: Thiram+Sr+Th; T14: Thiram+Th).

4.3 Etapa 3: En planta adulta a campo

4.3.1 Desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de tomate a campo

En la tercera etapa del ensayo, se evaluó el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas de tomate platense a campo. En los ensayos a campo solamente se consideró para el ensayo al fungicida Captan, debido a que de los tres fungicidas fue el que mostro la mejor performance para las variables evaluadas en la etapa *in vitro*: germinación, PICR, acción frente al patógeno (inhibición de formación de esclerocios). Asimismo, mostró una alta tasa de crecimiento las plántulas tratadas con Captan+Th y Captan+Th+Sr tuvieron mejor comportamiento con respecto a las variables LR, PFR y PSR y menor severidad de Sr lográndose plántulas de excelentes condiciones.

Para implantar el ensayo a campo, primero se obtuvieron las plántulas de tomate platense en cámara de cultivo, sembrándolas en bandejas de germinación y se mantuvieron en la misma hasta alcanzar el tamaño de plantín comercial (aproximadamente 30 días) y posteriormente se trasplantaron a campo.

Los tratamientos evaluados desde la siembra hasta finalizar el ensayo a campo fueron: **TC1**: Testigo semilla desinfectada; **TC2**: semilla+Sr; **TC3**: semilla+Th; **TC4**: semilla+Th+Sr; **TC5**: semilla con Captan; **TC6**: semillas con Captan+Sr; **TC7**: semillas con Captan+Th+Sr; **TC8**: semillas con Captan+Th.

Como puede observarse en la (Fig. 22a) el establecimiento del cultivo fue óptimo luego del trasplante. Todos los tratamientos mostraron un crecimiento vegetativo similar, sin pérdidas de plantas durante esta etapa de crecimiento (Fig. 22b y Fig. 22c). A las 6 semana del trasplante comenzó la floración (Fig. 23a) y posteriormente formación de los frutos de forma arriñonada que es característico del tomate platense variedad Luna (Fig. 23b). A las 16 semanas había completado su ciclo comenzando a producirse la muerte de las plantas (Fig. 23c).

Figura 22. Desarrollo de las plantas de tomate a campo a: plántulas recién trasplantadas, b: ensayo a campo a la semana de trasplantadas, c: plantas de 30 días de trasplantadas en pleno desarrollo vegetativo.

Figura 23. Estado reproductivo de las plantas de tomate a campo. a: planta en inicio de floración, b: tomates arriñonados típicos de la variedad platense, c: planta adulta al final del ciclo.

4.3.2 Parámetros evaluados a campo

4.3.2.1. Promedio de flores

Tomando como fecha promedio de floración 60 días post trasplante (coincidente con 12-14 hojas expandidas), se evaluó el promedio de flores por planta en las cinco repeticiones de cada uno de los tratamientos (Fig. 24). El análisis de la varianza (ANOVA) aplicado para el promedio del número de Flores/planta no dio diferencias significativas entre tratamientos $F=1,0667$ $p=0,468$.

Figura 24. Grupos homogéneos del test de Tukey y dispersión del promedio de flores a los 60 días. TC1: Testigo; TC2: Sr; TC3: Th; TC4: Th+Sr; TC5: Captan; TC6: Captan+Sr; TC7: Captan+Th+Sr; TC8: Captan+Th.

No obstante, en valores absolutos, se observó un mayor número de Flores/Planta para los tratamientos TC1, TC3, TC7 y TC8 (Fig. 24), que a excepción de TC1 que es el testigo, en el resto de los tratamientos se encuentra presente Th y en los de menor cantidad TC2 y TC4 en ambos tratamientos está Sr y TC5 donde está interactuando solo el fungicida.

4.3.1.2 Promedio de frutos

Al igual que en el promedio de Flores por planta, la variable promedio del número de Frutos por planta en las cinco repeticiones (Fig. 25) en los diferentes tratamientos no tuvo diferencias significativas.

Figura 25. Grupos homogéneos test de Tukey y dispersión del promedio de número de frutos por planta (TC1: Testigo; TC2: Sr; TC3: Th; TC4: Th+Sr; TC5: Captan; TC6: Captan+Sr; TC7: Captan+Th+Sr; TC8: Captan+Th).

Aunque estadísticamente no tuviesen diferencias significativas entre los distintos tratamientos se observa (Fig. 25) que los promedios más elevados los tiene los tratamientos TC7 (Captan+Th+Sr) y TC8 (Captan+Th) y el más bajo el tratamiento TC6 (Captan+Sr).

4.3.1.3 Curva de crecimiento

Para construir la curva de crecimiento de las plantas en los distintos tratamientos a campo, se tomó como referencia la altura de las mismas en centímetros cada 15 días

considerándose como el inicio del ensayo el día que se trasplantaron las plántulas de tomate al campo. Con estos valores obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento para cada uno de los tratamientos (Fig. 26).

Figura 26. Crecimiento de las plantas en condiciones de campo desde el trasplante hasta su cosecha. (TC1: Testigo; TC2: Sr; TC3: Th; TC4: Th+Sr; TC5: Captan; TC6: Captan+Sr; TC7: Captan+Th+Sr; TC8: Captan+Th).

En la variable, altura de planta se observó un comportamiento de crecimiento típicamente sigmoideo (Fig. 26), respondiendo a lo esperado para esta variable. Para el valor promedio de altura de planta por tratamiento no se hallaron diferencias estadísticamente significativas $F=1,726$ y $p=0,138$, en el análisis de la varianza (ANOVA)

4.3.1.4 Rendimiento por planta

Se calculó teniendo en cuenta el rendimiento en g de fruta por planta en cada uno de los tratamientos hasta el final del ciclo (5 meses). Se hallaron diferencias altamente significativas para el rendimiento por planta, entre tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. ANOVA del Rendimiento de frutos de tomate por planta

Effect	Univariate Tests of Significance for REND. PRO/PL* Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1039095	1	1039095	70,58124	0,000000
TRATAMIENTO	400875	7	57268	3,88995	0,003584
Error	471103	32	14722		

Los resultados de la prueba de ANOVA arrojaron un valor de $F=3,889$ y $p=0,00358$ ambos altamente significativos (valores resaltados en rojo). Es decir que para la variable Rendimiento estimado/planta, tuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

En la Fig. 27, se observan los grupos homogéneos y el promedio para el rendimiento por planta. El mejor comportamiento en términos absolutos fue el TC7 (Captan+Th+Sr) teniendo un promedio de 327 g/planta seguido por TC3 (Th) con 290 g/planta. Sin embargo, TC7 fue el único tratamiento con diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo,

Analizando la composición de los tratamientos de mayor rendimiento TC7 y TC3 en ambos se encuentra a Th y en los de menor rendimiento TC5 y TC6 a Captan. Sin embargo, en el tratamiento TC7 Captan y Th que tuvo el mayor rendimiento, indicaría que no tienen incompatibilidad entre ambos e interactuarían en el control de Sr (Fig. 27).

En TC2 donde solamente está presente el patógeno, no tuvo diferencias significativas en su rendimiento con el testigo, siendo superior a TC5 (Captan) y TC6 (Captan+Sr). En la combinación TC8 (Captan+Th) aquí el rendimiento es superior al testigo (Fig. 27)

Figura 27. Grupos homogéneos test de Tukey y medias para rendimiento por planta a la cosecha. TC1: Testigo; TC2: Sr; TC3: Th; TC4: Th+Sr; TC5: Captan; TC6: Captan+Sr; TC7: Captan+Th+Sr; TC8: Captan+Th.

4.3.2. Severidad de *Sclerotium rolfii* en plantas adultas de tomate platense a campo

El efecto de Sr sobre las plantas de tomate en condiciones de campo, se evaluó a través de la severidad (Agrios, 2005) observada en la planta adulta (Fig. 28, Fig. 29 y Fig. 30). Para medir la severidad, se utilizó al igual que en la etapa previa la escala de Sherwood y Hagedorn (1958), donde se asigna el valor “0” a la ausencia de síntomas, con una graduación intermedia llegando al valor “4” como punto máximo de la escala en el cual se observa la muerte por estrangulamiento de las plantas.

En la Fig. 28a se observa una planta sana, sin síntomas (Nivel de severidad=0). En la Fig. 28b la planta presenta síntomas leves en el tallo (decoloración de los tejidos) y en el suelo, comienza a aparecer micelio color blanco con aspecto algodonoso compatible con Sr y por lo menos un esclerocio color canela en la base del tallo (Equivalente a Nivel 1 de severidad). En la Fig. 29a, avanza Sr colonizando las raíces inferiores (Nivel 2 de severidad). Posteriormente se disemina por el resto del sistema radicular expandiéndose

hacia la base del tallo (Fig. 29b, nivel de severidad 3). Uno de los síntomas frecuentes observado en las plantas infectadas es la pérdida de volumen y turgencia de la base del tallo, tomando un aspecto anguloso.

Figura 28. Nivel de severidad: a: planta sana con desarrollo normal, (Nivel de severidad N=0) b: raíz colonizada con micelio de *S. rolfsii*, con esclerocio adherido (Nivel de severidad N=1).

Figura 29. Nivel de severidad. a: raíz colonizada con micelio y tallo con aplanamiento (Nivel de severidad N=2), b: raíz y tallo colonizados con micelio, con daño incipiente en el cuello (Nivel de severidad N=3).

En la última etapa de avance de la enfermedad se observa el daño completo del tallo para finalmente provocar el colapso de la parte inferior del mismo y como consecuencia la muerte de la planta (Fig. 30a y 30b), (Nivel de severidad 4).

Figura 30. Nivel de severidad. a: estado avanzado de la enfermedad se observa micelio en el tallo con deterioro de la estructura (nivel de severidad N=4). b: estado avanzado de la enfermedad, colapso de tejidos en la raíz y tallo. Muerte de la planta (Nivel de severidad N=4).

El nivel de severidad 2 se observó en los tratamientos TC4 (Th+Sr) y TC7 (Captan+Th+Sr) (Tabla 7), la expresión de la enfermedad fue compatible con un adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas no afectándose el rendimiento por planta en estos tratamientos (Tabla 7, Fig. 27) debido a que el nivel de severidad fue nulo o muy bajo.

En la Tabla 7 se observa el nivel de severidad inducido por Sr en los ocho tratamientos donde se combina al fungicida Captan, Th y Sr.

Tabla 7. Severidad de *S. rolfsii* en plantas adultas de tomate a campo tratadas con *Trichoderma* y el fungicida Captan

N.º	TRATAMIENTOS	N.º de Plantas con síntomas	Nivel de severidad				
			0	1	2	3	4
TC1	Testigo	0					
0TC2	Sr	4			*		***
TC3	Th	0					
TC4	Th + Sr	2			**		
TC5	Captan	0					
TC6	Captan + Sr.	2				**	
TC7	Captan + Th + Sr	1			*		
TC8	Captan + Th	0					

Del análisis de los resultados (Tabla 7), se deduce que en los tratamientos donde estuvo presente Sr se manifestaron en mayor o menor grado sintomatología compatible con la enfermedad (Fig. 29a y Fig. 29b). En TC2 donde solo interactuaba Sr, se manifestó el mayor grado de severidad, en este caso 3 de las 4 plantas enfermas presentaron estrangulamiento y posterior muerte de las mismas (Tabla 7, Fig. 30a y Fig. 30b).

En los tratamientos TC4, TC6 y TC7 (Tabla 7), donde está presente Sr en combinación con Th o Captan, se observaron plantas enfermas con un grado de severidad menor lo que le permitió que sobrevivieran las plantas y terminaran su ciclo.

En el TC7 donde interactúan el fungicida, Th y Sr, la presencia del patógeno indujo síntomas, pero la severidad del mismo fue mínima. En este caso las plantas se desarrollaron completando su ciclo, sin tener diferencias significativas con los tratamientos de mayor rendimiento/planta (Fig. 27).

5. DISCUSIÓN

5.1 Etapa 1: “in vitro”

5.1.1 Micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre los esclerocios de *Sclerotium rolfsii*

En los ensayos *in vitro* realizados, la cepa de Th del IFSC mostró tener facilidad para ser aislada, multiplicada y con un rápido crecimiento, otros autores en cepas de Th con esas características, consideraron que las mismas podrían ser utilizadas como insumo biológico (Papavizas et al. 1982; Wright et al. 2000; Ezziyyani et al. 2004; Infante 2009; Martínez et al. 2013, Hernández-Melchor et al. 2019; Hernández-Melchor et al. 2019; Bader et al. 2019, 2020).

La efectividad de las *Trichodermas* para el control de enfermedades fúngicas, ha sido comprobada por diversos autores, en varias especies y patógenos (Menéndez 1996; Alonso Reyes et al. 2002; Harman, 2005; Correa 2007; Martínez et al. 2013; Olivera Costa y Rodríguez 2014), uno de los hongos que controlaría es Sr que produce en algunos casos el “damping-off” en almácigos, daños en cultivos bajo cubierta y a campo (Menéndez 1996; Alonso Reyes et al. 2002; Harman, 2005; Correa 2007; Martínez et al. 2013; Olivera Costa y Rodríguez 2014).

La Th del IFSC ha controlado ya sea en forma total o parcial, sola o con el accionar conjunto con los fungicidas enfermedades fúngicas como por ejemplo *Ustilago bullata* en *Bromus catharticus* (Astiz Gasso et al. 2009a) y a *Tilletia laevis* en trigo (AstizGasso et al 2009b) y especialmente a *Sclerotium rolfsii* en tomate donde uno de los mecanismo analizados fue el accionar de la *Trichoderma* en el control y destrucción de los esclerocios, obteniéndose indicios para dilucidar los mecanismos de acción y la efectividad de Th en el control de los órganos de resistencia de Sr.

Se observó, a través de los cortes histológicos, el micoparasitismo de la cepa Th del IFSC sobre los esclerocios de Sr, paralelamente Th favoreció el proceso de degradación de las paredes del esclerocio, asimilando y nutriéndose del contenido celular de los mismos. Resultados similares fueron observados por Harman 2005; Correa et al. 2007; Martínez 2013; Olivera Costa y Rodríguez 2014.

Como resultados de este trabajo, se observó como la cepa de Th del IFSC, destruyó totalmente las estructuras de resistencia hasta el colapso del esclerocio de Sr, provocando la retracción de la membrana plasmática y la desorganización del citoplasma (Fig. 6b, 7a y 7b), poniéndose en evidencia la eficacia y eficiencia de la misma para destruir *in vitro* a los esclerocios de Sr. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en trabajos previos realizados con distintas cepas de Th por Guédez et al. (2012); Rodríguez y Flores (2018); Hernández-Melchor et al. (2019); Bader et al. (2019, 2020).

5.1.2 Cinetismo e inhibición *in vitro* de *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfii*

La velocidad de crecimiento (cinetismo) de una especie, es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar un área, cuando se compite por el espacio y/o nutrientes, esta es una manera de ejercer biocontrol al reducir o detener completamente el desarrollo del micelio del patógeno (Guédez et al. 2012).

La tasa de crecimiento de Th del IFSC fue del tipo lineal, teniendo desde el inicio de su cultivo un crecimiento radial de 1,5 mm/día. En contraste, Sr se asimiló a una curva exponencial, con un crecimiento aplanado al inicio del cultivo, acelerándose hacia al final de la curva de crecimiento. El valor de la tasa linealizada de Sr fue de 0,75 mm/día lo que indica un valor inferior en términos absolutos con respecto a Th. La mayor tasa de crecimiento de Th le estaría dando una ventaja competitiva por los nutrientes y el espacio a la cepa de Th del IFSC con respecto a Sr. Estos resultados son coincidentes con los observados por numerosos autores (Wright et al. 1988, Guédez et al. 2012, Samaniego-Fernández 2018), variando solamente la cinética en las distintas cepas de Th evaluadas.

Th produjo inhibición de la actividad de Sr (PICR=23,35%), cuando se los cultivó en conjunto, lo que demostró el efecto inhibitorio de Th sobre Sr. La inhibición se produjo tanto para la tasa de crecimiento diario como para el crecimiento acumulado. Los resultados obtenidos coinciden con lo observado por otros autores donde *Trichoderma* spp., dependiendo de la cepa, tenía un efecto de inhibición sobre el patógeno de un 20 a un 100%, retrasando el crecimiento de diferentes patógenos (Correa et al. 2007; Varaschin 2011; Rodríguez y Flores 2018; Bader et al. 2019, 2020).

Los resultados de los ensayos con la cepa de Th del IFSC permitieron comprobar la habilidad de competencia de esta cepa, ya que prácticamente duplicó su crecimiento con respecto a Sr ocupando el espacio en forma más efectiva y paralelamente enlenteció el crecimiento de Sr en los cultivos duales. Este tipo de antagonismo se vería favorecido por características propias del agente de control biológico, en particular su plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo o por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad (Infante et al. 2009; Rodríguez y Flores 2018; Bader et al. 2019, 2020).

Por otro lado, la cepa Th evaluada, tuvo un efecto de micoparasitismo con Sr, desarrollándose quimiotrópicamente hacia el hospedante, adhiriéndose sus hifas al mismo y con frecuencia las enrolló y ocasionalmente las penetró, como pudo observarse en las Fig. 15a y Fig. 15b. Estas observaciones concuerdan con lo hallado por Pérez et al. (2020) donde en la evaluación de la capacidad antagonista de aislamientos de cepas nativas de *Trichoderma*, observaron como en la zona de contacto de los microorganismos se producía la adhesión, enrollamiento y penetración de las hifas de *Trichoderma* en las hifas del patógeno.

De los resultados obtenidos con la cepa de Th del IFSC se pudo comprobar que tanto el micoparasitismo como la inhibición son mecanismos complementarios, brindando a Th mayor eficiencia en su accionar antagonista, estos resultados coinciden con lo señalado por Stocco (2014).

5.1.3 Efecto de los fungicidas comerciales, *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii* sobre la germinación de la semilla de tomate platense y el PICR

Los indicadores analizados para evaluar la compatibilidad entre los fungicidas comerciales Captan, Thiram y Carbendazim, *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii* fueron germinación y antagonismo entre Th y Sr (PICR).

Con respecto a germinación, los porcentajes superiores al testigo, se observaron en los tratamientos con Captan y Thiram y especialmente en las combinaciones de ambos con

Th, con incrementos que variaron entre 22,5 al 27,5%, en cambio con Carbendazim tuvo una tasa inferior de germinación a la del testigo (12,5%) y con la combinación con Th no hubo diferencias significativas.

Estos resultados indicarían que, en germinación, la cepa Th de IFSC, tuvo mayor compatibilidad con Captan o Thiram, que con Carbendazim. Del análisis de los resultados se deduce que la aplicación de Th en combinación con Captan o Thiram tiene un efecto promotor de la germinación, mientras que con Carbendazim es indiferente, aunque Carbendazim solo actúa como inhibidor de la germinación reduciendo la misma con respecto al testigo.

En otros estudios (Pal y MacSpandden Gardener 2006; Kumar et al. 2014; Peláez Álvarez et al. 2016), también observaron un efecto promotor de la germinación por acción de Th o de Th con determinadas combinaciones de fungicidas. Este tipo de especificidad entre una cepa de Th y el principio activo ha sido comprobado por Mc Lean et al. (2001); Silva et al. (2018); Espinosa-Ahumada et al. (2019), teniendo comportamientos diferentes de acuerdo a las cepas y los principios activos del fungicida utilizado.

En algunos trabajos, a esta actividad de promoción de Th en la germinación de las semillas, la denominaron *biopriming* (Conrath et al. 2006; Saba et al. 2012; Martínez et al. 2013; Nosir, 2016; Coppola et al. 2017). Es de destacar que en el caso de Th del IFSC también manifestó tener un efecto de promoción o *biopriming* con respecto a la germinación de las semillas de tomate platense variedad Luna.

Otro de los indicadores de compatibilidad analizados fue el PICR, en este caso se comprobó que los tratamientos de Th con Captan o Thiram tuvieron valores de PICR del 28-30%, mientras que con Carbendazim fue del 42 %, teniendo un mayor efecto inhibitorio este último principio activo sobre Th. Esto coincide con lo observado en germinación donde Th con Carbendazim tuvo un valor significativamente menor comparado con Captan y Thiram.

Los resultados en germinación concuerdan con los obtenidos por Mc Lean et al. (2001) donde evaluando la germinación de conidios de Th expuestos a diferentes fungicidas entre ellos Captan hallaron diferencias significativas para estos fungicidas y en cambio

fueron no significativas para Carbendazim. Con Thiram, el efecto sobre los conidios de Th fue opuesto produciendo la inhibición de los mismos. La cepa de Th del IFSC no se vio afectada por este principio activo. Por otro lado, en los tratamientos de Th-Carbendazim los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* midiendo el PICR, fueron similares a los obtenidos por Castillo et al. (2017) quienes también observaron un efecto inhibitorio del Carbendazim sobre las cepas de *Trichoderma* spp.

Ingham y Coleman (1984); Chen et al. (2001); Chen y Edwards (2001); Tort y Turkyilmaz (2003), observaron un efecto sinérgico entre Th y los fungicidas, especialmente Captan y Thiram incrementándose la germinación tanto solos como interactuando con Th.

Como corolario, la variabilidad en el comportamiento de la cepa de Th del IFSC y los fungicidas analizados, pone en evidencia la alta especificidad entre la cepa y el principio activo utilizado como fungicida. De esta forma se comprobó variabilidad genética del Género *Trichoderma* como de la especie Th del IFSC (Varaschin, 2000; Mc Lean et al. 2001; Martínez et al. 2016; Bader et al. 2019, 2020).

Esta variabilidad en Th podría producirse por cambios mutacionales somáticos ya que la mayoría de las cepas de Th están adaptadas a reproducirse por un ciclo de vida asexual. En ausencia de meiosis, las mutaciones somáticas producirían la mayoría de la variabilidad genética lo que le conferiría mayor plasticidad. Las mutaciones genéticas somáticas se producirían por cambios a nivel del ADN, del cromosoma o en el número cromosómico.

Estas alteraciones podrían verse favorecidas porque la mayoría de las células de Th tienen varios núcleos, siendo más de cien en algunas células vegetativas lo que incrementaría la posibilidad de producirse mutaciones. Algunos de los factores genéticos asexuales, tales como la recombinación parasexual y la mutación somática contribuirían a la variación genética de la especie. De este modo, Th podrían evolucionar rápidamente produciendo distintos genotipos y fenotipos otorgándole mayor variabilidad genética para combinarse con los distintos principios activos de los fungicidas (Yedidia et al. 1999; Romero-Arenas et al. 2009).

Las cepas silvestres de Th, en general, son muy plásticas y la mayoría heterocarióticas, en cambio, las utilizadas para control biológico en agricultura son homocarióticas. La selección de distintas cepas silvestres y el control de la variación permite que las cepas comerciales sean genéticamente distintas y homocarióticas y como consecuencias no variables, que sería el caso de Th del IFSC (Yedidia et al. 1999; Romero-Arenas et al. 2009).

5.2 Etapa 2. En Cámara de Crecimiento

5.2.1 Prueba de patogenicidad y virulencia de *Sclerotinium rolfsii* en cámara de crecimiento

Al evaluarse el comportamiento de Sr en tomate platense y su relación con la mortandad en la germinación de las semillas y de las plántulas, se halló que la concentración de inóculo más adecuada para expresar la enfermedad era de $I=0,150$ g de esclerocios cada 60 g de sustrato. Esta cantidad de inóculo era lo mínimo requerido para obtener el máximo de M, dado que un incremento en el inóculo no variaba el número de plantas muertas, siendo la función obtenida de tipo $\text{Log } I = -3,0325 + 32,0472 * \text{Log}_{10}(x)$ con un ajuste de $R^2=0,70$. Alonso Reyes et al. (2002) obtuvieron valores similares sobre el potencial de infección de Sr, aunque la ecuación fue de tipo lineal y no exponencial con un *plateau* similar a los obtenidos con la cepa evaluada.

En cuanto, a los efectos directos de Sr sobre el material vegetal (plántula), con esta dosis y en condiciones controladas, el hongo produjo pudrición basal cerca del cuello con lesiones hundidas (cancros) castaños rojizos en el tallo y en la raíz principal. En la zona afectada se observó el micelio del Sr en el cuello de la planta y en el suelo. En la planta se produjeron abundantes esclerocios, paralelamente las hojas se necrosaron y marchitaron quedando adheridas al tallo (Xu et al. 2010).

Usando la escala de Sherwood y Hagedorn (1958) la expresión de la enfermedad fue la máxima, es decir que todas las plantas enfermas mostraron el mayor valor de la escala con estrangulamiento y muerte de la plántula, resultados similares fueron obtenidos por Alonso Reyes et al. (2002).

Es posible, que a campo no sea tan eficiente el accionar del esclerocio como en condiciones controladas de laboratorio, ya que en el campo interactúan muchos factores orgánicos e inorgánicos, especialmente otros microorganismos, pudiendo hacer variar la dosis de inóculo más adecuada (Caiza Chimarro 2013) y por otro lado, los esclerocios pueden ser más susceptibles al ataque de la microbiota nativa del suelo (Samaniego Gaxiola 2008), pero considerando que esta dosis en condiciones controladas fue muy eficiente para manifestar la enfermedad y provocar la muerte de las plantas, hizo presuponer que la dosis sería también la más adecuada para aplicar en los ensayos a campo.

5.2.2 Efecto de los fungicidas comerciales, *Trichoderma harzianum* y *Sclerotium rolfsii* sobre tomate platense en condiciones controladas

En el ensayo de plántulas de tomate, en condiciones controladas de crecimiento, se comprobó el efecto directo de Sr sobre las plántulas. El desarrollo y multiplicación de Sr se dio tanto en el cuello como en la parte inferior del tallo de las plantas a una velocidad de crecimiento equivalente a la desarrollada en el sustrato en las pruebas *in vitro*. Esta similitud podría deberse a que no tenía ningún factor o microorganismo que compitiera con Sr por estar en un sustrato estéril. Resultados similares fueron obtenidos por Caiza Chimarro (2013), quien determinó que la germinación y multiplicación de Sr ocurre por múltiples puntos cuando está en arena estéril y PDA; en contraste, en arena no estéril el hongo germina por determinados sitios formando cordones miceliales, lo que facilitaría que la microbiota circundante puede inhibir en parte la germinación y afectar la sobrevivencia de Sr.

Paralelamente, se observó un efecto sinérgico entre Th y los fungicidas, especialmente Captan y Thiram favoreciendo el desarrollo de las plantas en la primera etapa de crecimiento (Ingham y Coleman 1984; Chen et al. 2001; Chen y Edwards 2001; Tort y Turkeyilmaz 2003.)

Th con Thiram y Carbendazim tuvo un comportamiento diferente, ya que en estos tratamientos no hubo manifestación de síntomas de la enfermedad en el estado de plántulas. Sin embargo, en los tratamientos donde se aplicaron por separado los

fungicidas químicos o Th, un porcentaje de las plantas se enfermaron con síntomas compatibles con los de Sr, resultados similares fueron obtenidos por Silva et al. (2018).

Comparando el desarrollo de las plántulas desde germinación hasta los 30 días, medido a través de la masa aérea y radicular, se evidenció la actividad de promoción del crecimiento (PGPR) en el tratamiento de los fungicidas con Sr y la de Th sola o en combinación de los fungicidas comerciales, teniendo un comportamiento variable, según el principio activo del fungicida utilizado en el tratamiento de la semilla, resultados similares han sido obtenidos por diversos autores (Fernández-Larrea Vega 2001; Pal y MacSpadden Gardener 2006; Kumar et al. 2014).

La promoción del crecimiento se observó especialmente en las variables relacionadas con el crecimiento radicular (Longitud, PFR y PSR), esto podría deberse a que Th compite por la dominancia de la zona radicular de los cultivos y paralelamente produce toxinas (trichodermin y harzianopiridona) evitando el desarrollo de otros hongos alrededor de la rizosfera. En este proceso se producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan el desarrollo vegetal (Bruinsma 1962; Caiza Chimarro 2013).

Diversos autores han documentado las respuestas de las plantas tratadas con Captan, en todos los casos incrementó significativamente las cantidades de NH_4 , NO_3 y N libre en el suelo, en comparación con los controles no tratados (Chen et al. 2001; Chen y Edwards 2001; Tort y Turkyilmaz 2003, Pelaez-Alvarez et al. 2016.). Según Chen et al. (2001), el éxito de la germinación de las semillas de trigo después de 7 días y el incremento de la biomasa de la planta (brote + raíces) se debió a una absorción total mayor de nitrógeno, favoreciendo el tratamiento con Captan la absorción del mismo.

Según Tort y Turkyilmaz, (2003) analizando las hojas tratadas con Captan a concentraciones recomendada por el comerciante, se incrementó la cantidad de clorofila, así como el contenido de carotenoides de la hoja, teniendo el Captan una influencia general mayor y más duradera sobre la actividad microbiana del suelo y la dinámica del nitrógeno. A dosis superiores disminuye la actividad y perjudica al cultivo (Chen y Edwards 2001).

En los tratamientos donde mejor se observó este mecanismo fue en los que interactuaron Captan+Sr y Th+Captan+Sr, lo que podría indicar estimulación del

crecimiento, acompañado de un control de Sr, en concordancia con los resultados de Larenas y Montealegre (1994).

Se podría considerar que Th y los fungicidas Captan y Thiram favorecieron el proceso de germinación y particularmente en los tratamientos con Captan se produjo promoción del crecimiento de las plántulas, logrando un sistema radicular más abundante y desarrollado, brindándole además un efecto protector frente a Sr, obteniéndose así una planta más vigorosa al momento del trasplante. Resultados similares fueron obtenidos por Elad et al. 1981; Ortiz Molinuevo 1995; Varaschin et al. 2000; Mc Lean et al. 2001; Saxena et al. 2014.

Es posible que dichos resultados se correspondan a uno o varios factores como una reacción de resistencia sistémica inducida (RSI) la misma se encuentra ampliamente documentada para el género *Trichoderma* (Conrath et al. 2006; Shores et al. 2010; Sharon et al. 2011; Battaglia et al. 2013; Coppola et al. 2017) o una mayor cantidad de N para ser utilizado por la planta (Chen et al. 2001; Chen y Edwards 2001; Tort y Turkyilmaz 2003.) o mayor producción de clorofila (Tort y Turkyilmaz 2003).

5.3 Etapa 3: Planta adulta a campo

5.3.1 Evaluación del comportamiento a campo de las plantas de tomate platense tratadas con Captan, *Trichoderma harzianum* y *Sclerotinium rolfsii*

En el ensayo a campo se analizó fundamentalmente el comportamiento de la cepa de Th del IFSC en condiciones naturales, ya que no siempre las observaciones realizadas en laboratorio en condiciones *in vitro* se corresponden con lo que sucede en condiciones de campo, donde interaccionan muchos factores (planta, suelo, actividad de otros microorganismos, supervivencia, capacidad de colonización etc.). Teniendo también influencia la cantidad de inóculo antagónico existente en el suelo, concentración de carbono, nitrógeno, hierro y espacio físico, variaciones en la esporulación de la *Trichoderma* spp. cuando crece sobre la colonia del patógeno degradándolo y alimentándose del mismo (Caiza Chamarro 2013).

Otro factor que influye en la actividad antagonista de la Th, son los microorganismos existentes en el suelo, ya que a pesar que pueden ser semejantes, los mismos pueden ser

especies con constitución genética diferente, lo que impide que el antagonismo sea totalmente favorable, variando en el tiempo de crecimiento y agresividad ante el patógeno analizado, ya que los hongos son muy adaptables y evolucionan rápidamente en condiciones *in vitro* (Caiza Chimarro 2013)

Para el ensayo a campo se seleccionó como fungicida químico a Captan, debido a que tenía un efecto sinérgico con Th favoreciendo el crecimiento de las raíces y la parte aérea de las plántulas. Por otro lado, no impedía el accionar de Th como biocontrolador y en algunos casos lo favorecía. Resultados similares han sido publicados por numerosos investigadores (Fernández-Larrea Vega 2001; Conrath et al. 2006; Pal y MacSpandden Gardener, 2006; Shores et al. 2010; Sharon et al. 2011; Battaglia et al. 2013; Coppola et al. 2017; Kumar et al. 2014).

Las variables evaluadas fueron el número de flores por planta, número de frutos y altura de la planta. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se vieron diferencias estadísticamente significativas para la prueba de Tukey. Esto, estaría indicando que a nivel de campo no se tuvo un efecto favorable del tratamiento con Th para estas variables. Dichos resultados podrían deberse a que los caracteres evaluados no están influidos por factores externos o bien que actuaron otros mecanismos que interfirieron en el accionar de Th como por ejemplo humedad del suelo, temperaturas máximas y mínimas, sobrevivencia de Th en el suelo de acuerdo al formulado utilizado, cantidad de patógenos en el mismo, etc. (Toribio y Rodríguez-kábana 1992; Caiza Chimarro 2013; Stocco et al. 2019). Sin embargo, en términos cualitativos, se observó en los tratamientos con Th un mejor estado sanitario respecto a las plantas no tratadas, aún en presencia de Sr.

En cambio, en la variable Rendimiento/planta se hallaron diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento TC7, que combinó Captan+Th+Sr presentó el mayor valor de Rendimiento/planta, con diferencias significativas con respecto a los tratamientos TC5 (Captan) y TC6 (Captan+Sr). Según Bruinsma (1962), la estimulación a nivel vegetativo de un fungicida orgánico o biológico puede reflejarse con mayor producción o un crecimiento vegetativo mayor o más prolongado. En el caso de Th del IFSC podría haber actuado incrementando el crecimiento.

La combinación del fungicida con Th, hizo que la planta conservara su sanidad en presencia del patógeno. Por lo tanto, el efecto de Th y Captan fue sinérgico ya que brindó protección contra Sr y produjo estimulación de su rendimiento. Este doble efecto fue descrito por Larenas y Montealegre, (1994) donde Th brindó protección e incrementó la masa verde (Varaschin et al. 2000 a, b, c, 2011) y un desarrollo vegetativo más prolongado (Bruinsma 1962).

En relación al efecto del patógeno, en todos los tratamientos con *S. rolfsii* se manifestaron los síntomas de la enfermedad, con el grado mayor de severidad en el TC2 donde se inoculó sólo con Sr. En los tratamientos con Sr donde se combinaba con Captan o Th (TC4, TC6 y TC7), la enfermedad tuvo una expresión atenuada lo que permitió a las plantas completar su ciclo de crecimiento y dar frutos. Resultados similares fueron observados por Bruinsma (1962), combinando los fungicidas Captan y Karathane redujo la caída de los frutos, variando los efectos con la especie vegetal, el cultivar, la etapa de desarrollo de la planta y de las condiciones fisiológicas y ambientales.

El tratamiento que manifestó mejor comportamiento fue el TC7 (Captan+Sr+Th) destacándose del resto porque si bien se observaron síntomas, la severidad de los mismos fue baja. Es decir que se estableció un equilibrio entre patógeno-antagonista permitiendo que la planta exprese todo su potencial productivo dando como resultado que el TC7 tuviera el mayor Rendimiento/planta respecto a los otros tratamientos. Los resultados son coincidentes con los de Abarza et al. (2017) donde *Trichoderma* spp. brindó protección a las plantas y un mejor desarrollo, produciéndose un efecto sinérgico entre planta y *Trichoderma* spp. Asimismo, similares resultados fueron obtenidos por Amerío et al. (2020) donde se demuestra la capacidad de *Trichoderma* spp. para mejorar la respuesta de las plantas a diferentes factores tanto de estrés biótico como abiótico, dando como resultado plantas con mayor desarrollo y mejor respuesta a las adversidades que pudiesen presentarse en el ciclo del cultivo. Los resultados observados en el cultivo a campo permitieron suponer que el uso de Th del IFSC en combinación con Captan sería una opción a tener en cuenta en un manejo integrado del cultivo de tomate platense variedad Luna (Conrath et al. 2006; Saba et al. 2012; Nosir 2016; Coppola et al. 2017, Bader et al. 2019)

6. CONCLUSIONES:

- En las pruebas *in vitro* se observó micoparasitismo de la cepa Th del IFSC, sobre los esclerocios de Sr.
- La tasa de crecimiento de Th cepa IFSC, fue superior a la de Sr lo que le favoreció la ocupación del espacio y control del mismo, poniéndose en evidencia la eficacia de la cepa IFSC para controlar *in vitro* a Sr.
- Hubo estimulación en la germinación de las semillas de tomate, teniendo la Cepa del IFSC un efecto de “*biopriming*”.
- La cepa IFSC de Th, produjo promoción del crecimiento en las plántulas de tomate platense variedad Luna, en condiciones controladas, en particular a nivel radicular.
- La promoción del crecimiento en las plántulas de tomate se dio en los tratamientos con Captan+Sr y Captan+Th+Sr. Esto produjo una plántula más vigorosa al momento del trasplante.
- La combinación de la cepa IFSC de Th con Captan, en condiciones de campo, mantuvo la sanidad de la planta en presencia de Sr, estableciéndose un equilibrio entre planta-antagonista-patógeno, permitiendo que la planta exprese todo su potencial productivo.
- El fungicida Captan y la cepa Th del IFSC, tienen efecto sinérgico incrementando la protección de la planta de tomate frente a Sr, al mismo tiempo produce un incremento significativo en el rendimiento de las plantas de tomate
- La cepa Th del IFSC sería compatible para el uso en un manejo integrado para el control de Sr en el cultivo del tomate platense variedad Luna.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abarza Silvia del V., Altamirano Fanny E., Zankar Graciela del C., Boccardo Roberto J., Britos J. 2017. Fertilización biológica con *Trichoderma* spp. y *Azospirillum* spp. en maíz Agrotecnia 25. REBIOS 2017. XI Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos-Corrientes (Argentina)
- Abu Irmaileh BE, Salem NM, Al Aboudi AMF, Abu Zarqa MH, Abdeen AO (2017) Antifungal Activity of the Stinkwort (*Inula graveolens*) Extracts. J Plant Pathol Microbiol 8: 417.
DOI: 10.4172/2157-7471.1000417 Disponible: 17/02/2021
- Agencia Europea de Medio Ambiente. 2019. El medio ambiente en Europa estado y perspectiva 2020. Resumen Ejecutivo 14pp. ISBN 978-92-9480-125-8
DOI:10.2800/833735.
<https://www.eea.europa.eu/es/publications/el-medio-ambiente-en-europa>.
Disponible: 18/10/2020
- Agrios, G. Plant Pathology. 5 th Edition. 2005. Ed. Academic Press. 952 pp
- Alonso Reyes R, Barranco R., Martínez B., Gracia Rivero G., Jiménez Montejó G. 2002. Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 66: 45–48
- Amerio N.S., Catrillo M., Bich G., Zapata P., Villalva L. 2020. *Trichoderma* en la Argentina: Estado del arte. Asociación Argentina de Ecología: Ecología Austral 30(11): 3-124.
- Andrade F.H. 2017. Los desafíos de la agricultura argentina. Compilado por Fernando H. Andrade. - 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Ediciones INTA, Archivo Digital ISBN 978-987-521-859-8. Disponible 20/7/2019
- Argerich C.A. 2011. La importancia del cultivo de tomate en Argentina. 2012. Taller: La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas. INTA-UNLP.
- Arias, M. 2004. Hongos Antagonistas o micopatógenos. Guía de insumos biológicos para el Manejo Integrado de Plagas. Corporación para Desarrollo de Insumos y Servicios Agroecológicos Armonía 59-62.

- Astiz Gassó M.M. 2017. Histopatología de Ustilaginales (carbones) en Poaceas de los géneros Sorghum, Bromus Y Glyceria. Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/59635/Tesis.pdf>. Disponible:15/3/2019
- Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perelló A. 2015. *Ustilago longissima* en *Glyceria multiflora*: biología y ciclo del patógeno en Argentina. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología 33 S 81. Suplemento ISSN-2007-8080
- Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perello A. 2017. Effects of loose kernel smut caused by *Sporisorium cruentum* on *Sorghum halepense*. Journal Plant Protection Research. 57(1): 64-74. ISSN1427-4345
- Astiz Gassó M.M., Pagliocca R., Varaschin M.C. 2009a. Comportamiento del formulado biológico BiagroTL® en el manejo integrado de *Ustilago bullata* (Ustilaginales) en *Bromus catharticus*. Actas VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina y II Congreso Internacional-REDBIO-Argentina. Resúmenes 151.
- Astiz Gassó M.M., Pagliocca R., Varaschin C. 2009b. Comportamiento del formulado biológico BiagroTL® en el manejo integrado del carbón hediondo (*Tilletia laevis*) en trigo. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: PV05.
- Aycock, R. 1966. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfii* o the status of Rolf's fungus after 70 years. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 174.
- Bader A.N., Salerno G.L., Covacevich F., Consolo V.F. 2019. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.), Journal of King Saud University – Science. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>. Disponible: 16/7/2019
- Bader A.N., Salerno G.L., Covacevich F., Consolo V.F. 2020. Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación sobre plantas de pimiento. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata Vol 119 (1): 1-9
- Baker KF, Cook RJ, 1974. Biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 35-50.

- Battaglia, D., Bossi, S., Cascone, P., Digilio, M.C., Prieto, J.D., Fanti, O. 2013. Tomato below ground-above ground interactions: *Trichoderma longibrachiatum* affects the performance of *Macrosiphum euphorbiae* and its natural antagonists. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:1249–1256.
- Bell, D.K., Wells H.D., Markham C.R. 1982. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* Species Against Six Fungal Plant Pathogens», *Phytopathology* 72:379-382.
- Bettiol W., Rivera M.C., Mondino P., Montealegre J.R., Colmenarez Y.C. (Eds.) 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe, 404 p. ISBN: 978-9974-0-1091-8.
- Bouhot, D. 1975. Cuantificación de la técnica de estimación del potencial infeccioso de los suelos, mantillos y sustratos infectados por *Pythium* sp. *Ann. Phytopathol.* 7(2): 147-150.
- Bruinsma, J. 1962. Chemical control of crop growth and development. *Plant J. Physiological Neih. J. agric. Sei.* Vol. 10 No. S Special Issue Research Centre, Wageningen, Netherlands
- Camargo-Cepeda, D.F.; Ávila, E.R. 2014. Efectos del *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y el desarrollo de la arveja (*Pisum sativum*). *Ciencia y Agricultura* 11(1): 91-100. ISSN 0122-8420
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguin, J.A., Herrera-Estrellas A.H. 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*. 158(1): 3-16. DOI: 10.1099/mic.0.052688-0. Disponible 11/10/2018
- Castillo, Constanza G., Pérez, Alejandro, Lovato Echeverria, Alfonso. 2017. Compatibilidad “in vitro” de aislados de *Trichoderma* spp con fungicidas usados normalmente en el control de patógenos de suelo *Agrotecnia* 25. REBIOS 2017. XI Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos- Corrientes (Argentina)
- Caiza Chimarro 2013. Colección, identificación y pruebas de eficacia in vitro de (*Trichoderma* sp). en el control biológico de (*Botrytis cinerea*) en la finca florícola Picasso Roses. Tesis doctoral. <https://download/pdf/84701107.pdf>_ Disponible: 20/8/2020.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene Ech42,

- in micoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 929–935.
<https://www.researchgate.net/publication/13240170ech42>. Disponible: 20/8/2020
- Cestoni, F; De Jovel, G. y Urquilla, A. 2006. Perfil de negocios de tomate cherry o cereza hacia el mercado de los Estados Unidos (en línea). El Salvador. 73 p.
http://www.academia.edu/7215115/perfil_de_negocios_del_tomate_cherry_o_cereza_hacia_el_mercado_de_los_estados_unidos. Disponible: 25/11/2018
- Chang Y.C., Chang Y.C., Baker R. 1986. Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70: 145-148
- Chen S.K., Edwards CA 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. *Soil Biol Biochem* 33:1981–1991.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00132-8). Disponible: 20/09/2019
- Chen S.K., Clive A. Edwards, Scott Subler 2001. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Applied Soil Ecology.* 18(1): 69-80.
[https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00135-4). Disponible: 20/10/2020
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F. 2006. Prime-A-Plant Group Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe interactions* 19: 1062-1071
- Cook R.J., Baker K.F. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN 539 pp
- Coppola M., Cascone P., Chiusano M., Chiara M.L., Colantuono, Lorito M., Pennacchio F., Rao F., Lois Woo S., Guerrieri E., Digilio M.C. 2017. *Trichoderma harzianum* enhances tomato indirect defense against aphids *Insect Science* 24:1025–1033.
 DOI 10.1111/1744-7917.12475. Disponible: 3/5/2018
- Correa, Sueli, Mello, M., Ávila, Zilá R., Minaré Braúna, L., Pádua, R. R. y Gomes, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* sacc. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba *Fitosanidad*, 11(1): 3-9
- D'Ambrogio Argüeso A. 1986. *Manual de Técnicas en Histología Vegetal.* Editorial hemisferio sur 83 pp.

- Dal Bello G. 1987. Hongos fitopatógenos en suelos de la región hortícola platense: estudios cualitativos y de patogenicidad. *Ciencias del Suelo* Vol. 5(2).
- Dal Bello G.M., Mónaco C.I., Sisterna M.N. 1994. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionado por *Bipolaris sorokiniana* bajo condiciones de invernáculo. *Fitopatología Brasileira* 19: 394-400.
- Danielson R., Davey C. 1973. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology & Biochemistry* 5(5): 495-504.
- Díaz, V. 2014. Perfil comercial tomate (en línea). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala. 11 p.
<http://web.maga.gob.gt/download/Perfiltomate.pdf>. Disponible: 21/02/ 2017.
- Elad Y., Chet I., Boyle P., Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* -scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathol.* 73: 85-88
- Escobar, H; Lee, R. 2009. Manual de producción de tomate bajo invernadero (en línea). v.2. 2 ed. Bogotá, Colombia. 180 p.
<https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13534?show=full>. Disponible: 22/02/2018
- Espinoza-Ahumada C.A., Gallegos-Morales G., Ochoa-Fuentes, Hernández-Castillo F.D., Méndez-Aguilar R., Rodríguez-Guerra R. 2019. Microbial antagonists for the biocontrol of wilting and its promoter effect on the performance of serrano chili. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas special publication* 23. Downloads/2020-Texto%20del Yisa María %20artículo-10139-1-10-20191021%20(1).pdf. Disponible: 13 /7/2020.
- Esquinas-Alcázar, J., Nuez V.F. 1995. Anatomía y fisiología de la planta. En: El cultivo del tomate. F. Nuez ed. Mundi-Prensa. 793 p.
- Ezziyyani M., Pérez Sánchez C., Sid Ahmed A., Requena M.E., Candela M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) Universidad de Murcia. *Anales de Biología* 26: 35-45.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2013.

<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en>

Disponible: 2/2/2021

FAO. 2019. Glosario de términos fitosanitarios. Norma internacional para medidas fitosanitarias n.º 5. Roma. Publicado por la FAO en nombre de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). 35 págs. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

<http://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms>.

Disponible: 17/02/2021

FAOSTAT 2020. <http://fenix.fao.org/faostat/internal/es/#data/QC>.

Disponible: 10/7/2020

Fernández Larrea, Vega O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62: 96-100.

Fischbein D. 2012 “Manejo Integrado de Plagas Forestales” 2012. Serie técnica: Cambio Rural Laboratorio de Ecología de Insectos INTA EEA Bariloche Villacide, J.M. y J.C. Corley (eds.) Cuadernillo 15. ISSN 1851-4103

Flores C. 2012. Enfermedades de tomate: guía de consulta / Flores C., Buono S., Giorgini S. 1a ed. – Yuto: Ediciones INTA

Friedl, M.A., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. 2008. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. Appl Environ Microbiol 74: 245–250.

Gasoni L., Cozzi J., Kobayashi K., Yossen V., Zumelzú G., Babbitt S., Kahn N. 2001. Yield response of lettuce and potato to bacterial and fungal inoculants under field conditions in Córdoba (Argentina). Journal of Plant Disease and Protection 108: 530-535.

Gasoni L., Kobayashi K., Vicario A., Stegman de Gurfinkel B., Cozzi J. 2004. Biocontrol agents and mechanisms involved. Proceedings International Seminar on Biological Control of Soilborne Plant Diseases, Japan-Argentina Joint Study. 53-69.

Goites E. 2008. Manual de cultivos para la huerta orgánica familiar. 1ed. Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA 2008.

- Haifa Chemicals. 2014. Recomendaciones nutricionales para tomate en campo abierto, acolchado o túnel e invernadero (en invernadero) (en línea). Miami, Estados Unidos de América. 39p Tomate_2014. pdf.
<http://www.haifagroup.com/spanish/files/Languages/Spanish>. Disponible: 10/12/2018
- Guédez C., Cañizalez L., Castillo C., Olivar R. 2012. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 32(1): 44-49.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562012000100009&lng=es.
 Disponible: 19/8/2020.
- Hajek A.E. 2004. Natural Enemies. An introduction to biological control Cambridge University Press, New York. ISBN 0- 52165295
- Harman G. 2005. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194
<http://www.Biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html>.
 Disponible: 5/6/2018
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I.Y., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.
- Harman G.E., Chet I., Baker R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. Phytopathol. 71: 569- 572.
- Hernández-Jiménez, J., Montes-Belmont, R., Flores-Moctezuma, H.E., Nava-Juárez, R.A., Chanona-Pérez, J. 2004. Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 345-350
- Hernández-Melchor, D.J.; Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia 35(1): 98-112.

- Heydari A., Passarakli M. 2010. A Review Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 273-290. ISSN 1727-3048
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky M., Chet I., Orduz S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(3): 451-458. Downloads/11477-28193-1-PB.pdf. Disponible: 18/8/2020.
- Howell C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases* 87(1): 4-10
- Iglesias N. 2006. Producción de hortalizas bajo cubierta: Estructuras y manejo de cultivo para la Patagonia Norte. *Boletín de Divulgación Técnica* 49. INTA Alto Valle.
- Infante, D., Martinez, B., Gonzalez, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24(1): 14-21. ISSN 2224-4697.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002.
 Disponible: 10/9/2019
- Ingham, E., Coleman, D. 1984. Effects of streptomycin, cycloheximide, fungizone, captan, carbofuran, cygon, and PCNB on soil microorganisms. *Microbial Ecology*, 1984 - Springer
- Infoagro Systems S.L. 2016. El cultivo de tomate: Parte I. (en línea). Madrid, España. s.p.
http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate_parte_i.asp.
 Disponible: 17/8/2018
- IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). 1996. Descriptores para tomate (*Lycopersicon* spp L.). https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/73043/Descriptores_tomate_489.pdf?sequence=1&isAllowed=y Disponible: 3/7/2018
- IPNI 2019. The International Plant Name Index.
<http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=316947-2>. Disponible: 20/1/2019

- Jaber L. Y., Ownley B. 2017. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control in insect pest and plant pathogens? Elsevier Inc
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>1049-9644/.Disponible 1/9/2018
- Jenkins S.F., Averre C.W. 1986. Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. *Plant Disease* 7(7): 614-619.
- Joshi B.B., Bhatt R.P., Bahukhandi D. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmental Biology* 31: 921-938.
- Khaledi N., Parissa T. 2016. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*. DOI: 10.1515/jppr-2016-0004
- Kumar S. 2013. *Trichoderma*: a biological control weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine* 1(3): 106–121.
- Kumar V., Shahid M., Singh A., Srivastava M., Mishra A. 2014. Effect of Biopriming with Biocontrol Agents *Trichoderma harzianum* (Th.Azad) and *Trichoderma viride* on Chickpea Genotype (Radhey). *J Plant Pathol Microb* 5:247.
 DOI:10.4172/2157-7471.1000247.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of-Biopriming-with-Biocontrol-Agents-and-on-Kumar-Shahid/39b5545def8028dc99402350d55b7e7988ba8bf0>.
 Disponible: 18/3/2018
- López Marín.L. 2017. Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) / *Solanum lycopersicum* 2. cultivo. I. – San José, C.R. INTA, 2017. 121 p. ISBN 978-9968-586-27-6 1.
- Lorito M., Woo, S.L., Harman, G.E., Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from ‘Omics to the Field’. *Annual Review of Phytopathology* 48: 395–417.
- Malmierca M.G., Cardoza R.E., Alexander N.J., McCormick S.P., Hermosa R., Monte E., Gutiérrez S. 2012. Involvement of *Trichoderma trichothecenes* in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78(14): 4856–4868.

- March G, 2014. Agricultura y plaguicidas: un análisis global. 2014. - 1a ed. - Rio Cuarto: FADA - Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina.
- Martinengo de Mitidieri I.Z. 1986. Control biológico de hongos del suelo con *Trichoderma*. Control biológico de enfermedades de plantas en Argentina 67 spp. Resúmenes VI Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes.
- Martinengo de Mitidieri I.Z. 1988. Control biológico de hongos patógenos del suelo. 2º Jornadas sobre control integrado de plagas agrícolas. Comisión Técnica para el Control Integrado de Plagas agrícolas. Libro de Resúmenes 11-26
- Martinengo de Mitidieri I.Z. 1989. Control biológico de hongos patógenos del suelo. <https://www.passeidireto.com/arquivo/5896882/livro-control-biologico-de-enfermedades-de-plantas-en-america-latina-y-el-caribe/27>. Disponible: 24/5/2017
- Martínez B., Infante D., Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. 28(1): 1-11. ISSN 1010-2752
- Mc Beath J., Adelman M. 1991. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. Phytopathology 81(10): 1151.
- Mc Lean K.L., Hunt J., Stewart A. 2001. Compatibility of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* c52 with selected fungicides. New Zealand Plant Protection 54: 84-88
- Menéndez, A.B. 1996. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre el patógeno vegetal de suelo *Sclerotinia sclerotiorum*: Pruebas preliminares sobre el biocontrol de esta enfermedad Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas de la Universidad de Bs. As. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n2823_Menendez.pdf. Disponible: 18/8/2020
- Menéndez A.B., Godeas A. 1998. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC742). Mycopathologia 142: 153-60.
- Ministerio de Agroindustria. 2016. Informe: Perfil del Tomate. http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/index.php. Disponible: 20/05/2018

- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenas Prácticas Agrícolas. 2020
<https://www.argentina.gob.ar/agricultura/buenas-practicas-agricolas-bpa>
 Disponible: 8/02/2021
- Mitidieri, M.; Polack, L. 2012. Boletín de divulgación técnica / EEA San Pedro; no. 22 (mayo 2012). Ediciones INTA Serie: Colección de educación superior. ISSN 0327-3234. ISBN 978-987-679-120-5
https://inta.gob.ar/sites/default/files/scripttmpintasp_guia_de_monitoreo_2012bdt22.pdf.
 Disponible: 20/01/2021
- Mónaco C., Pasquaré A.O., Alippi H.E., Perello A., 1991. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent of *Fusarium* spp. and *Sclerotium rolfii* by seed treatment. Advances in horticultural science [rivista dell'ortoflorofutticoltura italiana]. 5 (N.3), 1991
- Mónaco C., Moreno V., Stenglein S.A., Martínez Alcántara V., Saparrat M., Bonfiglio C., Balatti P.A. 2006. *Trichoderma virens*. Caracterización molecular con ISSR y RAPD y control de patógenos causantes de damping-off en especies hortícolas. Jornada de Enfermedades en Cultivos Bajo Cubierta. Resúmenes 78-79.
- Mónaco C., Pérelló A., Rollán M.C. 1994. Ensayos in vitro del comportamiento antagónico de *Trichoderma* spp. frente a especies patógenas de la zona hortícola de La Plata, Argentina. Microbiología SEM 10: 423-428.
- Montealegre, J. R.; Herrera, R.; Silva, P.; Besoain, X.; Pérez, L. M. 2009. Biocontrol capacity of wild and mutant *Trichoderma harzianum* (Rifai) strains on *Rhizoctonia solani* 618: effect of temperature and soil type during storage Electronic Journal of Biotechnology 12(4):1 DOI: 10.2225/vol12-issue4-fulltext-12
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol12/issue4/full/12/>. Disponible: 13/7/2020
- Montealegre, J.R., Herrera, R., Velásquez, J.C., Silva, P., Besoain, X., Pérez, L.M. 2005. Biocontrol of root and crown rot in tomatoes under greenhouse conditions using *Trichoderma harzianum* and *Paenibacillus lentimorbus*. Additional effect of solarization. Electronic Journal of Biotechnology 8(3): 249-257
 DOI: 10.2225/vol8-issue3-fulltext-7 ISSN: 0717-3458.
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue3/full/7>. Disponible: 12/7/2020

- Narayanasamy P. 2013. Biological management of diseases of crops. Volume 2. Integration of biological control strategies with crop disease management systems. Springer. 364 pp
- Nosir W.S. 2016. *Trichoderma harzianum* as a Growth Promoter and Bio Control Agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. tuberosi. Adv Crop Sci Tech 4: 217-224 DOI:10.4172/2329-8863.1000217
- Nowara A. M, Radwan M. A. 2017. Impact of pesticides on *Trichoderma harzianum* and on its possible antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* under In vitro conditions. Asian J Agri & Biol. 2017;5(4):291-302.
- Obregon V. 2018. Guía para la identificación de las enfermedades de tomate bajo invernadero; editado por Tatiana Lattar. 2a Ed. Bella Vista, Corrientes: Ediciones INTA. Archivo digital ISBN 978-987-521-960-1
- OCDE-FAO. 2019. Perspectivas Agrícolas 2019-2028, OECD Publishing, París/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma <https://doi.org/10.1787/7b2e8ba3-es>. Disponible: 19/10/2020
- Olivera Costa, V., Rodríguez, D. 2014. Evaluación del crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de *Eucalyptus grandis* con aplicación de bio estimulantes, *Trichoderma harzianum* (Trichosoil®) y quitosano (Biorend®), en plantación. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 205p. <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/trichoderma-harzianum-como-agente-t32904.htm>. Disponible: 10/09/2020
- Ortiz Molinuevo P., Wrigt E.R., Filippini de Delfino O., Grijalba P.E., Lopez M.V. 1995. Desarrollo de microorganismos antagonistas en presencia de distintas concentraciones de fungicidas. Revista Facultad de Agronomía 15: 37-42
- Ownley, B., Gwinn K.D., Vega F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. Biocontrol 55: 113-128
- Páez O. Uso agrícola de *Trichoderma*. 2006. <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>. Disponible: 10/01/2019.
- Pakdaman B.S., Goltapeh E.M., Soltani B.B., Talebi A.A., Nadepoor M., Kruszezwska J.S., Piłsyk S, Sarrocco S., Vannacci G. 2013. Toward the quantification of

- confrontation (dual culture) test: A case study on the biological control of *Pythium aphanidermatum* with *Trichoderma asperelloides*. J. Biofertilizers and Biopesticides 4: 137-141
- Pal K.K., McSpadden Gardener B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
https://www.researchgate.net/publication/275374891_Biological_Control_of_Plant_Pathogens. Disponible: 25/10/2018
- Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23:23-54.
- Papavizas G.C., Lewis J.A., Abd-Elmyty T.H. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology 72:126-132.
- Paretti A. 1994. Manual para el Análisis de Semillas. Ed. INTA-UNMdelp. Pag. 86
- Pérez, A. A., Pérez, M. A., Martínez Coca, B., Rollhaiser, I. N. and Blengini, M. C. 2020. Selection of *Trichoderma* spp. isolates *in vitro* as potential biofungicides for the control of *Rhizoctonia solani* Kühn on potato. Agriscientia 37 (2): 21-33
- Peláez-Álvarez A., de los Santos-Villalobos S.; A. Yépez E., Parra-Cota, F.I., Reyes-Rodríguez R.T. 2016. Efecto sinérgico de *Trichoderma asperellum* T8A y captan 50® contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7(6):1401-1412.
<https://www.redalyc.org/pdf/2631/263148193014.pdf>. Disponible: 10/09/2020
- Perniola O.S., Chozempa S.E., Staltari S., Astiz Gasso M.M., Molina M.C. 2015. Integración de dos métodos de biocontrol *in vitro* de *Fusarium graminearum*. Revista Mexicana de Fitopatología. 33: 128. Suplemento ISSN-2007-8080.
- Perniola O., Staltari S., Chorzempa S.E., Astiz Gassó M.M., Molina M.C. 2014. Control biológico de *Fusarium graminearum*: utilización de *Trichoderma* spp. y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. 46(2): 45-56: ISSN 0370-4661; 1853-8665.
- Perniola, O.S., Chorzempa S.E., Staltari, S., Astiz Gassó M.M., Galián L.R., Molina M. C. 2016. Biofumigation with *Brassica juncea* and *Sinapis alba*. *in vitro* action to

- the of *Trichoderma* spp. and *Azospirillum brasilense*. Revista de Protección Vegetal de Cuba. 31(1): 57-62.
- Punja Z.K., G., Grogan R.G. 1981. Mycelial growth and infection without a food base by eruptive germinating sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 71(10): 1099-1103.
- Quaizel G. 2019. La producción argentina de tomate no cubre la demanda de la industria. Frutihortícola.
<https://www.noticiasagropecuarias.com/2019/06/25/la-produccion-argentina-de-tomate-no-cubre-la-demanda-de-la-industria>. Disponible: 11/7/2020.
- Ramírez C., Nienhuis J. 2012. Evaluación del crecimiento y productividad del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo cultivo protegido en tres localidades de Costa Rica. Tecnología en Marcha. 25(1): 3-15
- Reino J.L., Guerreiro R.F., Hernández-Galá R., Collado I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews 7(1): 89–123.
- Reyes Y., Martínez, B. 2015. Efecto de algunos plaguicidas sobre el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg. Rev. Protección Veg. 30(1): 78-78. ISSN 1010-2752.
- Rifai M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. 116: 1-56.
- Rodríguez I., Arcia A. 1993. Efecto de doce aislamientos de *Trichoderma* spp., sobre el número, tiempo de formación y porcentaje de parasitismo de esclerocios de *Sclerotium rolfsii*, en cuatro temperaturas diferentes. Fitopatol Venezol. 6(2): 54.
- Rodríguez L.C. y Niemeyer H.M. 2005. Integrated Pest Management, semiochemicals and microbiol pest-control agent in Latin American Agriculture. Crop Protection 24: 615-623.
- Rodríguez I.C., Flores J. 2018. Capacidad antagónica in vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. Bioagro 30(1):1-10.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100005.
 Disponible 20/8/2020

- Rollán M, Nico A. I., Monaco C. 1999. Efecto de la temperatura sobre la interacción in vitro entre especies de "*Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfii*". Investigación agraria. Producción y protección vegetales, ISSN 0213-5000, Vol. 14, N° 1-2, 1999, págs. 33-48
- Romero-Arenas O., Huerta Lara M., Damián Huato M.A., Domínguez Hernández F., Arellano Victoria A.D. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. Revista Colombiana de Biotecnología
<https://www.researchgate.net/publication/41019651>. Disponible: 23/8/2020
- Rivera M.C., Wright E.R. 2014. Capítulo 1. Control biológico de enfermedades de plantas en Argentina. Libro de Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe Editores Wagner, B., Rivera, MC., Mondino, P., Montealegre A., J. R., Colmenárez, Y.C., Universidad de Uruguay. ISBN: 978-9974-0-1091-8.
<https://www.researchgate.net/publication/272086422>. Disponible: 20/8/2020
- Saba H., Vibhash D., Manisha M., Prashant K.S, Farhan H., Tauseef A. 2012. *Trichoderma* - a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. Mycosphere 3: 524-531.
- Samaniego-Fernández L. M., Harouna M., Corbea O., Rondón-Castillo A. J. Placeres-Espinosa I. 2018. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. Revista de Protección Vegetal, 33(3): 1-10. E-ISSN: 2224-4697
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n3/22244697-rpv-33-03-e02.pdf>. Disponible: 21/8/2020
- Samaniego Gaxiola, J.A. 2008. Germinación y sobrevivencia de esclerocios de (*Phymatotrichopsis omnivora*) en respuesta a NAOCL y suelo con glucosa. Agricultura Técnica en México 34(4):375-385.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172008000400001. Disponible: 21/8/20

- Sánchez A. D., Barrera V., Reybet G. E., Sosa M.C. 2015. Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. Rev. Fac. Agron. 114(1): 61-70.
- Sarandón S.J., Flores C.C. 2014. Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables. 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata. E-Book: ISBN 978-950-34-1107-0
- Saxena A., Raghuwanshi R., Singh H. 2014. *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. Journal of Basic Microbiology. Volume55, Issue2. February 2015 Pages 195-206
<https://doi.org/10.1002/jobm.201400317>. Disponible: 29/09/2020
- Schuster A. and Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010 Jul;87(3): 787-99.doi: 10.1007/s00253-010-2632-1.
- Semillaria 2015. Clasificación taxonómica de tomate (*Solanum lycopersicum*). s.p. E book ISBN 978-987-45427-1-7.
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>. Disponible: 1/02/2020
- Sharon E., Chet I., Spiegel Y. 2011. *Trichoderma* as a Biological Control Agent (Chapter 8). In: Davies K, Spiegel Y. (eds.). Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms, © Springer Science
- Sherwood, R.T., Hagedorn D.J. 1958. Determining common root rot potential of pea fields. University of Wisconsin-Madison Agricultural Experimental Station Bulletin 531.
- Shores M., Harman G., Mastouri F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. Annu. Rev. Phytopathol. 48: 21-43
- Silva M.A.F., Moura, K.E., Salomão D., Patricio F.R.A. Silva, M.A.F, Mora, K.E. 2018. Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. Summa Phytopathologica, 44(2): 37-142.
- SINAVIMO-Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas. 2021.
<https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/athelia-rolfsii>. Disponible: 20/02/2021

- Smith, A.F. 1994. The tomato in America: Early history, culture and cooking. Columbia SC.
- Steel, R., Torrie, J. 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. New York: McGraw-Hill Kogakusha.
- Stocco M, Lampugnani G., Zuluaga S., Abramoff C., Cordo C., Mónaco C. 2019. Fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* su supervivencia en el suelo. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 118(2):1-5.
<https://revistas.unlp.edu.ar/revagro/article/view/9514/8435>. Disponible: 31/8/2020.
- Stocco, M. (2014) Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. Tesis de Doctorado.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/42904>. Disponible: 22/01/2021
- Toribio, J.A., Rodríguez-kábana, R. 1992. The effects of inoculum density and physical factors on the assessment of disease caused by *Sclerotium rolfsii*. *Plant Soil* 142: 107–112. doi.org/10.1007/BF00010180. Disponible: 20/8/2020
- Tort N., Turkyilmaz, B. 2003. Physiological Effects of Captan Fungicide on Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6: 2026-2029. DOI: 10.3923/pjbs.2003.2026.2029. https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.2026.2029.
 Disponible: 01/06/2021
- Varaschin C.M., Astiz Gassó M.M., Prosperi A. 2000a. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium* spp. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Libro de Resúmenes C35
- Varaschin M.C, Durman S., Geloso V. 2011. Efecto de BIAGRO TL sobre plantines de Tomate. III Jornada de enfermedades y plagas en cultivos bajo cubierta. Facultad de Cs. Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Libro de Resúmenes 109.
- Varaschin M.C., Astiz Gassó M.M., Prosperi A. 2000b. Selección *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. para el control de patógenos del Damping off. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Libro de Resúmenes C36.

- Varaschin M.C., Prosperi A., Astiz Gassó M.M. 2000c. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* with strains of *Trichoderma* spp. under greenhouse conditions. Proceedings 5th International PGPR Workshop. p138.
- Wells H., Bell D., Jaworski C. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 62:442-447.
- Wokocha R.C. 1990. Integrated control of *Sclerotium rolfsii* infection of tomato in the Nigerian Savanna: effect of *Trichoderma viride* and some fungicides. Crop Prot. 9: 231 -23.
- Wright E.R, Pizzingrilli P.A., López M.V., Cabral D., Rivera M.C. 2000. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in rose in Argentina. Proceedings 5th International Workshop on PGPR. P. 144.
- Wright E.R., R. Zapata, Delfino O., Lopez M. 1988. Eficiencia "in vitro" de antagonistas de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*. Rev. Facultad de Agronomía 9: 109-116
- Wright E.R., Rivera M.C., Möhle R., López M.V., Moya M., di Rienzo L., Quevedo R. y Gasoni L. 2004. Growth promotion in a commercial organic production in Buenos Aires. En: Monzón de Asconegui M.A, García de Salomone I.E, Miyasaki SS (eds.). Biología del Suelo. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. Pp. 219-225.
- Xu Z., Harrington T.C., Gleason M.L., Batzer J.C. 2010. Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. Mycologia 102(2): 337-346. DOI 10.3852/08-189. Disponible: 24/8/2020
- Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1061-1070

8. ANEXO

8.1 Soluciones Utilizadas

8.1.1 Fijador FAA

Formol.....10
ml

Ácido acético glacial.....5
ml

Alcohol etílico 96 %..... 50 ml

Agua destilada.....35 ml

8.1.2 Tinción de Safranina / Verde rápido

1. Etanol al 50 %. 5 min.

2. Tinción con safranina (1 %, pH 2.5). 3 - 5 min.

Safranina (C. I. 75100): 1 g

Etanol 95 %: 15.5ml

H₂O destilada: 14.5 ml

Antes de utilizar, mezclar esta solución (solución madre) y etanol al 50% (1:1).

3. H₂O destilada. 4 x 20 s.

4. Etanol 96%. 1min.

5. Tinción en verde rápido (1%). 60s.

Este colorante "compite" con la safranina y por tanto a más tiempo menos color rojo de la safranina quedará en la sección.

Etanol absoluto (100 %): 50 ml.

Esencia de clavo: 50 ml.

Verde rápido (C. I. 42053): 1 g.

6. Etanol absoluto. 1min.

7. Xileno. 1 min.

8. Se montan los cubreobjetos con DePex.

8.1.3 Azul de lactofenol (azul de algodón):

Las porciones para preparar 80 ml de solución de azul de lactofenol son:

Cristales de fenol.....20 g

Ácido láctico.....20 ml

Glicerina o glicerol.....40 ml

Agua destilada.....20 ml

Preparación: disolver el fenol en ácido láctico, después agregar agua y glicerol, calentar ligeramente y, por último, adicionar el azul de algodón. Uso: para exámenes directos de las cepas.

8.2 Resultados del BLAST de las secuencias de la *Trichoderma* cepa del IFSC.

Para la secuencia inversa se obtiene un 99% de homología con la cepa *Trichoderma harzianum*. En el caso de la de la secuencia forward se obtiene un 99% de homología con *Hipocrea lixii* teleomorfo de *T. harzianum*.

Laboratorio de Virología y Técnicas Moleculares

Coordinación de Plagas y Enfermedades de las Plantas- Dirección de Laboratorio Vegetal

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA

Av. Ingeniero Huergo 1001- C1107AOK CABA

File: Th1 ITS1.ab1 Run Ended: 2017/11/14 22:44:55 Signal G:762 A:1676 C:2340 T:1630
Sample: Th1 ITS1 Lane: 15 Base spacing: 16.253609 623 bases in 22143 scans Page 1 of 2

File: Th1_JTS1.ab1 Run Ended: 2017/11/14 22:44:55 Signal G:762 A:1676 C:2340 T:1630
Sample: Th1_JTS1 Lane: 15 Base spacing: 16.253609 623 bases in 22143 scans Page 2 of 2

620
GGGGT