

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales



INFORME DE TRABAJO FINAL DE CARRERA

Efecto de *Trichoderma harzianum* luego de una biofumigación para el biocontrol de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate.

Alumna: Peñalba, Julieta Noel

Legajo: 27816/0

DNI: 39097104

Correo electrónico: julietapenalba.n@gmail.com

Teléfono: (0221) 6429700

Directora: Dra. Stocco, Marina.

Co-Directora: MsC Roller, Jorgelina.

La Plata, 4 de Marzo de 2022

*A mi familia por acompañarme y alentarme durante esta etapa.
A mis amigxs y a Juan por su apoyo y cariño incondicional.
A Mari y Jor por su paciencia y su dedicación.*

MODALIDAD

La modalidad elegida para llevar adelante el trabajo final de carrera es “Una investigación en cualquiera de los campos de las Ciencias Agrarias y Forestales”.

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), especie hortícola de importancia Nacional y mundial, ha sido gravemente afectada por diferentes enfermedades, destacándose el marchitamiento y cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Ésta puede encontrarse en semillas, rastrojos o malezas, ingresando por aberturas naturales o heridas. Su manejo consiste en el control cultural o químico, siendo éste último cuestionado por sus efectos negativos en la salud y el ambiente.. El Manejo Integrado de Enfermedades (MIE) implica el uso de todas las herramientas disponibles para reducir la incidencia de enfermedades a un nivel tolerable considerando la sustentabilidad ecológica. Una herramienta es el biocontrol que consiste en la reducción del patógeno, utilizando organismos antagonistas como especies de *Trichoderma*. Otra herramienta es la biofumigación que libera al suelo compuestos volátiles provenientes de residuos vegetales que inhiben fitopatógenos. El objetivo del estudio fue “Evaluar el potencial de la biofumigación y el uso de *Trichoderma harzianum* para el control del marchitamiento y cancro bacteriano del tomate causado por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en un cultivo comercial de tomate”. Se realizaron ensayos *in vitro* donde se evaluó el crecimiento del patógeno y del antagonista, solos, combinado con una crucífera. Luego se evaluó la severidad de la enfermedad y el número y peso de frutos por planta de tomate en invernáculo, donde los tratamientos fueron: plantas de tomates inoculadas con Cmm en presencia o no de dos cepas de *T. harzianum* *solas* y en combinación con biofumigación. En los resultados *in vitro* se evidenció el efecto sinérgico entre antagonista y biofumigación reduciendo significativamente el crecimiento de Cmm, concordando con lo evaluado a campo, pero sin aumento significativo del rendimiento. Finalmente, se puede afirmar que la combinación de *T.*

harzianum con biofumigación podría ser una alternativa incluida a un plan de MIE en el cultivo de tomate bajo cubierta.

INTRODUCCIÓN

Importancia del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las especies hortícolas más importantes y populares del mundo, alcanzando la producción mundial 180.766.329 toneladas y abarcando un área de 5.030.545 de hectáreas (FAOSTAT 2019). Es un cultivo anual perteneciente a la familia Solanaceae (Jenkins, 1948, Peralta et al., 2008), originaria de América, región que abarca parte de Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú (Peralta et al., 2008, Blanca et al., 2012). La fruta madura se consume fresca y se utiliza en la fabricación de una amplia gama de productos procesados. Es una fuente importante de licopeno, un fitoquímico que protege a las células del daño oxidativo que se ha relacionado con el cáncer (Giovannucci et al., 1995).

El tomate es una de las hortalizas más importantes en Argentina, siendo su consumo de 16 kg/habitante/año. La producción en el país, tanto en fresco como para industria, se ubica aproximadamente en 1,2 millones de toneladas y 17.000 hectáreas. En cuanto al producto en fresco, se destacan tres zonas de producción: NOA, NEA y Buenos Aires, siendo el aporte del Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires de suma importancia debido a que su producción tiene como principal destino el Mercado Central de Buenos Aires (principal destino de la producción hortícola a nivel país) y otros mercados nacionales distantes (SAGyP, 2020). De las 2000 hectáreas que componen esta gran zona productiva, el 70% de esta superficie y las plantaciones de tomate están ubicadas en el Partido de La Plata y alrededores, formando el Cinturón Hortícola Platense (Argerich & Troilo, 2011). Sin embargo, el potencial productivo de los cultivares de tomate en la región se ve afectado constantemente por problemas de carácter fitosanitario (Polack & Mitidieri 2005).

Marchitamiento y Cancro bacteriano

El marchitamiento y cancro bacteriano, producido por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (Smith 1910; Davis et al., 1984) es la enfermedad de mayor importancia de origen bacteriano en el cultivo de tomate, afectando gravemente las plantas producidas en invernadero. Se encuentra presente en casi todas las zonas productoras de tomate del mundo, (EPPO, 2020). Su importancia radica en las grandes pérdidas de rendimiento que ocasiona, pudiendo producir la pérdida total de las plantas afectadas y en la dificultad en el manejo (Hausbeck et al., 2000).

El género *Clavibacter* pertenece al Phylum Actinobacteria, Orden Actinomycetales, Familia Microbacteriaceae. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es un bacilo Gram positivo, sin flagelos, aeróbico y productor de cápsula, pero no de esporas. En condiciones *in vitro* puede ser cultivado en caldo nutritivo con extracto de levadura agarizado (NBY, Nutrient Broth Yeast) o en extracto de levadura con dextrosa y CaCO₃ (YDC, Yeast Dextrose Carbonate) (Schaad et al., 2001), donde en 48 – 72 h forma colonias de 2-3 mm de diámetro, convexas, lisas, con borde entero, de color amarillo pálido a naranja, opaco y mucoides.

En muchas ocasiones, el inicio de esta enfermedad o infección primaria se produce a partir de semillas infectadas (Tancos et al., 2013), constituyendo la fuente de inóculo primario más importante (Chang et al., 1991; de León et al., 2011; CABI 2021). Si bien la introducción del patógeno a un lote sano ocurre a través de las semillas, una vez instalado puede sobrevivir en rastrojos y en este caso, ser éstos la fuente de inóculo primario más importante. El ingreso a las plantas puede ocurrir a través de aberturas naturales como estomas, hidátodos o flores; heridas superficiales, como tricomas rotos; o bien por heridas que llegan al tejido vascular, como las que se producen en el momento de las labores culturales (Gleason et al., 1993; Sillón 1997; Carlton et al., 1998; EPPO 2013). Cuando esto ocurre se favorece la dispersión al resto de las plantas en la hilera del cultivo (Kawaguchi et al., 2010). La bacteria también puede sobrevivir en malezas, bandejas de siembra, herramientas y tutores de madera que se reciclan para la campaña siguiente (Blancard 1996; Jones et al., 2001). La diseminación dentro del cultivo puede ocurrir

por contacto directo entre plantas o a través de las herramientas de trabajo y las manos de los operarios durante las prácticas culturales como el desbrote, deshoje o tutorado.

La enfermedad puede presentarse desarrollando gran variedad de síntomas (Figura 1), que varían según las vías de ingreso a la planta. Pueden ser locales o sistémicos, siendo estos últimos los más graves, ya que llevan al marchitamiento y muerte de la planta. (Gleason et al., 1993; Carlton et al., 1998; EPPO 2013).



Figura 1. Cultivo de tomate afectado por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. A: Síntomas en hojas inferiores de la planta . B: Planta afectada.

La incubación puede desarrollarse entre los 7 a 21 días. Y la expresión de los síntomas está relacionada con las condiciones ambientales, densidad del inóculo, edad y estado nutricional de la planta (Walker & Kendrick 1948; Strider 1970; Gitaitis et al., 1991; Chang et al., 1991; Sharabani et al., 2013).

En cuanto al manejo de la enfermedad, se recomienda no efectuar plantaciones en campos infectados, desinfectar herramientas con una solución de hipoclorito de sodio sal 10%, utilizar semilla de calidad garantizada y desinfectada, no efectuar labores de desbrote en condiciones de alta humedad y erradicar del lote plantas con síntomas. En cuanto al control químico, se puede efectuar aplicaciones de oxiclورو de cobre más mancozeb de forma preventiva o frente a síntomas en el lote (Flores et al., 2012). Vale mencionar, que si bien el uso de compuestos cúpricos

y antibióticos han mostrado efecto sobre el patógeno (Milijasevic et al., 2015), también han sido cuestionados por los efectos tóxicos y su potencial acumulación en los suelos y organismos vivos. De todas formas, las alternativas químicas no son del todo eficientes para el control de la enfermedad (Balestra et al., 2009) y, además, por tratarse de una enfermedad vascular, una vez que las plantas se infectan, el control químico es prácticamente imposible.

Como consecuencia de lo anterior, el manejo debería basarse en prácticas preventivas. Este se basa en reducir el inóculo inicial mediante el uso de semillas y/o plantines libres del patógeno, junto con la rotación de cultivo, (Chang et al., 1991; de León et al., 2011). Una vez establecido el cultivo, se debería evitar la dispersión del inóculo secundario mediante la desinfección de las herramientas de desbrote, debido a que todas las prácticas que impliquen heridas incrementan la propagación del patógeno. Kawaguchi et al., (2014), han obtenido buenos resultados desinfectando las herramientas con hipoclorito de sodio o calcio, mientras que Rista et al., (2005) no han logrado comprobar totalmente la efectividad de este producto para evitar la dispersión del patógeno.

La agricultura actual moderna, basada en la masiva aplicación de agroquímicos y el uso de cultivares e híbridos de alto potencial de rendimiento, ha originado una serie de problemas de tal magnitud, que están poniendo en duda la posibilidad de alimentar a las futuras generaciones. La intensificación en el uso de insumos químicos en la agricultura, junto con el uso inapropiado de ciertas tecnologías, provocaron impactos que perjudicaron, tanto a los recursos propios de los sistemas agrícolas, atentando contra su capacidad productiva, como a los recursos globales o de otros sistemas y a las personas que forman parte de ellos (Sarandón & Flores, 2014). Adicionalmente, cada día existe mayor presión social para la búsqueda de alternativas de control más amigables con el ambiente y que no tengan efectos negativos sobre la salud humana (Liu & Schelar, 2012).

En general, las enfermedades en las plantas se han controlado y se controlan con altas dosis y frecuencias de aplicación de agroquímicos sintéticos, eliminando una gran cantidad de microorganismos, la mayoría de ellos saprófitos. Esta

eliminación provoca un “vacío” y un riesgo de reinvasión por parte de los patógenos ante la pérdida del efecto amortiguador que opone la flora saprobia. La reducción de la biodiversidad como consecuencia del modelo predominante de agricultura es particularmente evidente en el campo del manejo de enfermedades (Mónaco, 2014).

Durante mucho tiempo ha prevalecido el concepto de "Control de Enfermedades", que involucra la aplicación de medidas tendientes a erradicar al organismo causal siendo, por lo tanto, sólo aplicable a un número limitado de situaciones. En los últimos años, este concepto ha sido reemplazado por el de "Manejo de Enfermedades", que implica un proceso continuo de eventos consistentes en la selección y uso de técnicas orientadas a reducir las enfermedades a un nivel tolerable (Apple, 1977). En el manejo integrado de enfermedades, además de aplicar todas las medidas disponibles, se toma en consideración la “sustentabilidad ecológica”. Estas técnicas o estrategias tienen por objeto disminuir la incidencia de las enfermedades en los agroecosistemas minimizando o eliminando los daños en el ambiente. Las técnicas más utilizadas para el manejo integrado de las enfermedades son, entre otras, el control biológico, el manejo cultural, el uso de cultivos de cobertura, la solarización y el uso de agroquímicos de banda verde en algunos casos puntuales.

El control biológico o biocontrol, según la definición de Cook & Baker (1983), es la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno ya sea en estado activo o latente, como resultado de la acción de uno o más organismos denominados antagonistas. Tal es así, que este tipo de manejo, al utilizar agentes biológicos no genera los efectos negativos en el ambiente que presenta el control químico. En este sentido, los productos químicos presentan pérdida de efectividad porque los fitopatógenos generan resistencia a los mismos, y riesgos toxicológicos por contaminación de los alimentos y del suelo y por su persistencia en el agua. No sucede esto cuando se utilizan productos biológicos (Sánchez, 2019). De esta manera, el control biológico aparece como una alternativa para minimizar los daños causados por los patógenos y reducir el uso de productos químicos. De acuerdo con Matta (1985), la estrategia biológica contra los fitopatógenos consiste en mantener

el equilibrio biológico preexistente a la incorporación de un cultivo, o reconstituirlo y manejar a los antagonistas naturales en situaciones ecológicamente desfavorables.

***Trichoderma* spp. como agente de biocontrol**

Una gran variedad de especies fúngicas han sido evaluadas como agentes biocontroladores, dentro de estas especies, las del género *Trichoderma* spp. se destacan en este tipo de estudios por su facilidad de cultivo y el amplio rango de patógenos que controla (Infante et al., 2009; Durman et al., 2003).

Dentro de la clasificación taxonómica, el género *Trichoderma* (Figura 2) pertenece al Reino Fungi (Hongos verdaderos), Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina; Clase Sordariomycetes (antes Pyrenomycetes), Orden Hipocreales, Familia Hipocreaceas. Caracterizados por presentar ascas unitunicadas contenidas en peritecios. En cultivo *In vitro* la mayoría de las colonias de *Trichoderma* se caracterizan por su rápido crecimiento. Al comienzo de su crecimiento, generan abundante micelio aéreo de color blanco grisáceo, luego su color cambia al verde oscuro, por la gran masa de conidios que se generan. Los conidióforos son ramificados, generalmente se forman de a pares, estos terminan en células conidiógenas denominadas fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios. En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación, producen unas estructuras de resistencia llamadas clamidosporas.

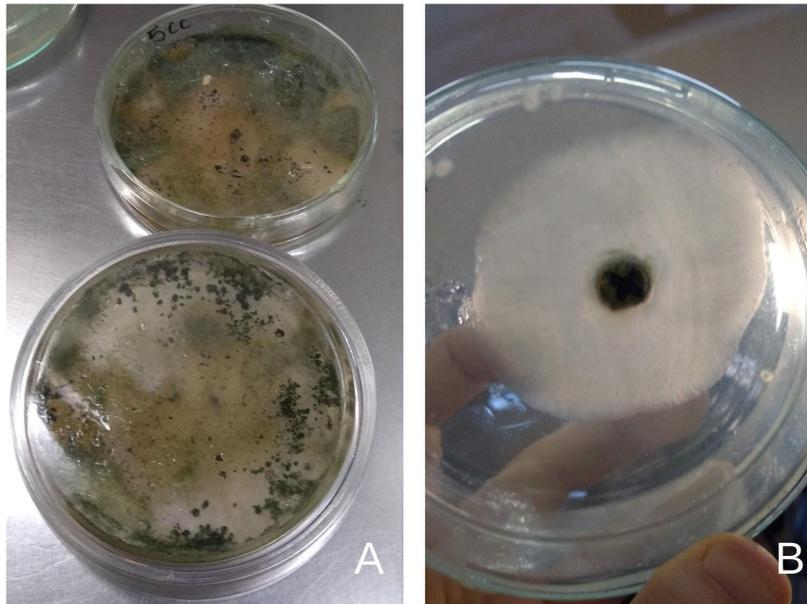


Figura 2. *Trichoderma harzianum* in vitro, donde se observa una colonia madre de 7 días de crecimiento (izquierda) y crecimiento en diámetro (derecha) de una colonia replicada.

Se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla, lo que les permite mostrar una gran plasticidad ecológica (Harman, 2006). Es por esta razón que las especies del género *Trichoderma* son muy comunes en diversos suelos, principalmente en suelos ácidos y ricos en materia orgánica.

Varios investigadores han encontrado a diversas especies de *Trichoderma* como antagonistas muy eficientes de diferentes especies de hongos fitopatógenos (Martínez et al., 2008; Brotman, et al., 2010, Corallo, 2012; Stocco et al., 2016; Samaniego-Fernández, et al., 2018). Estas especies son fáciles de aislar, de cultivar y de propagar en diversos substratos y, además, la mayoría de las especies tienen un buen comportamiento como micoparásitos, compiten eficientemente por el espacio y nutrientes, y tienen un sistema de enzimas capaz de atacar un buen número de fitopatógenos (Papavizas, 1985). Se han descrito diferentes mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a los fitopatógenos, estos se han clasificados de acción directa frente a los patógenos o de acción indirecta. Entre los primeros, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo,

2004; Howell 2003). Entre los mecanismos de acción indirectos se pueden mencionar los que inducen mecanismos de defensa de tipo fisiológicos y bioquímicos como es la inducción de resistencia en la planta (Harman, 2000), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección; la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Además, tienen la capacidad de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés y actúan como promotores de crecimiento (Harman et al., 2004).

La especie *Trichoderma harzianum* ha sido, hasta el momento, el hongo antagonista más utilizado en el control de enfermedades de las plantas. Además, se han obtenido nuevos biotipos tolerantes a fungicidas, con una mayor habilidad antagonista que los aislamientos originales (Martínez et. al., 2013). Es así como, aislamientos de *Trichoderma* spp. están siendo usados para el control biológico de enfermedades en muchos cultivos a nivel mundial (Mayo et al., 2015, Harman, 2006; Guerrero et al., 2017; Rolleri et al., 2021). Como ejemplo el estudio realizado por Martínez et al., (2008) donde se seleccionaron aislamientos de *Trichoderma* spp. como antagonistas en forma *in vitro*, en condiciones semicontroladas y posteriormente se probaron a campo, para el biocontrol de *Rhizoctonia* sp en cultivo de arroz. En el mismo trabajo se evaluó la competencia por el sustrato, micoparasitismo y la antibiosis de los microorganismos involucrados y se demostró que el 98,31% de los aislamientos presentaron alta capacidad antagónica, con diferentes tipos de interacción como lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración. De los 11 aislamientos de *Trichoderma* estudiados, 7 mostraron una eficiencia técnica superior al 80% en condiciones semicontroladas y 3 se destacaron para ser evaluados en el control de la enfermedad a campo.

Biofumigación

La biofumigación es una práctica que se utiliza para el control de plagas y enfermedades edáficas por medio de la liberación en el suelo de compuestos, en su mayoría volátiles, originados por la descomposición de residuos orgánicos. Se pueden emplear estiércoles, residuos agroindustriales y de cosechas, incorporación

de plantas de la familia Brassicáceae (Crucíferas) y otras especies como sorgo, maíz, etc. (Perniola et al., 2016). Durante el proceso de biofumigación, como resultado de la descomposición del material orgánico, se generan en el suelo sustancias con actividad biocida como amonio, ácido acético, metil isotiocianatos y compuestos azufrados. Algunos materiales orgánicos tienen efecto, por ejemplo, contra nemátodos a través de la actividad microbiana relacionada con la liberación de amonio. Cuando los materiales incorporados al suelo para biofumigar son tejidos de Crucíferas, entre los productos de la degradación de estos, se liberan compuestos denominados glucosinolatos (Hernández, 2007). Los isotiocianatos y otros compuestos volátiles derivados de los glucosinolatos juegan un papel muy importante en la supresión rápida (menos de 10 días) de patógenos. En diferentes ensayos, enmiendas con residuos de batata, papa, espinaca, tomate y sorgo fueron en algunos casos tan efectivas como los residuos de Crucíferas (Perniola et al., 2014), por lo que numerosos autores suponen que el aporte de materia orgánica sobre la comunidad microbiana puede favorecer la aparición de antagonistas y contribuir a reducir la población de patógenos (Mitidieri, 2005).

La combinación de métodos de control biológico con prácticas culturales podría colaborar en la prevención y en la disminución de la incidencia y severidad de enfermedades provocadas por diferentes patógenos. Resultados obtenidos por Perniola et al., (2014) demostraron en forma *in vitro* que *Trichoderma* spp. puede ser considerada compatible con la biofumigación con *Brassica juncea*. Además, determinaron que el crecimiento y su efecto antagonista sobre *Fusarium graminearum*, no serían afectados por la biofumigación con *B. juncea*. Otros estudios encontraron un efecto sinérgico entre *Trichoderma* spp. y la biofumigación con harina de semilla de *Brassica carinata* en un ensayo realizado en suelo bajo condiciones controladas (Galletti et al. 2008)

Considerando los antecedentes mencionados el empleo de antagonistas microbianos para el control biológico de Cmm, en combinación con la biofumigación, podría ser la mejor alternativa frente a las externalidades negativas provenientes del modelo actual. Por lo expuesto se presentan los siguientes objetivos:

Objetivos generales

Evaluar el potencial de la biofumigación y el uso de *Trichoderma harzianum* para el control del marchitamiento y cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en un cultivo comercial de tomate.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto *in vitro* de *T. harzianum* sola o combinada con sustancias biofumigantes producidas por las Crucíferas sobre Cmm.
- Evaluar el efecto en invernáculo de la aplicación de *T. harzianum* sola o combinada con la biofumigación con especies de la familia Brassiceae sobre Cmm en plantas de tomate.
- Evaluar el rendimiento (Peso y número de frutos) de las plantas tratadas con *T. harzianum*, luego de haber realizado una biofumigación al suelo.

Hipótesis

Existe efecto sinérgico entre *Trichoderma harzianum* y los compuestos volátiles liberados de la descomposición de las Crucíferas para reducir el crecimiento de Cmm aumentando los rendimientos de las plantas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos en laboratorio

1. Ensayos en laboratorio

- a. *Ensayos de confrontación entre el patógeno, el biocontrolador y las sustancias biofumigantes.*

Para evaluar el efecto de la biofumigación y de las dos cepas de *Trichoderma harzianum* (Th5cc y Th 118) sobre el patógeno se recolectó el tejido vegetal fresco de rúcula (*Eruca vesicaria*), proveniente de los experimentos del invernáculo. El

tejido vegetal se acondicionó limpiándolo con agua corriente, secándolo, cortando el material en pequeños trozos y luego se pesó en una balanza. Se colocaron en la base de una caja de Petri 5 g del tejido de la planta.

Para la preparación del ensayo, primeramente, se trazó una línea guía de 4 cm de largo en bases de cajas de Petri donde se sembró la bacteria sobre Agar nutritivo. Esta línea se encontró a 3 cm del borde de la caja y a 3 cm al lugar donde se colocó el antagonista. Sobre la misma base, se colocó un disco de 0,5 cm de diámetro obtenidos a partir de una colonia madre de *T. harzianum* en aquellos tratamientos donde se encontraban ambos microorganismos interactuando con la bacteria y la Crucífera o solo. Posteriormente se unió a la base con medio de cultivo otra base de caja de Petri que podía contener el tejido vegetal o estar vacía según el tratamiento que corresponda.

Todas las cajas de Petri, incluyendo la placa control sin tejido vegetal, se incubaron en estufa de cultivo a 27°C. Lo anteriormente mencionado se puede visualizar en la siguiente Figura 3.

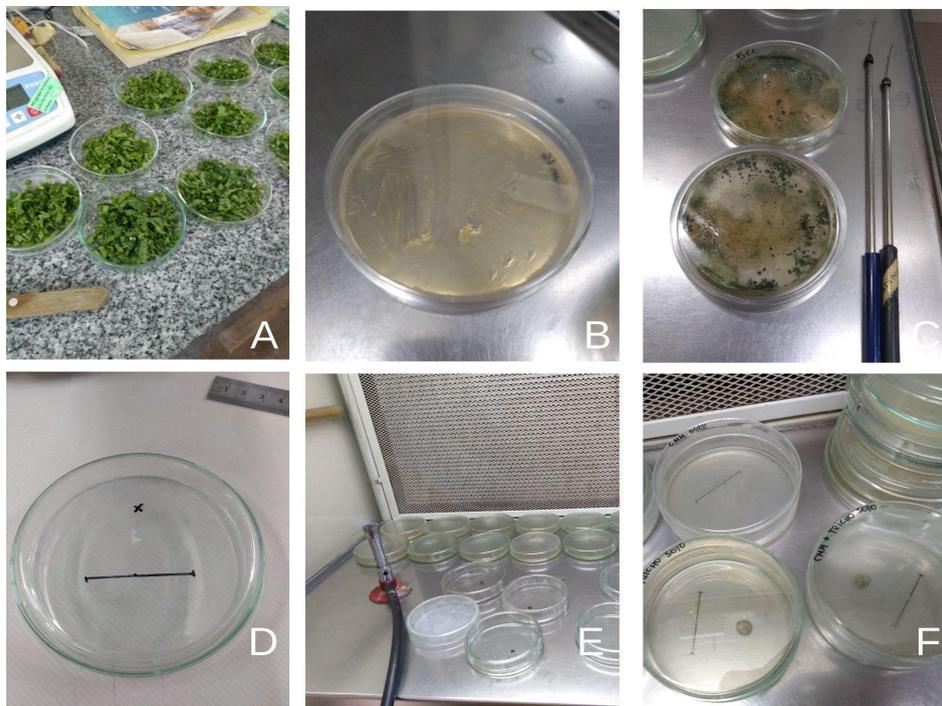


Figura 3. Ensayo *in vitro*. A: acondicionamiento y pesado de material vegetal. B: Colonia madre de *Cmm*. C: Colonias madre de *T. harzianum*. D: Cajas marcadas con las líneas guías para la siembra de los microorganismos. E: Siembra en condiciones de esterilidad. F: Cajas con los diferentes tratamientos para incubar en estufa.

Durante todos los días hasta que finalizó el ensayo se evaluó el diámetro de la colonia de *T. harzianum* y el área de la colonia de Cmm (Figura 4). El final del ensayo se determinó cuando *Trichoderma* cubrió toda la caja de Petri. Para evaluar el área de la colonia de Cmm, se midió el crecimiento en longitud sobre la línea marcada de la colonia de bacterias y se tomaron 3 medidas perpendiculares (centro y a los 2 cm de éste hacia la derecha e izquierda) de ancho. Para la etapa de evaluación, se promedió las tres medidas de ancho y se lo multiplicó por la longitud del crecimiento, obteniendo así, el valor de crecimiento de la bacteria. En cambio, para medir el diámetro de la colonia de *T. harzianum*, se tomaron dos medidas de crecimiento perpendiculares entre sí.

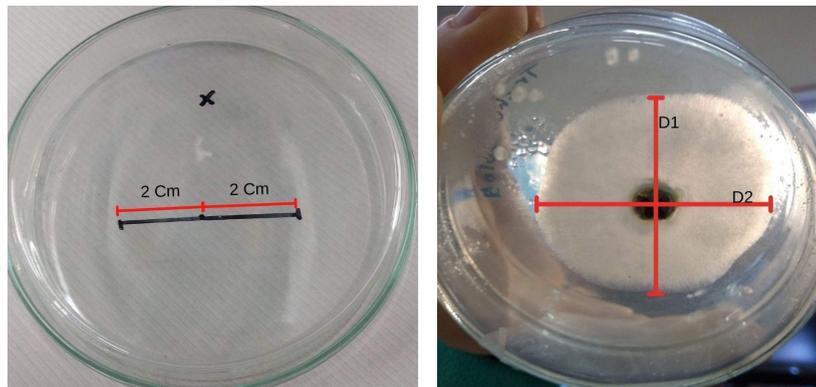


Figura 4. Técnica utilizada para medir Cmm (izquierda) y *T. harzianum* (derecha) *in vitro*.

2. Ensayos para la evaluación del efecto de la biofumigación y de *T. harzianum* sobre la infección de *C. michiganensis* subsp *michiganensis* en plantas de tomate en condiciones de invernáculo.

a. Preparación del terreno para biofumigar.

El ensayo se realizó en un invernadero proveniente de un período de descanso de 18 meses. Para la biofumigación se sembró en la mitad de este una mezcla de especies la Familia Brassicaceae (300 gr) compuesta por variedades de kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica* L.) 177 g, rúcula (*Eruca vesicaria*) 67 g y col negra (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) 56 g. Las especies se incorporaron al suelo cuando llegaron a floración con una rastra rotativa, previo picado y triturado de las mismas. A continuación, se colocó polietileno cristal de 150 μ m durante 10 días para

favorecer la descomposición de la materia orgánica y la producción de compuestos volátiles provenientes de las Crucíferas. El transplante se realizó 72 h después de retirado el polietileno (Figura 5), cuando los plantines tenían entre 4 o 5 hojas.

Se utilizaron plantines de tomate comerciales híbridos Elpida y previo al transplante se realizó la incorporación de los antagonistas como formulado líquido.



Figura 5. Secuencia de pasos para la preparación del terreno a biofumigar y posterior transplante de tomates. A: siembra y crecimiento de Crucíferas en el terreno donde se realizó el ensayo. B y C: corte de la Crucíferas para ser incorporada al suelo y preparación del lote a biofumigar. D: incorporación de las Crucíferas al suelo mediante pasada de disco. E: colocación del polietileno para la biofumigación. F: plantación de plantines de tomate.

b. Preparación del inóculo de *T. harzianum*.

Como antagonistas se utilizaron 2 cepas de *T. harzianum*, la cepa Th 118 y Th5cc, ambas se encuentran caracterizadas molecular y morfológicamente y pertenecen al Banco Micológico de especies de *Trichoderma* que se encuentra en el CIDEFI. La cepa Th 118 fue aislada de la superficie foliar de plantas de tomate y estudiada previamente en ensayos de invernáculo frente a *Botrytis cinerea* donde redujo la incidencia de los síntomas ocasionados por este patógeno (Dal Bello et al., 2011). Por otra parte, la cepa Th5cc fue aislada de trigo y utilizada como antagonista de *Zymoseptoria tritici* (Cordo et al., 2007). Para la preparación del formulado líquido,

se sembraron en cajas de Petri con el medio APG (Agar papa glucosado 2%), discos de 5 mm de diámetro de un cultivo de cada cepa de *T. harzianum* de 6 días de edad. Al cabo de una semana, se rasparon la superficie de la colonia con un cepillo más el agregado de agua destilada estéril. Las suspensiones se ajustaron a 1×10^8 conidios/mL. Se agregó 10 mL de cada antagonista en forma de riego a cada celdilla de la bandeja de siembra donde se encontraban las plantas de tomate. En los tratamientos testigos solo se colocó 10 mL de agua destilada estéril.

c. Preparación del inóculo de Cmm.

Se utilizó la cepa de la bacteria patógena que pertenece a la colección del CIDEFI (LPA15), aislada de plantas de tomate infectadas del Cinturón Hortícola Platense e identificada por sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares. La inoculación se realizó a partir de una suspensión bacteriana que se obtuvo utilizando cultivos de 24 a 48 h de edad en medio NBY (Nutritive Broth Yest Extract Agar – Caldo Nutritivo Extracto de Levadura Agar) a partir de los cuales se retiraron las bacterias de la superficie y se suspendieron en agua destilada estéril, ajustando la concentración de la suspensión a 1×10^7 UFC/ml. con espectrofotómetro.

La suspensión bacteriana se aplicó en la herida del desbrote entre la 4ta y 6ta hoja, cuando las plantas tenían una altura total con 12 a 14 hojas desarrolladas. Se utilizó un palillo estéril embebido en la suspensión, pulverizando posteriormente sobre la herida con agua destilada para favorecer las condiciones de humedad y asegurar la infección de las plantas (Figura 6).

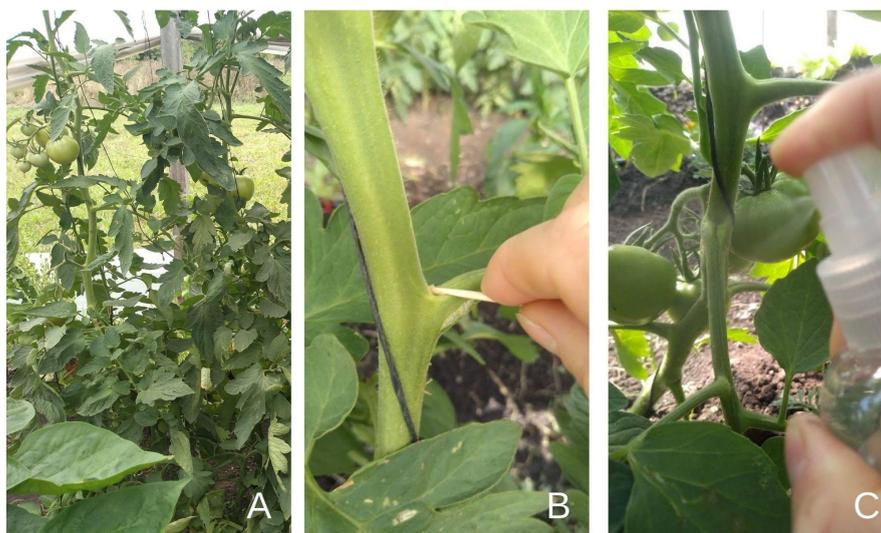


Figura 6. Inoculación de Cmm en cultivo de tomate. A: cultivo de tomate en estado de fructificación. B y C: inoculación de Cmm en el cultivo al momento del desbrote.

d. *Diseño experimental*

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental de Gorina - Ministerio de Desarrollo Agrario de la Provincia de Buenos Aires. Se utilizó un invernáculo comercial de 6 x 20 m Se organizó en 3 bloques con 6 tratamientos al azar. Por cada tratamiento se realizaron 6 repeticiones.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T0: plantines de tomate inoculados con Cmm e incorporación de Crucíferas.
- T1: plantines de tomate tratados con *T. harzianum* (Th5cc), inoculados con Cmm e incorporación de Crucíferas.
- T2: plantines de tomate tratados con *T. harzianum* (Th 118), inoculados con Cmm e incorporación de Crucíferas.
- T3: plantines de tomate sin *Trichoderma* inoculados con Cmm.
- T4: plantines tratados con *T. harzianum* (Th5cc) e inoculados con Cmm.
- T5: plantines de tomate tratados con *T. harzianum* (Th 118) e inoculados con Cmm.

La evaluación consistió en determinar la severidad de la enfermedad, cuantificando las hojas afectadas por encima y por debajo de la zona de inoculación y los

parámetros de rendimiento, número y peso de frutos por planta (Figura 7). Se realizaron tres evaluaciones con una frecuencia semanal.



Figura 7. Evaluación de los parámetros del rendimiento, peso y números de frutos por planta durante el ensayo. A: parcela de ensayo. B: recolección de frutos por planta y por tratamiento. C: identificación de cada cosecha con número de bloque, número de planta y tratamiento. D: pesado y recuento de frutos.

4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* y de invernáculo se analizaron mediante Análisis de la varianza (ANOVA), comparando sus medias con la prueba de Tukey para un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$). En el caso que los datos no cumplan con los supuestos de normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad, se aplicó la estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Para ambos análisis se utilizó el programa estadístico Infostat® (Di Rienzo et al., 2015).

RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de los ensayos planteados en el proyecto de trabajo final. Parte de las actividades programadas de laboratorio (ensayos *in vitro* de biocontrol con la cepa Th 118) no se pudieron completar debido

a la pandemia declarada de Covid 19 y a las medidas para el aislamiento social, preventivo y obligatorio declaradas por el Gobierno Argentino (ASPO).

1. Ensayos en laboratorio

a. Ensayos de confrontación entre el patógeno, el biocontrolador y las sustancias biofumigantes.

Se evaluó diariamente el crecimiento de Cmm y la cepa Th5cc de *T. harzianum* spp. durante 4 días consecutivos, tiempo en que el antagonista tardó en cubrir toda la caja de Petri.

Los resultados del ANOVA del primer día de evaluación (Tabla 1) demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor fue de 0,0001.

Tabla 1. Análisis de la Varianza del crecimiento de Cmm del primer día de evaluación.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,55	3	1,85	14,07	0,0001
Tratamientos	5,55	3	1,85	14,07	0,0001
Error	2,1	16	0,13		
Total	7,65	19			

Como muestra la Figura 8, durante el primer día de evaluación no hubo diferencias significativas en aquellos tratamientos donde se encontraba el patógeno sólo (testigo), el patógeno en presencia del tejido vegetal de la Crucíferas o ambos combinados con el antagonista. Sin embargo, se observa que el crecimiento del patógeno en los tratamientos que se encontraba presente el antagonista sin las crucíferas, fue significativamente mayor.

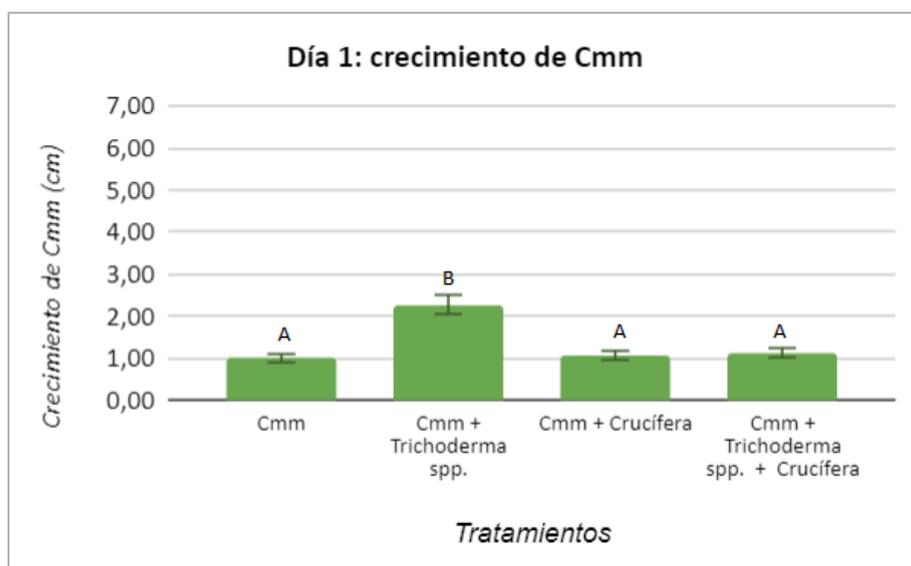


Figura 8. Crecimiento del patógeno sólo, en presencia del antagonista, en presencia de la Crucíferas y en presencia del antagonista y la Crucíferas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El análisis de la varianza realizado con los datos del segundo día de ensayo (Tabla 2) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p -valor fue de 0,7414.

Tabla 2. Análisis de la Varianza durante el segundo día de ensayo.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,92	3	3,31	0,42	0,7414
Tratamientos	9,92	3	3,31	0,42	0,7414
Error	126,03	16	7,88		
Total	135,94	19			

En la siguiente Figura 9 se puede observar que, aunque no hubo diferencias significativas con los otros tratamientos, el crecimiento del patógeno fue mayor, en el tratamiento con el antagonista y la Crucifera.

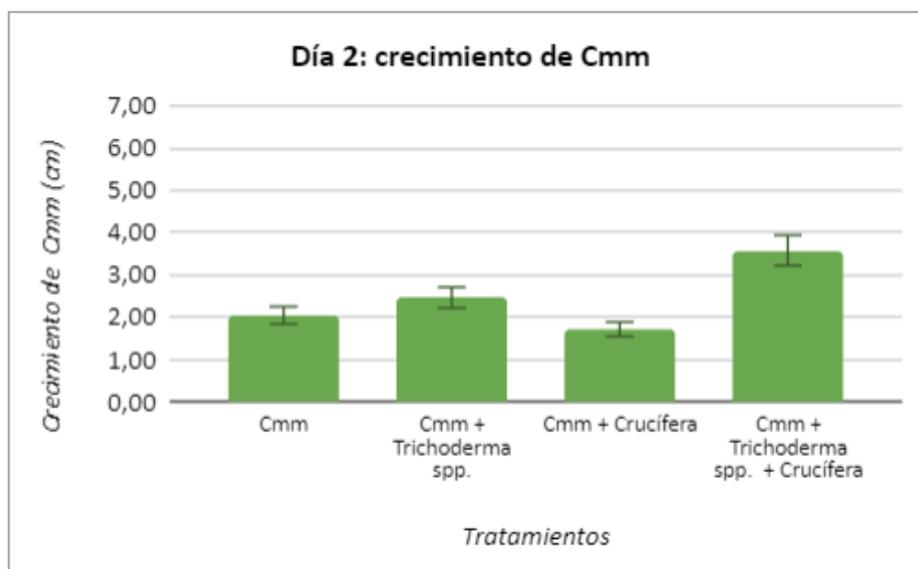


Figura 9. Crecimiento del patógeno sólo, en presencia del antagonista, en presencia de las Crucíferas y en combinación del antagonista y las crucíferas durante el segundo día de ensayo.

Para los datos del tercer día de ensayo, se realizó un ANOVA pero como los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad, se aplicó estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis no paramétrico. Prueba de kruskal Wallis durante el tercer día de ensayo.

Tratamiento	Ranks	
<i>Trichoderma spp.</i> + Cmm + Crucífera	3,6	A
Cmm + Crucífera	11,3	B
<i>Trichoderma spp.</i> + Cmm	11,9	B
Cmm	15,2	B

En la Figura 10 se puede observar que con la combinación de *Trichoderma sp.* y las Crucíferas el crecimiento del patógeno fue menor que en el resto de los tratamientos. Incluso se puede observar un 75% menos de crecimiento que el testigo con Cmm solo. Si bien los tratamientos que presentaba el patógeno con el antagonista y el patógeno con las Crucíferas, tuvieron un crecimiento menor en comparación del testigo, no fueron tan destacables como el tratamiento anteriormente mencionado.

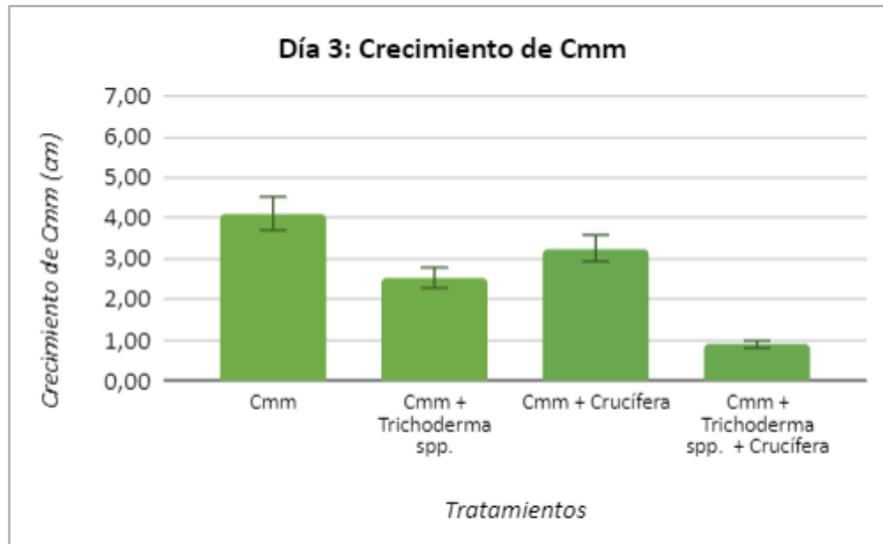


Figura 10. Crecimiento del patógeno sólo, en presencia del antagonista, en presencia de las Crucíferas y en presencia del antagonista y las Crucíferas durante el tercer día de ensayo.

En el cuarto día de evaluación el análisis de varianza (Tabla 4) demostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, dado que el p-valor fue menor a 0,0001.

Tabla 4. Análisis de la Varianza del crecimiento de Cmm durante el cuarto día de ensayo.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,25	3	0,75	19,17	<0,0001
Tratamientos	2,25	3	0,75	19,17	<0,0001
Error	0,63	16	0,04		
Total	0,63	19			

El testigo (Cmm Solo) no presentó diferencias significativas en el crecimiento con el tratamiento con el patógeno y el antagonista. El tratamiento con el patógeno y con la Crucífera, tuvo un mayor crecimiento presentando diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, es importante destacar que el tratamiento con *Trichoderma* sp. y las Crucíferas tuvo un crecimiento de Cmm significativamente menor que el resto de los tratamientos. Lo mencionado anteriormente, se puede observar en la siguiente Figura 11.

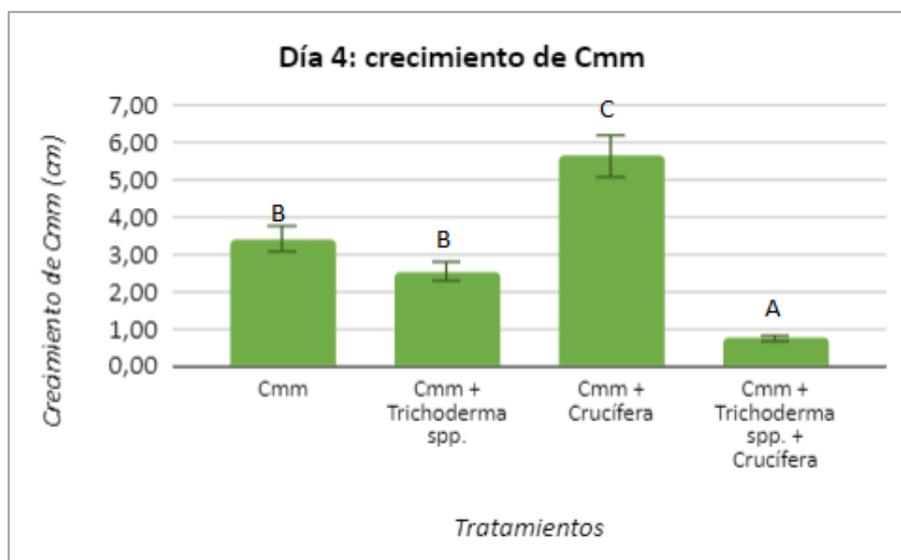


Figura 11. Crecimiento del patógeno sólo, en presencia del antagonista, en presencia de la Crucifera y en presencia del antagonista y la Crucifera durante el cuarto día de ensayo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En cuanto a las variaciones del crecimiento diario del patógeno (Figura 12), se observaron distintas situaciones entre los diferentes tratamientos durante los días transcurridos hasta la finalización del ensayo. En el tratamiento testigo (Cmm solo) hubo un aumento del crecimiento durante las 3 primeras evaluaciones, llegando a su pico máximo en el tercer día, produciendo una caída en el crecimiento hacia el cuarto día, que podrían estar asociado a una contaminación. El tratamiento donde se enfrentaba la bacteria con la especie vegetal, Cmm tuvo un crecimiento en aumento durante el transcurso de todo el ensayo, la explicación a este comportamiento debería ser estudiada en futuras investigaciones. En cuanto al crecimiento que presenta Cmm cuando está solo con el antagonista, se mantuvo constante durante los 4 días de evaluación, evidenciándose que *T. harzianum* produce un efecto de detención del crecimiento de la bacteria. Por último, el crecimiento de Cmm, en el tratamiento que combina *Trichoderma* y las Crucíferas, tuvo su máximo efecto de antagonismo a partir del tercer día de evaluación, evidenciándose el efecto de inhibición del crecimiento sobre el patógeno a mediano o largo plazo.

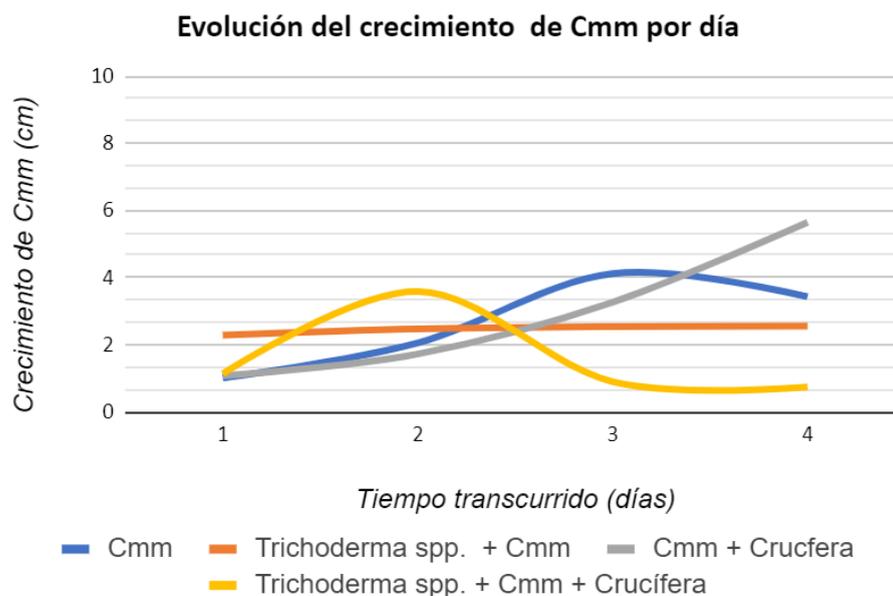


Figura 12. Variación del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* durante el periodo de transcurso del ensayo y su variación frente a los distintos tratamientos.

En cuanto al crecimiento del antagonista, se observaron muy pocas variaciones en el diámetro durante las diferentes evaluaciones y entre los distintos tratamientos hasta la finalización del ensayo. Se realizaron los análisis de varianza para cada evaluación y todos mostraron que no había diferencias significativas entre los tratamientos (datos no mostrados). Todos los tratamientos presentaron un comportamiento similar a lo largo del ensayo, siendo los tratamientos del antagonista junto al patógeno y del antagonista solo los que tuvieron un crecimiento radial menor. Lo antedicho queda en evidencia en la siguiente Figura 13.

Evolución del crecimiento de *Trichoderma* spp. por día

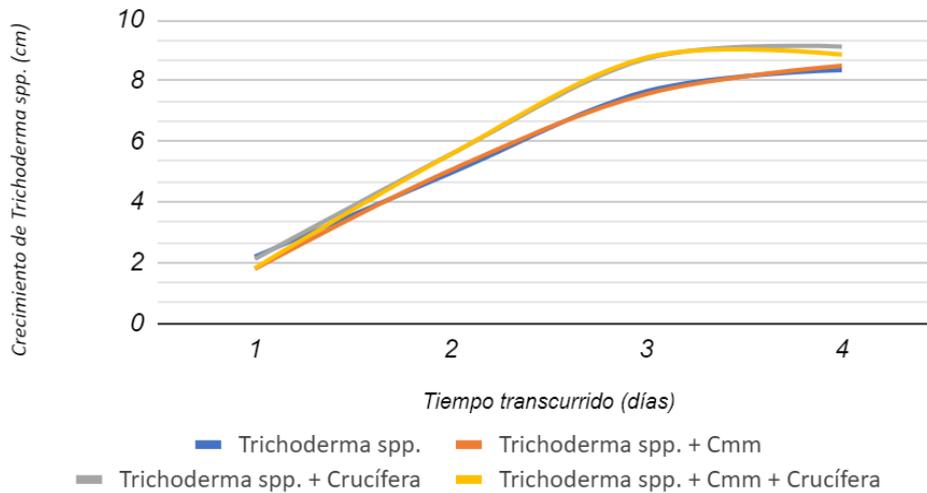


Figura 13. Variación del crecimiento de *Trichoderma harzianum* durante el periodo de transcurso del ensayo y su variación frente a los distintos tratamientos.

2. Evaluación del efecto de la biofumigación y de *T. harzianum* sobre la infección de *C. michiganensis* subsp *michiganensis* en plantas de tomate en condiciones de invernáculo.

a. Evaluación de los parámetros de rendimiento (número y peso de frutos por planta)

Para determinar el rendimiento se efectuó la suma total de los pesos de frutos por planta de tomate de las tres evaluaciones. Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA (Tabla 5) resultando en que los tratamientos no muestran una diferencia significativa entre sí, siendo el p-valor de 0,0609 mayor al valor de referencia ($p \leq 0,05$).

Tabla 5. Análisis de la Varianza para el peso de los frutos por planta.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,11	7	2,16	3,2	0,0042
Bloque	7,72	2	3,86	5,73	0,0044
Tratamientos	7,39	5	1,48	2,19	0,0609
Error	67,39	100	0,67		
Total	82,50	107			

Aunque no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos podemos observar en la Figura 14 que algunos tratamientos presentaron mayores valores de peso de frutos. El tratamiento que tuvo un mayor peso promedio de frutos fue el que se encontraba la cepa Th 118 de *T. harzianum* junto al patógeno, con un valor de 2,19 g. Todos los tratamientos con las Crucíferas (Con Cmm o con cualquiera de las dos cepas de *Trichoderma*) presentaron los menores pesos en los frutos junto con el tratamiento con Cmm. Si bien, el tratamiento testigo con Cmm, arrojó un valor promedio de 1,96 g de peso de frutos, mayor al que se encontraba la cepa T5cc de *T. harzianum* junto con Cmm y las Crucíferas (1,60 g), este valor no superó a las plantas de tratamiento con la cepa Th 118.

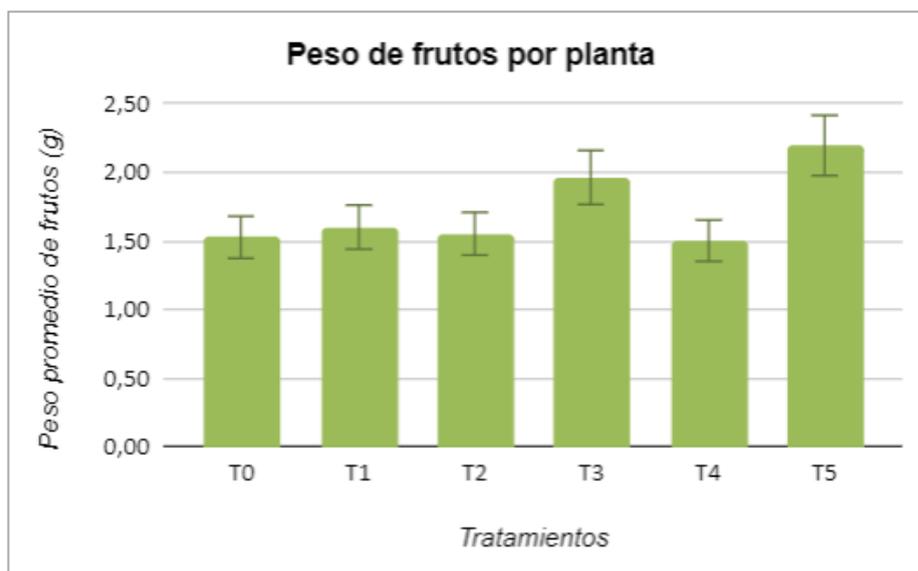


Figura 14. Peso promedio de frutos por planta de tomate y por tratamiento. Donde: T0: Testigo con Cmm y Crucíferas; T1: Th5cc con Cmm y Crucíferas; T2: Th 118 con Cmm y Crucíferas; T3: Testigo con Cmm; T4: Th5cc con Cmm; T5: Th 118 con Cmm.

En lo que respecta a la evaluación de número de frutos por planta de tomate, también se analizaron los datos de las tres evaluaciones juntas, evidenciando en el ANOVA que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el p-valor de 0,1014 (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de la Varianza para el número de frutos por planta.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	231,75	7	33,11	2,77	0,0114
Bloque	118,22	2	59,11	4,94	0,009
Tratamientos	113,53	5	22,71	1,9	0,1014
Error	1195,5	100	11,97		
Total	1428,25	107			

Si bien no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, según el ANOVA, se puede observar (Figura 15), que el tratamiento que presentó mayor número de frutos por planta (11,59) fue el que se encontraba la cepa Th 118 de *Trichoderma* spp. junto al patógeno. El resto de los tratamientos no presentaron grandes variaciones entre ellos.

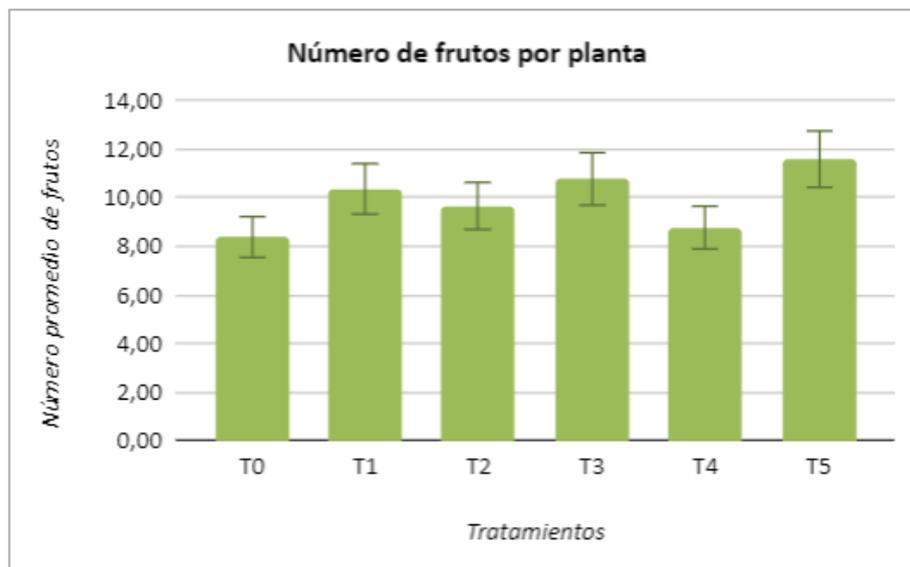


Figura 15. Número promedio de frutos por planta de tomate y por tratamiento. Donde: T0: Testigo con Cmm y Crucíferas; T1: Th5cc con Cmm y Crucíferas; T2: Th 118 con Cmm y Crucífera; T3: Testigo con Cmm; T4: Th5cc con Cmm; T5: Th 118 con Cmm.

b. Evaluación de enfermedad en plantas de tomate.

Se evaluó el avance de la enfermedad producido por Cmm cada 7 días durante 3 semanas consecutivas. Los resultados del ANOVA de la evaluación (Tabla 7) demuestran que existen diferencias significativas entre los tratamientos, dado que el p -valor fue de 0,0027.

Tabla 7. Análisis de la Varianza para el ensayo de severidad.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,52	7	0,79	2,92	0,008
Bloque	0,21	2	0,11	0,4	0,6737
Tratamientos	5,31	5	1,06	3,93	0,0027
Error	27,02	100	0,27		
Total	32,54	107			

El tratamiento que mostró una mayor severidad de la enfermedad fue el testigo con Cmm solo y sin biofumigación. Los tratamientos donde se encontraban las cepas Th5cc y Th 118 con Cmm sin biofumigación y el tratamiento con la cepa Th 118 con biofumigación no presentaron diferencias significativas entre sí, sin embargo, presentaron un menor número de hojas enfermas que el testigo sin la incorporación de Crucíferas. Por otra parte, aunque estadísticamente el tratamiento que presenta al patógeno con las Crucíferas y el tratamiento con la cepa Th5cc en presencia de la Crucífera y Cmm, no presentan diferencias significativas entre sí, se puede observar que este último tratamiento mostró la mayor reducción en la cantidad de la enfermedad. Lo anterior se muestra en la siguiente Figura 16:

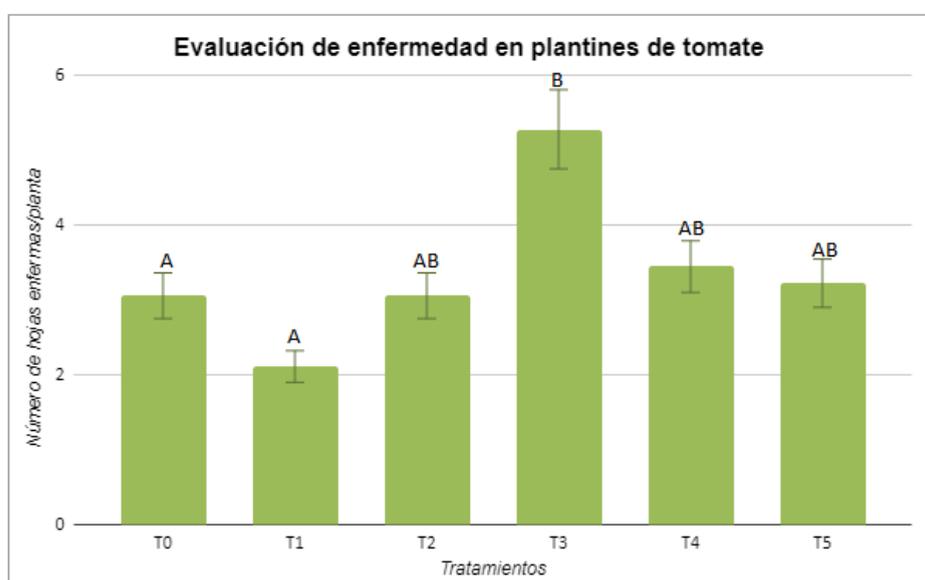


Figura 16. Resultados de la evaluación de severidad de plantas de tomate. Donde: T0: Testigo con Cmm y Crucíferas; T1: Th5cc con Cmm y Crucíferas; T2: Th 118 con Cmm y Crucíferas; T3: Testigo con Cmm; T4: Th5cc con Cmm; T5: Th 118 con Cmm.

DISCUSIÓN

La forma actual de producción, basada en el uso desmesurado de productos químicos, sobre todo en el control de enfermedades, plagas y malezas, y la intensa

labor de la tierra, sin considerar los factores intervinientes en el sistema agropecuario, ha traído aparejado problemas ambientales, sociales y económicos. Esto ha generado una alerta por parte de la sociedad que demanda cambios de paradigma en la forma de producción ya que afecta negativamente en la calidad de vida de la población (Sarandón & Flores, 2014). Por lo anterior han tomado relevancia las prácticas como el control biológico utilizando antagonistas de patógenos de especies de importancia comercial, como es *Trichoderma* spp. o la utilización de especies Crucíferas para la práctica de biofumigación, pudiendo realizarse sola o combinada con microorganismos biocontroladores como mecanismos de control de enfermedades de cultivos.

Una de las enfermedades más importantes en el cultivo de tomate bajo invernadero que se presenta en el Cinturón Hortícola Platense y de distribución mundial es el marchitamiento y cancro bacteriano del tomate producido por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (de León et al. 2011; CABI 2021). Es una enfermedad de muy difícil control que ocasiona grandes pérdidas de rendimiento, dónde los tratamientos químicos, como por ejemplo el uso de productos combinados (oxicloruro de cobre + mancozeb) que pueden usarse como método preventivo o curativo (Flores et al., 2012), son cuestionados (Hausbeck et al., 2000) debido a los problemas de salud que pueden ocasionar en el hombre por su toxicidad y en el ambiente. Es por esto, que es fundamental estudiar el efecto de alternativas de manejo de fitopatógenos que puedan formar parte de las estrategias del manejo integrado de enfermedades y que, además, satisfagan las demandas de la población. Debido a esto, en el presente trabajo se estudió el efecto *Trichoderma harzianum* solo y en combinación con la práctica de biofumigación para el control de la mencionada enfermedad.

En este estudio se pudo observar que, al igual de lo evaluado por Durman et. al. (2003) en el efecto de biocontrol de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani in vitro*, las colonias del *T. harzianum* inhibieron el crecimiento de Cmm, impidiendo su crecimiento con respecto al tratamiento testigo durante toda la evaluación. Es importante resaltar que el crecimiento de la cepa de *Trichoderma* no fue afectada por los compuestos volátiles liberados por las crucíferas, resultados similares fueron reportados por Galletti et al (2008). Además, la combinación *in vitro*

del antagonista *Trichoderma* spp. y la biofumigación tuvo un efecto sinérgico, reduciendo significativamente el crecimiento de Cmm, produciéndose la mayor inhibición durante el tercer día de ensayo, resultados similares obtuvieron Perniola et al. (2014). Sin embargo, el crecimiento de Cmm, en ensayos en laboratorio, se incrementó en presencia de las crucíferas. Este aumento en el crecimiento de Cmm podría deberse a errores en la cuantificación del crecimiento de las colonias o las contaminaciones generadas por otras bacterias, por lo tanto, sería un buen punto de partida para futuras investigaciones. Por otro lado, Mitidieri (2005) destaca el efecto de la crucífera en ensayo *in vitro* en la reducción del patógeno *Phytophthora* spp. que afecta al cultivo de papa.

Los mecanismos de acción utilizados por los antagonistas para efectuar el control biológico de las enfermedades de las plantas son complejos y variados. Estos mecanismos también están influenciados por el tipo de suelo, la temperatura, el pH y la humedad de la planta y el medio ambiente del suelo, y por otros miembros de la microflora (Howell, 2003). Debido a esto, diversos autores destacan la importancia de la selección previa de las cepas de *Trichoderma* spp. *in vitro*, para corroborar su capacidad biofungicida en posteriores experimentos a campo o invernáculo (Guerrero et al 2017, Stocco et al. 2016). Debido a lo anterior se destaca en este estudio la importancia de validar en ensayos bajo condiciones reales de cultivo, (invernáculo) los resultados obtenidos *in vitro*. Es importante resaltar que en el presente estudio se vio una disminución en el número de hojas de tomate afectadas por Cmm cuando se utilizaba la práctica de biofumigación en condición de invernáculo. Por el contrario, Alonso (2009) determinó que la incidencia de la enfermedad causadas por Cmm y *Ralstonia solanacearum* (Marchitamiento bacteriano del tomate) en plantas de tomate no disminuyó con la biofumigación, pero si cuando se realizó biosolarización. En relación con el efecto de *Trichoderma* spp. sobre la severidad de la enfermedad, aquellas plantas que fueron tratadas con el hongo antagonista Th5cc en presencia de Crucíferas, mostraron menor número de hojas afectadas por Cmm, tal como observaron en los estudios realizados en plantas de tomate en cultivos de invernadero (Guerrero et al., 2017; Niño Silva & Guerrero, 2019; Rolleri et al. 2021). Sin embargo, el tratamiento que mayor efecto

tuvo sobre la enfermedad producida por Cmm, fue el que se encontraba el antagonista (cepa Th 118) cuando no se realizó biofumigación. Sin embargo, Mitidieri et al. (2011) mencionan que algunos hongos como *Trichoderma* resultan muy tolerantes a los isotiocianatos. Los autores sugieren que la biofumigación puede provocar un cambio en la composición de la microflora del suelo y aumentar la proporción de antagonistas.

Respecto a los parámetros del rendimiento estudiados, los tratamientos que presentaban la cepa de *T. harzianum* Th 118 en ausencia de las Crucíferas y junto a Cmm mostraron un aumento en el peso y número de frutos por planta, al igual que lo estudiado por Rolleri, et. al. (2021) sobre el uso de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol del Cmm, evidenciándose un posible efecto en el aumento del rendimiento cuando se incorpora este componente al sistema productivo. Esto puede deberse a que *Trichoderma* coloniza las raíces mejorando el crecimiento y desarrollo de las raíces, la productividad de los cultivos, la resistencia al estrés abiótico y la absorción y uso de nutrientes (Benitez et al., 2004). Resultados similares fueron reportados por Pastor et. al. (2015) donde *T. harzianum* presentó un aumento en los parámetros de rendimiento del cultivo en presencia del patógeno *Thecaphora frezii* (carbón del maní) en cultivos de maní a campo. En relación con los tratamientos con crucíferas no se observó un aumento en los parámetros de rendimiento. Sin embargo, Alonso (2009) proponen que la incorporación de restos de plantas en el suelo, supondrán un aporte extra de material orgánico, lo que permitirá una disminución en la adición de estiércoles, aporte que favorece el nivel de nutrientes en el suelo, así como las características del suelo, principalmente, de su estructura aumentando los rendimientos.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar que es posible la combinación de *Trichoderma harzianum* con la práctica de biofumigación con crucíferas para ser incorporada como alternativa promisoría dentro de un plan de manejo integrado de enfermedades en el cultivo de tomate bajo cubierta, siempre que se analice *in vitro* e *in vivo* cada una de las cepas del antagonista.

CONCLUSIONES Y/O CONSIDERACIONES

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados, la hipótesis planteada en este trabajo:

“Existe efecto sinérgico entre *Trichoderma harzianum* y los compuestos volátiles liberados de la descomposición de las Crucíferas para reducir el crecimiento de Cmm aumentando los rendimientos de las plantas de tomate”

Se acepta parcialmente debido a que, si bien en los resultados *in vitro* la combinación del antagonista *Trichoderma* spp. y la biofumigación tuvo un efecto sinérgico, reduciendo significativamente el crecimiento de Cmm, al igual que la reducción de la enfermedad evaluada a campo. Sin embargo, no hubo un aumento significativo del rendimiento cuando se combinaron el antagonista con la práctica de biofumigación.

BIBLIOGRAFÍA

Alonso, M. J. Z. (2009). *Efecto de la biofumigación y biosolarización en el control de agentes fitopatógenos* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Apple, J. L., Horsfall, J. G., & Cowling, E. B. (1977). The theory of disease management. *Plant disease an advanced treatise. How disease is managed, 1*, 79-101.

Argerich, C., & Troilo, L. (2011). Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la cadena de tomate (No. Q02 ARG 18460). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires (Argentina) FAO INTA.

Balestra, G. M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E., & Quattrucci, A. (2009). Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28 (10), 807-811.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.

Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS one*, 7(10), e48198.

Blancard, D. (1996). *Enfermedades del tomate. INRA Estación de Patología. Ed. Mundi-Prensa. España. 109 pp.*

Brotman, Y., Kapuganti, J. G., & Viterbo, A. (2010). *Trichoderma. Current Biology*, 20(9), R390-R391.

CABI. (2021). Centre for Agricultural Bioscience International. *Datasheet: Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (bacterial canker of tomato).

Carlton, W. M., Braun, E. J., & Gleason, M. L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88(6), ChangSharabani 525-529.

Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81(10), 1276-1281.

Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens.* American Phytopathological Society.

Corallo, B. (2012). Selección de cepas de *Trichoderma* sp. antagonistas del patógeno de sorgo *Fusarium nygamai*.

Cordo, C., C. Mónaco, C. Segarra, A. Perelló, D. Bayo, A. Mansilla, N. Kripelz & R. Conde. (2007). *Trichoderma* spp. as elicitors in the defense responses of wheat plants against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17: 687-698.

Dal Bello, G., M.C. Rollán, G. Lampugnani, C. Abramoff, L. Ronco, S. Larran, M. Stocco & C. Mónaco. (2011). Biological control of leaf grey mould of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *International Journal of Pest Management* 57: 177–182.

Davis, M. J.; Gillaspie, A.G.Jr.; Vidaver, A.K.; Harris, R.W. (1984) *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic Coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov., and *Cavibacter xyli* subsp. *cynodonis* subsp. nov., pathogens that cause Ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34:107-117.

De León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant disease*, 95(11), 1328-1338.

Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L.Gonzalez, M. Tablada & C.W. Robledo. (2015). InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>. Último acceso marzo 2021.

Durman, S., Menéndez, A., & Godeas, A. (2003). Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* in vitro y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(1), 13-18.

EPPO (2013). Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Production des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diagnostics PM 7/42. Bulletin OEPP/EPPO 43 : 46-67.

EPPO, (2020) Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Production des Plantes European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Base de datos global (última actualización 24/7/2020). <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI> Último acceso marzo 2021.

FAOSTAT. (2019). Food Agricultural Organization of the United Nations. Consulta 4/11/2021. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Último acceso marzo 2021.

Flores, C., Bueno, S., Giorgini, S., & Flores, C. (2012). Enfermedades de tomate: guía de consulta. INTA ediciones.

Galletti, S.; Sala, E.; Leoni, O.; Burzi, P. L.; Cerato, C. 2008. *Trichoderma* spp. tolerance to *Brassica carinata* seed meal for a combined use in biofumigation. *Biological Control*. 45(3): 319-327.

Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., & Voloudakis, A. E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75(8), 834-838.

Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1995). Intake of carotenoids and retino in relation to risk of prostate cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 87(23), 1767-1776.

Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., & Ricker, M. D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease*, 77(11), 1069-1076.

Guerrero, R., Mónaco, C. I., Stocco, M., Rolleri, J., & Guerrero, N. (2017). Selección de aislamientos de *trichoderma* spp. Para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) del tomate (*Lycopersicum esculentum* mill.). *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 6(1), 9-20.

Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., & Fulbright, D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90(1), 38-44.

Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393.

Harman, G. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190–194.

Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., & Chen, J. (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), 147-153.

Hernandez, B. L. M. (2007). Biofumigación con acolchado plástico e incorporación de materia orgánica y organismos antagonicos para el manejo ecológico de plagas.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21.

- Jenkins, J. A. (1948).** The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), 379-392.
- Jones, J.B.; Jones, J.P.; Stall, R.E. y Zitter, T.A. (2001).** Plagas y Enfermedades del Tomate. Sociedad Americana d Fitopatología. Ed. Mundi-Prensa, España Pp. 26-32.
- Kawaguchi, A., & Tanina, K. (2014).** Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *European journal of plant pathology*, 140(3), 399-406.
- Kawaguchi, A., Tanina, K., & Inoue, K. (2010).** Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, 59(1), 76-83.
- Liu, J., & Schelar, E. (2012).** Pesticide exposure and child neurodevelopment: summary and implications. *Workplace health & safety*, 60(5), 235-242.
- Lorenzo, M. E. (2004).** Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. *Fitosanidad*, 8(2), 64.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013).** *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H., & Cruz, A. (2008).** Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal*, 23(2), 118-125.
- Matta A (1985)** Lotta biologica, quale strategia? La difesa delle piante 2: 95-98.
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M. Lorenzana, A., Campelo, M., Hermosa, R., Cosquero, P. (2015).** Influence of *Rhizotocnia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in plant science*, 6:685.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E., & Stepanovic, M. (2015).** 19 Effects of Copper-based Compounds, Antibiotics and a Plant Activator on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Greenhouse Tomato Seedlings.
- Mitidieri, M. S. (2005).** *La biofumigación en el marco del manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos hortícolas*. EEA San Pedro, INTA.
- Mitidieri, M., Brambilla, M. V., Barbieri, M., Piris, E., Piris, M., & Chaves, E. (2011).** La biofumigación y el uso de portainjertos resistentes en el marco del manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos de tomate bajo cubierta. INTA, Argentina.
- Mónaco, (2014).** Principios de manejo ecológico de enfermedades de cultivos (pp 314 - 341). En: *Agroecología: Bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables*, Sarandón, S. J., & Flores, C. C. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). La Plata, Buenos Aires.

Niño Silva, E. C., & Guerrero, O. A. (2019). Efecto de *Trichoderma lignorum* y *Sacharomyces cerevisiae* en el control del hongo *Botrytis Cinerea* causante del moho gris de la fresa y su rendimiento, en el municipio de Subachoque Cundinamarca.

Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual review of phytopathology*, 23(1), 23-54.

Pastor, N. A., Ganuza, M., Reynoso, M. M., Folguera, J., Rovera, M., & Torres, A. M. (2015). Bioproducto a base de *Trichoderma* controla el carbón de maní y aumenta de rendimiento del cultivo. *Jornada Nacional de Maní*, 30, 09.

Peralta I. E., D. M. Spooner & S. Knapp (2008) Taxonomy of Wild Tomatoes and their Relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, and sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). Systematic Botany Monographs Vol. 84. American Society of Plant Taxonomists. Ann Arbor, Michigan, USA. 186.

Perniola, O. S., Chorzempa, S. E., Staltari, S., Astiz Gassó, M. M., Galian, L. R., & Molina, M. D. C. (2016). Biofumigación con *Brassica juncea* L. Czerniak y *Sinapis alba* L. Acción sobre el crecimiento in vitro de *Trichoderma* spp. y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner. *Revista de Protección Vegetal*, 31(1), 57-62.

Perniola, O. S., Staltari, S., Chorzempa, S. E., Gassó, M. M. A., & del Carmen Molina, M. (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*, 46(2), 45-56.

Polack, A. & Mitidieri, M. (2005) Producción de tomate. Diferencia de protocolo preliminar de manejo integrado de plagas y enfermedades. Ediciones INTA.EEA San Pedro, Buenos Aires, Argentina, 19 pp.

Rista, L.; Sillon, M.; Favaro, J.C. y Buyatti, M. (2005). Dispersión de *Clavibacter michiganensis* a través de la poda. XII Congreso Latinoamericano y XXVIII Congreso Argentino de Horticultura. General Roca, Río Negro.

Rolleri, J., Stocco, M., Moya, P., & Mónaco, C. (2021). Posibilidades del uso de *Trichoderma harzianum* en el biocontrol del marchitamiento y cancro bacteriano del tomate. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 120(2), 080-080.

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).

Sánchez, F. (2019). La resistencia de las plagas y enfermedades ante el control convencional y la búsqueda de alternativas de biocontrol. *Tierra Infinita*, 5(1), 241-251.

Sarandón, S. J., & Flores, C. C. (2014). LA INSUSTENTABILIDAD DEL MODELO DE AGRICULTURA ACTUAL. En: *Agroecología*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). La Plata, Buenos Aires. pp 13-41.

Schaad, N. W., Jones, J. B. y Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul, MN

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2020. La producción de tomate en Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/agricultura/agricultura-ganaderia-y-pesca/informes-sectoriales-de-hortalizas> Ultimo acceso: Noviembre 2021.

Sharabani, G., Shtienberg, D., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., ... & Manulis-Sasson, S. (2013). Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*, 62(5), 1114-1122.

Sillón, M.R.; Herzog, L.J.; Rista, L.M. (1997). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate bajo invernadero. Determinación de la capacidad de penetración por flores. XX Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca, Buenos Aires. Libro de Resúmenes : 106.

Smith, E. F. (1910) A new tomato disease of economic importance. (Abstr.). *Science* (N.S.) 31:794-796.

Stocco, M. C., Mónaco, C. I., Abramoff, C., Lampugnani, G., Salerno, G., Kripelz, N., ... & Consolo, V. F. (2016). Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of *Septoria* leaf blotch of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 1-10.

Strider, D. L. (1970). 36 Vol. 54, No. 1--PLANT DISEASE REPORTER--January 1970 TOMATO SEEDLING INOCULATIONS WITH *CORYNEBACTERIUM MICHIGANENSE*. *The Plant Disease Reporter*, 54, 36.

Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., & Smart, C. D. (2013). Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and environmental microbiology*, 79(22), 6948-6957.

Walker, J.C. y Kendrick, J.B. Jr. (1948). Plant nutrition in relation to disease development. IV. Bacterial canker of tomato. *American Journal of Botany* 35: 186-192.